RICARDO VESSONI PEREZ

**Os polimorfismos de um único nucleotídeo rs713041
no *GPX4* e rs17883901 no *GCLC* modulam a
susceptibilidade à retinopatia diabética em pacientes
com diabetes mellitus tipo 1**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Cardillo Corrêa
Giannella

**SÃO PAULO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Perez, Ricardo Vessoni

Os polimorfismos de um único nucleotídeo rs713041 no *GPX4* e rs17883901 no *GCLC* modulam a susceptibilidade à retinopatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 / Ricardo Vessoni Perez -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1/genética 2.Complicações do diabetes/genética 3.Retinopatia diabética/genética 4.Suscetibilidade genética 5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Antioxidantes/metabolismo 7.Glutationa/genética 8.Glutationa peroxidase/genética

USP/FM/DBD-232/17

*Mais do que uma simples etnia, o
Brasil é um povo nação, assentado
num território próprio para nele viver
seu destino.*

Darcy Ribeiro

*Ao meu filho Raul, à minha esposa
Daniela e aos meus pais Maria Elisa
e Dagoberto.*

AGRADECIMENTOS

O destino está sujeito a alguns “devir” e foi através de um desses que fui procurar a Prof. Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella.

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora Malu por ter me aceito como seu aluno durante um café no porão da faculdade. Durante esses últimos anos só confirmou o que imaginava que fosse: uma mestra capaz de ensinar, corrigir seus erros, auxiliar nos caminhos, mas sem tirar a personalidade de suas ideias. Na vida pessoal uma pessoa agregadora, sempre de bom humor, com pensamento positivo e empolgação para o dia a dia. E se não bastasse essas qualidades, montou um grupo excepcional sob sua tutela.

E desse grupo agradeço quatro pessoas de forma muito especial, já que tiveram papel fundamental na construção dessa tese. O companheirismo, o trabalho em grupo, o apoio e a torcida de um pelo outro fez esse projeto possível. Muito obrigado e parabéns por defenderem suas teses com tanto primor: Sharon Nina Admoni, Maria Beatriz Camargo Monteiro Caillaud, Thiago Andrade Patente e Daniele Pereira Santos-Bezerra.

E durante esse mesmo café com a Malu, ela comentou sobre fundo de olho e diabetes, logo lembrei das considerações de uma amiga e colega do grupo de teatro medicina sobre a beleza das imagens do fundo de olho. Obrigado Dra. Luciana Malta de Alencar por fazer a ligação com a oftalmologia e por me apresentar a Dra. Cleide Guimarães Machado que avaliou mais de 600 olhos, cada um com 7 campos, ou seja, 4200 campos! Muito obrigado Cleide por sua ajuda fantástica!

A construção do projeto não seria possível sem o empenho da Ana Mercedes Cavaleiro e da Maria Auxiliadora! Obrigado pela paciência, calma e pela imensa ajuda nos PCRs e banco de DNA!

Agradeço aos pacientes pela confiança, entrega e paciência durante o exame de retinografia, coleta de DNA e questionários.

À Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, Dra. Marcia Nery e aos residentes por encaminharem os pacientes e permitirem que o projeto fosse realizado e à Dra. Marcia Queiroz por além de encaminhar os pacientes e insistir para minha tese andar no momento de maior desânimo, fez uma excelente correção da minha qualificação.

Agradeço ao Prof. Dr. Sergio Dib por contribuir com bons conselhos na minha qualificação, assim como às Dra. Elizabeth João Pavin e Maria Cândida Ribeiro Parisi por contribuir com os dados clínicos dos pacientes da UNICAMP.

À equipe do ambulatório de endocrinologia, da recepção, da enfermagem, do agendamento. Todos ajudaram muito. Agradeço também à Cida da pós-graduação, por não desanimar e sempre sorrindo me explicar mil vezes como funciona a regulamentação do doutorado.

Às professoras titulares Profas. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça e Ana Claudia Latrônico, por estimulam e permitem uma estrutura na endocrinologia que possibilita projetos de pesquisa de grande qualidade.

Aos meus professores na endocrinologia e na vida. Primeiro meu pai, Dr. Dagoberto Alex Cardenuto Perez por servir como exemplo além de estimular o crescimento e a constante atualização na profissão. À Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira, pelo carinho e respeito ao paciente, pelos conhecimentos endocrinológicos praticamente insuperáveis que passa para o aluno com maestria, ao Dr. Alfredo Halpern (*in memoriam*) pelo vanguardismo, inovação sem perder o domínio da ciência, ao Prof. Dr. Bernardo Leo Wajchenberg pelo exemplo de juventude intelectual, no contínuo acúmulo de conhecimento e pela companhia em alguns cafés com estórias no “aquário”. Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett, que me permitiu ver o Brasil de uma forma diferente.

Aos meus colegas de vida e doutorado: Dr. André Murad Faria, Dra. Marcela Paula Ferraz, Dra. Ana Luisa Garcia Calich, Dra. Gabriela de Andrade Vasques, por serem amigos, exemplos, companheiros e abrirem caminhos com suas teses brilhantemente defendidas.

Aos meus amigos e colegas de profissão que dentre muitos outros engrandecem a endocrinologia e me deram apoio nessa trajetória, acompanhando nos congressos, aulas e momentos de lazer: Bruno Halpern, Cecília Halpern, Manuela Rocha Braz e Danilo de Souza Aranha Vieira.

Ao meu irmão André, amigos, familiares e afilhado Henrique que tiveram paciência com alguma ausência, não vou citar o nome de todos pela injustiça que posso cometer.

À minha mãe Maria Elisa Vessoni Perez e a meus avós, Anselmo (*in memoriam*) e Maria Sylvia, os quais sempre admirei pela capacidade de união da família e agradeço pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da vida. Aos meus avós Perez (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*), pelo estímulo à escolha da medicina, simplicidade, valorização do passado e pelos exemplos de superação.

Aos residentes e colegas do Hospital do Servidor Público Estadual, pela companhia no dia a dia e por praticarmos juntos à endocrinologia.

À minha cachorra Beta, pela lealdade, carinho e companhia. Permaneceu deitada ao meu lado em praticamente todo tempo que levei para escrever essa tese.

E finalmente a minha esposa e parceira Daniela que além da alegria do meu filho, com seu amor, me deu suporte emocional e financeiro, para que juntos conseguíssemos mais essa conquista.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Celular (LIM-25), Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Diabetes mellitus tipo 1	2
1.2	Retinopatia diabética	3
1.2.1	Epidemiologia	3
1.2.2	Etiopatogenia	4
1.2.3	Fatores de risco e de proteção	9
1.2.4	Associação com outras complicações diabéticas microvasculares	15
1.3	Vias bioquímicas desencadeadas pela hiperglicemia	16
1.3.1	Via do poliol	17
1.3.2	Produtos finais de glicação avançada	18
1.3.3	Via da proteína cinase C	19
1.3.4	Via da hexosamina	20
1.3.5	Estresse oxidativo	21
1.4	Sistemas anti e pró-oxidantes pouco explorados na suscetibilidade genética às complicações crônicas do DM	21
1.4.1	O sistema glutational.....	21
1.4.2	O sistema tiorredoxina	26
1.4.3	O sistema NADPH oxidase.....	27
1.5	Justificativa	29
1.6	Escolha dos polimorfismos.....	29
1.6.1	<i>GPX4</i>	30
1.6.2	<i>GCLC</i>	30
1.6.3	<i>CYBB</i>	31
1.6.4	<i>CYBA</i>	31
1.6.5	<i>TXNIP</i>	32
2	OBJETIVOS	33
3	MÉTODOS.....	35
3.1	Casuística.....	36
3.2	Dados clínicos.....	37
3.3	Avaliação da neuropatia periférica	38
3.4	Avaliação da neuropatia autonômica cardiovascular	38
3.5	Avaliação laboratorial.....	39
3.6	Avaliação da doença renal diabética.....	40
3.7	Avaliação da retina	40
3.8	Extração de DNA.....	43

3.9	Genotipagem.....	43
3.10	Análise estatística	44
4	RESULTADOS.....	46
4.1	Características clínicas.....	47
4.2	Associação dos polimorfismos de um único nucleotídeo com a retinopatia	51
4.2.1	rs713041 no <i>GPX4</i>	51
4.2.2	rs17883901 no <i>GCLC</i>	52
4.2.3	rs6610650 no <i>CYBB</i>	53
4.2.4	rs não registrado no <i>CYBA</i>	54
4.2.5	rs 7211 no <i>TXNIP</i>	54
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÕES	64
7	ANEXO	66
8	REFERÊNCIAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O_2^-	- Ânion superóxido
3'UTR	- Região 3' não traduzida
ACCORD	- <i>Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes</i>
ACR	- Razão albumina creatinina
AGEs	- Produtos finais de glicação avançada
ARD	- Ausência de retinopatia diabética
ARE	- Elementos de resposta antioxidante
AVC	- Acidente vascular cerebral
BRA	- Bloqueador do receptor de angiotensina
CA	- Circunferência abdominal
CYBA	- Gene que codifica a subunidade p22phox
CYBB	- Gene que codifica a NOX2
DAG	- Diacilglicerol
DCCT	- <i>Diabetes control and complication trial</i>
DIRECT	- <i>Diabetic Retinopathy Candesartan Trials</i>
DM	- Diabetes mellitus
DM1	- Diabetes mellitus tipo 1
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídeos
DP	- Desvio-padrão
DRD	- Doença renal diabética
DTI	- Dose total de insulina diária
EA	- Exsudatos algodonosos
ED	- Exsudatos duros
EDIC	- <i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
EFsec	- Fator de alongamento da Sec
EHW	- Equilíbrio de Hardy Weinberg
EIF4a3	- Fator de iniciação eucariótico 4a3
EM	- Edema macular
EMA	- Edema macular aparentemente ausente
EMP	- Edema macular aparentemente presente
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
ETDRS	- <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
EUCLID	- <i>EUrodiab Controlled trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes</i>

EURODIAB	- <i>European Diabetes: Aetiology Of Childhood Diabetes On AnEpidemiological Basis</i>
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
FC	- Fotocoagulação a laser
FIELD	- <i>Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes</i>
G3P	- Gliceraldeído-3-fosfato
GAD	- Descarboxilase do ácido glutâmico
GAPDH	- Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
<i>GCLC</i>	- Gene que codifica a subunidade catalítica da enzima γ -GCS
GDP	- Guanosina di-fosfato
GLUT	- Transportador de glicose
GLUT1	- Transportador de glicose tipo 1
GoKinD	- <i>Genetics of Kidneys in Diabetes</i>
GPX	- Glutathione peroxidase
<i>GPX4</i>	- Gene que codifica a glutathione peroxidase 4
GSH	- Glutathione reduzida
GSR	- Glutathione reductase
GSS	- Glutathione sintetase
GSSG	- Glutathione oxidada
GST	- Glutathione transferase
GTP	- Guanosina tri-fosfato
GWAS	- Estudo de associação genômica ampla
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	- Hemoglobina glicada
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HE	- Hemorragias retinianas
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance
IC	- Intervalo de confiança
ICAM1	- Molécula de adesão intercelular 1
IECA	- Inibidor da enzima conversora da angiotensina II
IGF1	- Fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IL1	- Interleucina 1
IL6	- Interleucina 6
IMC	- Índice de massa corpórea
<i>IPEX</i>	- Gene que codifica a proteína <i>Forkhead box P3</i>
IRMAs	- Anormalidades microvasculares intra-retinianas

LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
MA	- Microaneurismas
MAF	- <i>Minor allele frequency</i>
ME	- Microhemorragias
NAC	- Neuropatia autonômica cardiovascular
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NFKb	- Fator nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
NOX	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NOX2	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NP	- Neuropatia periférica
NRF2	- <i>Nuclear factor, erythroid 2 like 2</i>
NV	- Neovasos
OH	- Radical hidroxil
OR	- <i>Odds ratio</i>
PA	- Pressão arterial
PAI1	- Inibidor tipo 1 do ativador do plasminogênio
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEGF	- Fator derivado do epitélio pigmentar
PKC	- Proteína cinase C
PKC β	- Proteína cinase C beta
PPAR	- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPAR α	- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
RAGE	- Receptor de produtos finais de glicação avançada
RD	- Retinopatia diabética
RDNP	- Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	- Retinopatia diabética proliferativa
RNA	- Ácido ribonucléico
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
SBP2	- Proteína de ligação da Sec
Sec	- Selenocisteína
SECIS	- Sequência de inserção da Sec
SECp43	- Proteína associada ao tRNA selenocisteína
SGLT	- Cotransportador sódio-glicose
<i>SLC2A1</i>	- Gene que codifica o GLUT1
SNP	- Polimorfismo de um único nucleotídeo
SPS2	- Selenofosfato sintase do tipo 2
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido

TFGe	- Taxa de filtração glomerular estimada
TGF β	- Fator de crescimento transformante beta
TNF α	- Fator de necrose tumoral alfa
tRNA ((Ser)sec)	- Seleno cisteil RNA transportador (tRNA ((Ser)sec)
TXN	- Tiorredoxina
TXNIP	- Proteína de interação com a tiorredoxina
TXNRD	- Tiorredoxina redutase
UCP	- Proteína desacopladora
UKPDS	- <i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
UTR	- Região não traduzida
VEGF	- Fator de crescimento do endotélio vascular
WESDR	- <i>Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy</i>
γ GCS	- γ -glutamilcisteína sintetase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Retina normal, campo fotografado com retinógrafo Topcom TRC-NW8.....	5
Figura 2 -	Esquema representando a retina. Sob condições normais, células endoteliais, pericitos, astrócitos, células de Muller e neurônios estão intimamente conectados, para estabelecer a barreira hemato-retiniana e controlar o fluxo de nutrientes, mantendo assim o ambiente adequado para a sinalização neuronal	6
Figura 3 -	Ativação da via dos polióis pela hiperglicemia. ROS: espécies reativas de oxigênio	17
Figura 4 -	Lesão endotelial induzida pela produção intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs)	19
Figura 5 -	Resumo das principais vias deletérias relacionadas à hiperglicemia e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).	20
Figura 6 -	Biossíntese das selenoproteínas: selenoproteínas são formadas pela incorporação de uma selenoscisteína (Sec) durante a tradução da proteína.....	24
Figura 7 -	Sistema tiorredoxina. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina.....	27
Figura 8 -	Sistema NADPH oxidase em fagócitos com as subunidades de membrana (NOX2 e p22phox), os componentes citosólicos (p40phox, p47phox e p67phox) e um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac)	28
Figura 9 -	Delineamento do estudo.....	37
Figura 10 -	Campos fotografados com o retinógrafo	41
Figura 11 -	Lesões presentes na Retinopatia diabética	42
Figura 12 -	Pacientes incluídos no estudo de acordo com o grau de retinopatia diabética (RD).....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Polimorfismos associados a retinopatia diabética em pacientes com DM1	15
Quadro 2 -	Polimorfismos de um único nucleotídeo que foram avaliados no presente estudo.....	30
Quadro 3 -	Classificação internacional de retinopatia diabética (RD).....	42
Quadro 4 -	Classificação internacional de edema macular (EM)	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com a classificação da retinopatia diabética (RD).....	50
Tabela 2 -	Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global	51
Tabela 3 -	Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com o grau de retinopatia diabética na população estratificada por sexo.....	52
Tabela 4 -	Frequência genotípica do polimorfismo rs17883901 no gene <i>GCLC</i> de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global	53
Tabela 5 -	Frequência genotípica do polimorfismo rs6610650 no <i>CYBB</i> de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global	53

RESUMO

Perez RV. *Os polimorfismos de um único nucleotídeo rs713041 no GPX4 e rs17883901 no GCLC modulam a susceptibilidade à retinopatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A retinopatia diabética (RD) é uma das complicações mais frequentes dos diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Durante a hiperglicemia, as células endoteliais da retina são expostas a altas concentrações de glicose e são incapazes de conter seu influxo. Isso resulta na ativação de vias deletérias intracelulares que culminam com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e lesão neuronal e vascular. O estado pró inflamatório e pró trombótico ativa vias pró-oxidantes como a da NADPH oxidase. O excesso de ROS não é devidamente tamponado pelas vias antioxidantes (tais como as vias da glutathione e da tioredoxina) em situações de hiperglicemia crônica, o que contribui para perpetuar o dano. **OBJETIVO:** Caracterizar uma população de pacientes DM1 quanto ao grau de RD e analisar a associação desta complicação microvascular com cinco polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) em genes pertencentes a vias pró- e antioxidantes. **MÉTODOS:** Pacientes acompanhados no ambulatório de diabetes de dois hospitais terciários do estado de São Paulo foram submetidos a fotos digitais do fundo de olho que incluíam os sete campos padronizados no estudo *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) ou a uma oftalmoscopia binocular indireta; ambos foram avaliados por um único oftalmologista em cada um dos hospitais. A genotipagem dos SNPs foi feita por reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa com duas sondas marcadas para cada reação. Os seguintes SNPs foram estudados: rs713041 (gene *GPX4*), rs17883901 (gene *GCLC*), rs6610650 (gene *CYBB*), -675 T/A (gene *CYBA*) e rs7211 (gene *TXNIP*). Os dados clínicos foram coletados por consulta ao prontuário médico ou questionário. Foi utilizado o modelo de regressão logística nominal politômica, tendo como categoria de referência a ausência de RD (ARD) ou

dicotômica, tendo como categorias de referência a ausência de RD proliferativa (RDP) ou ARD. Após correção de Bonferroni, um valor de $p \leq 0,02$ foi considerado significativo. **RESULTADOS:** Um total de 341 pacientes (62% mulheres; idade média de 35 [± 11] anos; com 22 [± 9] anos de duração do DM1 e HbA1c de 8,6% [$\pm 1,6$]) foi incluído. A prevalência de RDP foi de 30%, enquanto 42% dos pacientes apresentavam RD não proliferativa (RDNP). Somente os SNPs cuja distribuição dos genótipos respeitou o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram analisados. Após ajuste para potenciais fatores de confusão, a presença do alelo T no SNP rs713041 (+718 C/T) no *GPX4* foi inversamente associada à prevalência de RDP em pacientes do sexo feminino, com um *odds ratio* (OR) de 0,36 (intervalo de confiança [IC] de 95% de 0,17 a 0,75; $p = 0,007$) na análise dicotômica de RDP *versus* ausência de RDP. A presença do alelo T no SNP rs17883901 (-129 C/T) no *GCLC* conferiu risco para RDP na análise politômica (OR de 4,23; IC 95% de 1,38 a 12,93; $p=0,01$) e conferiu risco para a presença de qualquer grau de RD na análise dicotômica (ARD *versus* RDNP + RDP; OR de 3,07; IC 95% de 1,22 a 8,95; $p=0,02$). Não houve associação entre o SNP rs6610650 (gene *CYBB*) e RD nessa população. **CONCLUSÃO:** Os SNPs funcionais rs713041 no *GPX4* e rs17883901 no *GCLC* modularam a susceptibilidade a RD na população de pacientes com DM1 estudada.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 1. Complicações do diabetes. Retinopatia diabética. Suscetibilidade genética. Polimorfismo de nucleotídeo único. Antioxidantes. Glutathione. Glutathione peroxidase.

ABSTRACT

Perez RV. *The single nucleotide polymorphisms rs713041 in GPX4 and rs17883901 in GCLC modulate the susceptibility to diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUCTION: Diabetic retinopathy (DR) is one of the most frequent complications of type 1 diabetes mellitus (T1D). During hyperglycemia, retinal endothelial cells are exposed to high glucose concentrations and are unable to contain their influx. This results in the activation of deleterious intracellular pathways that culminate with the increase of reactive oxygen species (ROS) and neuronal and vascular injury. The pro-inflammatory and prothrombotic state activates pro-oxidant pathways such as NADPH oxidase. The excess of ROS is not adequately buffered by the antioxidant pathways (such as glutathione and thioredoxin pathways) in situations of chronic hyperglycemia, which contributes to perpetuate the damage. **OBJECTIVE:** To characterize a population of T1D patients regarding DR degree and to analyze the association of this microvascular complication with five single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes belonging to pro- and antioxidant pathways. **METHODS:** Patients followed at the diabetes outpatient clinic of two tertiary hospitals in the state of São Paulo were submitted to digital photos of the eye fundus that included the seven fields standardized in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) or to binocular indirect ophthalmoscopy; both were evaluated by a single ophthalmologist in each one of the hospitals. SNP genotyping was performed by polymerase chain reaction after reverse transcription with two labeled probes for each reaction. The following SNPs were studied: rs713041 (*GPX4* gene), rs17883901 (*GCLC* gene), rs6610650 (*CYBB* gene), -675 T/A (*CYBA* gene) and rs7211 (*TXNIP* gene). The clinical data were collected by consulting the medical chart or by questionnaire. The polytomous nominal logistic regression model was used, having as reference category the absence of DR (ADR)

or the dichotomous nominal logistic regression model was used, having as reference categories the absence of proliferative DR (PDR) or ADR. After Bonferroni correction, a p value ≤ 0.02 was considered significant. **RESULTS:** A total of 341 patients (62% female; mean age of 35 [$\pm$ 11] years-old; diabetes duration of 22 [$\pm$ 9] years and HbA1c of 8.6% [$\pm$ 1.6]) was included. The prevalence of PDR was 30%, while 42% of the patients had non-proliferative DR (NPDR). Only SNPs whose distribution of genotypes respected the Hardy-Weinberg equilibrium were analyzed. After adjusting for potential confounding factors, the presence of the T allele at rs713041 (+718 C/T) in *GPX4* was inversely associated with the prevalence of PDR in female patients, with an odds ratio (OR) of 0.36 (95% confidence interval [CI] 0.17-0.75; $p = 0.007$) in the dichotomous analysis of PDR *versus* absence of PDR. The presence of the T allele at rs17883901 (-129 C/T) in *GCLC* conferred risk for PDR in the polytomous analysis (OR of 4.23; 95% CI 1.38 to 12.93; $p = 0.01$) and for any degree of DR in the dichotomous analysis (ADR *versus* NPDR + PDR; OR of 3.07; 95% CI 1.22-8.95; $p = 0.02$). There was no association between the SNP rs6610650 (*CYBB* gene) and DR in this population. **CONCLUSION:** The functional SNPs rs713041 in *GPX4* and rs17883901 in *GCLC* modulated the susceptibility to DR in the studied population of patients with T1D.

Descriptors: Diabetes mellitus, type 1. Diabetes complications. Diabetic retinopathy. Genetic predisposition to disease. Polymorphism, single nucleotide. Antioxidants. Glutathione. Glutathione peroxidase.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas, geralmente levando a deficiência absoluta de insulina; ele corresponde a cerca de 5 a 10 % dos casos de diabetes mellitus (DM). A maioria dos casos de DM1 tem etiologia autoimune, sendo a suscetibilidade genética conferida pelos genes *DQA* e *DQB* do grupo HLA-DR/DQ e cursa com autoanticorpos positivos. O DM1 pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas a insulinopenia se desenvolve mais rapidamente em crianças e adolescentes, que têm maior risco de desenvolver cetoacidose diabética¹.

Os portadores de DM1 estão sujeitos à morbidade relacionada à hiperglicemia aguda e à hiperglicemia crônica. Sabe-se que o tempo de duração da doença e o controle glicêmico são os principais fatores associados às complicações neuropáticas e microvasculares: retinopatia diabética (RD) e doença renal diabética (DRD). A hiperglicemia também está associada a um aumento de risco cardiovascular, especialmente quando associada aos componentes da Síndrome metabólica (hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e obesidade centrípeta) e a comportamentos de risco (dieta inadequada, sedentarismo e tabagismo)^{2,3}.

Apesar dos avanços nos regimes insulínicos, atingir um bom controle glicêmico no tratamento do DM1 não é fácil. No Estudo Multicêntrico de Diabetes tipo 1 do Brasil, apenas 13,5 % dos pacientes apresentavam-se dentro do alvo para o

controle glicêmico⁴. Mesmo com o advento de novas formulações de insulina com melhores perfis farmacocinéticos, o acesso restrito a elas, o entendimento da doença e seus riscos, a educação em DM tanto dos médicos quanto dos pacientes e o risco de hipoglicemias e suas consequências ainda limitam os bons resultados. Com o tratamento intensivo, o risco das complicações crônicas diminui, mas o risco de episódios hipoglicêmicos aumenta³. Além disso, existe uma dificuldade de oferecer o tratamento intensivo a todos os portadores de DM1, o que diminui ainda mais o sucesso da estratégia.

É perceptível na prática clínica que alguns pacientes que permanecem mal tratados por vários anos não apresentam complicações microvasculares, enquanto outros desenvolvem as complicações mais rapidamente. Assim, a identificação de indivíduos mais suscetíveis para o desenvolvimento das complicações facilitaria a individualização do tratamento e um foco em metas mais rígidas, com consultas mais frequentes, o que poderia reduzir a incidência de amaurose, diálise e amputações.

1.2 Retinopatia diabética

1.2.1 Epidemiologia

A RD é uma das complicações mais frequentes e características do DM e está intimamente relacionada ao controle glicêmico e ao tempo de doença. Estima-se que existam atualmente no mundo aproximadamente 32,4 milhões de pessoas cegas e 191 milhões com baixa acuidade visual⁵, das quais 2,6 % e 1,9 %, respectivamente, teriam a RD como etiologia, havendo entretanto diferenças regionais como no sul da América Latina, onde mais de 5,5% dos casos de amaurose são atribuídos a RD⁶. Nos últimos 20 anos houve uma tendência ao aumento da participação relativa da

RD tanto nos casos de cegueira, quanto nos casos de diminuição da acuidade visual⁷; 50% destes casos poderiam ter sido evitados com o diagnóstico e tratamento precoces da RD^{8,9}. Nos Estados Unidos, a RD é a principal causa de cegueira na população economicamente ativa (20 a 74 anos)¹⁰.

A realização dos estudos que demonstraram a importância do controle glicêmico intensivo na prevenção das complicações crônicas (*Diabetes Control and Complication Trial* [DCCT] no DM1 e *United Kingdom Prospective Diabetes Study* [UKPDS] no DM tipo 2) levou ao aumento do número de pacientes buscando metas glicêmicas mais rígidas com o uso de múltiplas doses de insulina e automonitorização. Isso resultou em reduções de 76 e 57%, respectivamente, nas incidências de RD proliferativa (RDP) e de perda de acuidade visual em pacientes com DM1, segundo o estudo populacional *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy* (WESDR). Faltam dados relativos a pacientes com DM tipo 2^{11, 12}. A RDP, por sua vez, continua sendo um desafio, uma vez que cerca de 20% dos pacientes com bom controle metabólico estão sujeitos a esta complicação após 30 anos de doença¹³.

1.2.2 Etiopatogenia

A retina é um tecido translúcido que fica aderido ao fundo do globo ocular e é formada por neurônios e células da glia, que estão em contato íntimo com estruturas microvasculares. A parte externa da retina, formada por neurônios fotorreceptores e células de “Muller”, é irrigada por difusão via camada pigmentar pelo plexo coroidal. As camadas internas da retina, por sua vez, comportam células de “Muller”, células amácrinas e horizontais (neurônios de integração), células bipolares (neurônios de

primeira ordem), células ganglionares (neurônios de segunda ordem), as quais são nutridas pelas artérias retinianas que emergem junto ao disco ótico, formando duas arcadas que se dividem em artérias menores, arteríolas e capilares com apenas uma camada de células endotéliais, sustentadas e estruturadas por células chamadas pericitos. A drenagem é feita pelas veias retinianas que acompanham o trajeto das artérias (Figuras 1 e 2)¹⁴.

Figura 1 - Retina normal, campo fotografado com retinógrafo Topcom TRC-NW8

Figura 2 - Esquema representando a retina. Sob condições normais, células endoteliais, pericitos, astrócitos, células de Muller e neurônios estão intimamente conectados, para estabelecer a barreira hemato-retiniana e controlar o fluxo de nutrientes, mantendo assim o ambiente adequado para a sinalização neuronal [FONTE: Antonetti *et al.*¹³]

As células fotorreceptoras convertem energia luminosa em sinais neuronais, que são passados por seus axônios para os dendritos das células bipolares; essas transmitem esses sinais para as células ganglionares, cujos axônios formarão o nervo ótico, que terminará nos neurônios de terceira ordem do corpo geniculado lateral e, finalmente, no córtex occipital¹⁴.

Na camada interna da retina, a perfeita interação entre neurônios, astrócitos, células da glia, pericitos e endotélio vascular, juntamente com sua membrana basal e as ligações intercelulares (*tight junctions*), formam a barreira hemato-retiniana, que impede o extravasamento de conteúdo do plasma para a retina. O transporte de nutrientes é feito por pinocitose, e o excesso de líquido é reabsorvido por meio da pressão osmótica dos vasos, o que evita o edema e mantém a homeostase energética do tecido. O fluxo sanguíneo é determinado por metabólitos (lactato, oxigênio e gás carbônico), além das células da glia¹³.

O endotélio retiniano e os pericitos são ricos no transportador de glicose (GLUT) do tipo 1 (GLUT1), que facilita a entrada de glicose do meio extracelular para o meio intracelular, independentemente da insulina¹⁵. Em situações de hiperglicemia, a entrada de glicose para o meio intracelular desencadeia diversas vias metabólicas deletérias que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, vide item 1.3.1). O estresse oxidativo resultante se estabelece em consequência da menor eficiência dos sistemas antioxidantes endógenos, comprometidos pela hiperglicemia e potencializado pela enorme captação de oxigênio pelas células da retina¹⁶. Juntamente com a redução do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o estresse oxidativo determina a apoptose dos pericitos e das células endoteliais, com consequente perda da estrutura capilar¹⁶.

A perda da estrutura capilar compromete as *tight junctions*, facilitando o extravasamento de conteúdo intravascular para a retina e culminando com a formação de microaneurismas, micro-hemorragias, além dos exsudatos duros, que consistem em lipídios e proteínas não reabsorvidos que se depositam na retina.

A lesão microvascular associada à redução de fatores neurotróficos em vigência de hiperglicemia levam a alterações de funcionamento das células nervosas retinianas que interferem com o metabolismo do glutamato (principal neurotransmissor). Isso resulta na perda da atividade sináptica e na apoptose. As células em apoptose ativam a microglia, que desencadeia uma resposta inflamatória com aumento de fator de necrose tumoral alfa [TNF α], interleucina [IL]1 e 6 e aumento na adesão de leucócitos e migração de macrófagos, culminando com as manifestações exsudativas e isquêmicas características da RD não proliferativa (RDNP)^{13,14}.

Todo o processo relatado acima aumenta a disfunção das células da glia com potencialização da ativação da enzima NADPH oxidase 2 (NOX2), que gera ROS e aumenta o estresse oxidativo, favorecendo a produção de fatores de crescimento, especialmente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Com o aumento de VEGF e consequente estímulo à proteína cinase C beta (PKC β) responsável pela endocitose nas *tight junctions*, se estabelece uma maior instabilidade da barreira hemato-retiniana que, somada à perda da capacidade reabsortiva osmótica dos capilares, resulta em um processo exsudativo intenso que, quando próximo à macula, é conhecido pelo termo edema macular, que pode ser causa de redução da acuidade visual em qualquer fase da RD. O aumento do VEGF concomitantemente à diminuição da produção de fator derivado do epitélio pigmentar (PEGF), que é um fator antagonista da proliferação vascular, favorece a angiogênese com formação de neovasos^{13,14}.

O mau controle metabólico persistente leva à progressão do quadro, com piora da lesão endotelial, que se estende aos vasos maiores, culminando com o engurgitamento das artérias, “ensalsichamento” das veias, formação de vasos colaterais e das anormalidades vasculares intrarretinianas. Adicionalmente, a hiperglicemia estimula a produção de substâncias vasoativas, como a angiotensina II e a bradicininae de metaloproteases que, associadas ao estado pró-inflamatório, favorecem os eventos exsudativos e a ocorrência de microtromboses e isquemia (exsudatos algodinosos) e hemorragias. As áreas isquêmicas estimulam a produção de fatores angiogênicos e de crescimento, como o VEGF, o fator de crescimento insulina-símile tipo 1 (IGF1) e a eritropoietina, entre outros, que em desbalanço com a diminuição da produção do PEGF, estimularão a formação de vasos anômalos que crescem em direção ao disco ótico, ao vítreo ou à íris, caracterizando a RDP¹³.

Apesar dos pacientes com RDP poderem ser assintomáticos, eles podem apresentar um quadro de perda abrupta da visão se houver um grande sangramento, com turvação do vítreo, descolamento de retina ou glaucoma neovascular. Em algumas destas situações, a perda visual pode ser irreversível.

1.2.3 Fatores de risco e de proteção

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da RD são a duração da doença, o grau de controle glicêmico e a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dislipidemia, puberdade e gravidez, no entanto, também influenciam o desenvolvimento desta complicação microvascular.

Duração da doença: quanto maior o tempo de exposição à hiperglicemia, maior o risco de desenvolvimento de lesões relacionadas a RD. Dados do WESDR mostraram que na população com diagnóstico de DM na infância, 8% já tinham lesões após três anos de diagnóstico, 25% após cinco anos de diagnóstico e 60% após 10 anos de diagnóstico. Em relação a RDP, a prevalência foi de 0% após três anos de diagnóstico e 25% após 15 anos, enquanto a incidência de RDP partiu de 0% nos primeiros cinco anos para 27,9% após treze anos de observação¹⁷.

Controle glicêmico: tanto no DM1 quanto no DM tipo 2, está bem estabelecido que a redução na hemoglobina glicada (HbA1c) para valores próximos aos considerados ideais está associada à redução na incidência de RD^{18,19}. Além disso, um controle glicêmico inicial inadequado pode levar a um pior prognóstico das lesões microvasculares, mesmo com posterior normalização da glicemia, o que é referido como efeito legado ou memória metabólica. Esse fenômeno ocorre, dentre outros fatores, devido a alterações epigenéticas atribuídas à hiperglicemia^{18,20}.

Hipertensão arterial sistêmica: os resultados do estudo UKPDS ilustram a importância do controle pressórico no desenvolvimento da RD, já que no grupo intervenção (pressão arterial [PA] de 144 x 82 mmHg) houve diminuição na progressão da RD em 34% e da perda da acuidade visual em 47% em relação ao grupo controle (PA de 154 x 87 mmHg)²¹. Esses dados são extrapolados para os pacientes com DM1, já que não existem estudos populacionais que mostram a influência do controle pressórico sobre a redução da progressão ou diminuição da incidência de RD em pacientes DM1. Os estudos existentes mostram redução de progressão e/ou incidência em pacientes tratados com bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, mas normotensos. A questão que permanece em aberto é se esses efeitos estariam relacionados à redução da PA ou ao efeito protetor dessas drogas^{22,23}.

Bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona: alguns estudos propõem um papel protetor do uso de bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona no desenvolvimento da RD. Em pacientes com DM1 normotensos, dois estudos mostraram benefícios: o *EUrodiab Controlled trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes* (EUCLID), no qual o lisinopril diminuiu a progressão da RD e o *Effect of candesartan on prevention* (DIRECT-Prevent 1), no qual a candesartana reduziu sua incidência. Já no DM tipo 2, um estudo não observou diferenças entre a nisoldipina e o enalapril, mas um efeito protetor do controle pressórico. Já o estudo DIRECT-2 evidenciou uma pequena melhora na RD com o uso de candesartana em pacientes com DM tipo 2 normotensos ou com bom controle da PA^{17,22,24}.

Dislipidemia: no estudo epidemiológico WESDR, pacientes com valores de colesterol LDL elevados apresentaram mais exsudatos duros, enquanto no estudo

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), esses pacientes apresentaram pior prognóstico do edema macular¹². Nenhum estudo de grande porte em seres humanos evidenciou benefícios do uso de estatinas sobre a RD.

Fibratos: um estudo observacional britânico com mais de 5.000 pacientes DM tipo 2 expostos a fibrato mostrou uma menor incidência de RD em comparação a um grupo de não expostos²⁵. Esse achado é apoiado pelos estudos *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes* (ACCORD) e *Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes* (FIELD), que mostraram a redução da progressão da RD com o uso do fenofibrato em pacientes com DM tipo 2. O mecanismo proposto envolveria a diminuição de fatores pró-inflamatórios e melhora do estresse oxidativo via ativação do fator de transcrição receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α)^{26, 27}.

Gestação: durante o estudo DCCT ficou evidente a progressão mais rápida da RD em pacientes gestantes, quando comparadas a pacientes não gestantes. Esse fato ocorreu tanto no grupo controle quanto no grupo que recebeu tratamento intensivo, mas foi pior no grupo controle, especialmente naquelas pacientes que, durante a gestação, foram tratadas de forma a atingirem um melhor controle glicêmico²⁸. Especula-se que a redução do fluxo sanguíneo secundária ao controle mais intensivo da hiperglicemia e consequente diminuição da perfusão em algumas áreas da retina sejam responsáveis pela piora da RD.

Puberdade: já foi descrito um maior risco de RDP em pacientes com diagnóstico de DM1 na fase pré-puberal quando comparados a pacientes com diagnóstico na fase pós-puberal, algo que também ocorre em relação à DRD, sugerindo que a puberdade tenha efeito acelerador na progressão das complicações

microvasculares do DM²⁹. Esse fato é atribuído à deterioração do controle glicêmico comum nessa faixa etária, em especial em pacientes do sexo feminino, secundário a má adesão à terapêutica e ao aumento da resistência à insulina²⁹⁻³¹. Está descrita na literatura uma diferença entre os sexos na prevalência de RD durante a infância e adolescência; em um estudo transversal finlandês com 297 pacientes, 7,6% dos meninos e 16,5 % das meninas tinham algum grau de RD, uma diferença estatisticamente significativa³².

Resistência à insulina: não está definido se a resistência à insulina é propriamente um fator de risco para o desenvolvimento das complicações microvasculares do DM, mas alguns indicadores de resistência à insulina, como índice de massa corpórea (IMC) aumentado, menores concentrações de adiponectina, maior relação cintura/quadril, entre outros, já foram associados a RD em algumas populações³³⁻³⁵.

Susceptibilidade genética: alguns estudos mostram agregação familiar dos casos de RD, ou gravidade e incidência de RD mais concordante em gêmeos monozigóticos, familiares e em grupos étnicos específicos³⁶⁻³⁹. Esses dados sugeriram que exista uma susceptibilidade genética para a RD e estimularam a realização de vários estudos de associação genética e genes candidatos⁴⁰. Estima-se que 25% do risco de desenvolver RD nos pacientes com DM1 e 50% do risco nos pacientes com DM tipo 2 derivam de sua herança genética⁴¹.

Genes que codificam proteínas envolvidas na fisiopatologia da RD foram estudados com o uso da estratégia de genes candidatos, como por exemplo: genes que codificam fatores de crescimento (VEGF e IGF1), moléculas envolvidas no metabolismo do ferro (eritropoietina, transferrina), moléculas envolvidas no estresse oxidativo (óxido

nítrico sintase endotelial [eNOS]), citocinas (TNF α e IL10), moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular 1 [ICAM1]), integrantes da via do poliol (sorbitol desidrogenase e aldose redutase) e a enzima conversora de angiotensina. A grande maioria dos trabalhos envolve pacientes com DM tipo 2 ou populações mistas^{41,42}.

Existem, no entanto, alguns estudos que avaliaram a associação de RD com polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) genéticos em populações exclusivas de pacientes com DM1, como aqueles demonstrados no Quadro 1. Um polimorfismo que identifica uma área com repetições do dinucleotídeo (CA) no gene que codifica a aldose redutase também já foi associado com a RD em pacientes com DM1 e com DM tipo 1^{43,44}. Uma grande metanálise com inclusão de mais de 2.900 pacientes de três coortes europeias demonstrou evidências de aumento de suscetibilidade a RD em pacientes carreadores do alelo raro T do polimorfismo rs17353856, situado na região exônica do gene *SUV39H2*. Esse gene codifica uma metiltransferase, enzima que atua no processo de metilação de histonas, estando, portanto, envolvida em alterações epigenéticas e que pode se constituir em um dos mecanismos propostos para explicar a memória metabólica⁴⁵.

Estudos com painéis de genes candidatos também foram realizados. Um painel contendo 1.536 polimorfismos presentes em 193 genes candidatos foi avaliado em 437 pacientes DM1 afroamericanos e mostrou que variações em pelo menos 10 dos genes selecionados podem influenciar a suscetibilidade a RD, genes esses implicados em transporte e metabolismo de glicose, angiogênese, neurotransmissão, hipertensão e desenvolvimento da retina⁴⁶.

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) e RD foram realizados e tiveram, em sua maioria, resultados inconclusivos e inconsistentes entre si, o que

pode ser justificado pela falta de padronização quanto ao grupo de casos e controles, por diferenças na genotipagem, na análise estatística, no valor de significância e nos critérios de inclusão dos pacientes⁴⁷. Em pacientes DM1, as associações feitas com GWAS derivam de metanálises, dentre elas destaca-se um estudo realizado com pacientes DM1 incluídos em duas coortes: *Genetics of Kidneys in Diabetes* (GoKinD) e *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) que incluiu, ao todo, 2.829 pacientes. Algumas regiões intergênicas foram associadas a RD, a maioria relacionada à regulação de micro-RNAs. O SNP com a maior associação foi o rs476141 ($p=1,2 \times 10^{-7}$) localizado entre dois genes, o *AKT3* e o *ZNF238*. O primeiro é uma serina treonina cinase que regula a sobrevivência celular e a angiogênese e é ativada pelo PDGF e pelo IGF1, o que levou os autores a sugerir que poderia estar envolvido na etiopatogenia da RD⁴⁸.

Até o momento, não existe um painel genético montado capaz de prever o risco de um indivíduo desenvolver RD. Desta forma, todos os pacientes com DM devem ser rastreados, com periodicidade definida pelo controle glicêmico, acometimento ocular e tipo de DM; podem ser necessárias visitas mensais ou trimestrais para pacientes com RDNP grave ou RDP e visitas bi-anuais para pacientes sem RD e com bom controle glicêmico¹⁰.

Quadro 1 -Polimorfismos associados a retinopatia diabética em pacientes com DM1

Proteína	N	Comparação	Polimorfismo	Valor de p	Autor
AR	271	FG x (FL+ARD)	rs9640883	p=0,007	Abhary S <i>et al</i> ⁴³
AR	64	RDP x ARD	rs9640883	p=0,021	Richetti <i>et al</i> ⁴⁴
VEGF	175	RDNP grave	rs833070	p=0,047	Nakanishi <i>et al</i> ⁴⁹
VEGF	175	RDNP grave	rs699946	p=0,047	Nakanishi <i>et al</i> ⁴⁹
VEGF	190	FG x (FL+ARD)	rs699946	p=0,007	Abhary S <i>et al</i> ⁵⁰
VEGF	190	FG x (FL+ARD)	rs833068	p=0,017	Abhary S <i>et al</i> ⁵⁰
RAGE	848	RDP x (ARD +RDNP)	-374 T/A	p=0,03	Lindholm <i>et al</i> ⁵¹
eNOS	249	RD x não DM	-786 C/T	p=0,000	Bazzaz <i>et al</i> ⁵²
UCP1	257	RD X ARD	-3826 A/G	p=0,043	Brondani <i>et al</i> ⁵³
UCP2	196	RDP x ARD	Ala55Val	p=0,014	Crispim D <i>et al</i> ⁵⁴

AR: Aldose Redutase; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; RAGE: receptor de produtos finais de glicação avançada; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; UCP1: proteína desacopladora tipo 1; UCP2: proteína desacopladora tipo 2; FG: formas graves (Retinopatia diabética não proliferativa grave, retinopatia diabética proliferativa e edema macular clinicamente significante); FL: formas leves (Retinopatia diabética não proliferativa leve e moderada); ARD: Ausência de retinopatia diabética; RDP: Retinopatia diabética proliferativa.

1.2.4 Associação com outras complicações diabéticas microvasculares

Doença renal diabética: as duas complicações (DRD e RD) costumam estar associadas e podem evoluir juntas para seus estágios terminais (diálise e perda visual, respectivamente). Um estudo prospectivo do centro de diabetes “Steno”, acompanhou 537 pacientes DM1 com pelo menos cinco anos de diagnóstico por aproximadamente 10 anos e associou a presença de qualquer tipo de RD com a evolução para DRD incipiente ou estabelecida⁵⁵. Já o estudo *European Diabetes: Aetiology Of Childhood Diabetes On An Epidemiological Basis* (EURODIAB), que seguiu cerca de 3.000 pacientes, identificou que os pacientes com RD, especialmente concomitantemente a HAS, estariam sob maior risco de DRD⁵⁶. Uma outra coorte composta por 340 pacientes com DM1 and 258 pacientes com DM tipo 2 normotensos seguidos por cinco anos mostrou um *odds ratio* (OR) para

desenvolvimento de albuminúria persistente em pacientes com RD de 1,95 (intervalo de confiança [IC] de 1,09 a 3,41; $p = 0,02$) para os pacientes com DM1 e 2,87 (IC de 1,45 a 5,69; $p = 0,002$) para os pacientes com DM tipo 2⁵⁷. Em um estudo transversal com 210 pacientes com DM1 e 438 pacientes com DM tipo 2, a gravidade da RD foi associada à deterioração da função renal, especialmente a RDP⁵⁸.

Neuropatia periférica (NP): cerca de um terço dos pacientes com DM são portadores de polineuropatia simétrica distal⁵⁹, mas os dados de associação de RD com NP não são tão abundantes quanto aqueles para DRD. Uma avaliação transversal de pacientes com DM1 e com DM tipo 2, já citada anteriormente, sugeriu que a RD prediz a presença de NP com uma razão de risco de 2,23 (IC de 1,56 a 3,18; $p < 0,001$)⁵⁸. Um estudo com 100 pacientes indianos com DM tipo 2 evidenciou que a prevalência de RD nos pacientes com NP era 2,75 vezes maior que nos pacientes sem NP⁶⁰.

Neuropatia autonômica cardiovascular (NAC): uma metanálise que incluiu pacientes tanto do DCCT e de sua continuação (EDIC) quanto do EURODIAB sugere que pacientes com RDP têm risco 3,69 (IC de 1,2 a 11,34; $p=0,02$) maior de ter NAC do que pacientes sem RDP⁶¹.

1.3 Vias bioquímicas desencadeadas pela hiperglicemia

Da mesma forma que ocorre com as células do glomérulo e da *vasa nervorum* periférica, as células do endotélio retiniano não são capazes de limitar a entrada de glicose. Por isso, em vigência de hiperglicemia ocorre a ativação de vias bioquímicas sabidamente deletérias: (a) via do poliol, (b) formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), (c) via da proteína cinase C (PKC) e (d) vias das hexosaminas⁶².

1.3.1 Via do poliálcool

O aumento da glicose intracelular naqueles tecidos nos quais a captação de glicose não depende de insulina, incluindo a retina, resulta na conversão desta a sorbitol pela enzima aldose redutase. O sorbitol, por sua vez, é oxidado à frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. A redução da glicose à sorbitol consome nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Como o NADPH é um doador de elétrons necessário para a regeneração da glutathione (GSH), um dos principais antioxidantes endógenos, isso pode induzir ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular (Figura 3).

Figura 3 - Ativação da via dos polióis pela hiperglicemia. ROS: espécies reativas de oxigênio, NADPH: nicotinamida adenina difosfato forma reduzida; GSSG: glutathione oxidada; GSH: glutathione reduzida; NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; NADP+: nicotinamida adenina difosfato; SDH: sorbitol desidrogenase [FONTE: Adaptado de Brownlee⁶²]

1.3.2 Produtos finais de glicação avançada

A glicose possui um grupamento aldeído capaz de reagir não enzimaticamente com o grupo amino das proteínas, levando à formação dos produtos de Amadori, dos quais o mais conhecido é a HbA1c. Outras reações ocorrem a partir deste ponto para produzir um grupo de compostos denominados produtos finais de glicação avançada, ou AGEs, que se ligam irreversivelmente às proteínas⁶².

Os AGEs originam-se da reação entre glicose e proteínas extracelulares, mas a taxa de formação de AGEs a partir da glicose é muito menor que a taxa de formação de AGEs a partir de precursores dicarbonil derivados de glicose gerados no meio intracelular, como o glioxal (gerado a partir da auto-oxidação da glicose) e o metilglioxal (gerado a partir da fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato [G3P]).

Há três diferentes mecanismos pelos quais a produção intracelular de precursores de AGEs lesa as células: (1) modificação de proteínas intracelulares; (2) difusão das mesmas para o meio extracelular com consequente alteração de proteínas, dentre as quais proteínas de matriz extracelular, que têm sua estrutura, função e *turnover* comprometidos e (3) difusão para o meio extracelular e alteração de proteínas circulantes, como a albumina. Essas proteínas modificadas podem se ligar a vários receptores de AGEs. O RAGE (receptor de AGEs) é o receptor mais estudado que, quando ativado, promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento envolvidos nas complicações microvasculares⁶². Já se demonstrou em roedores diabéticos que a interação dos AGEs com os RAGEs induz a ativação do sistema pró-oxidante NADPH oxidase (NOX), o que contribui para a produção de ROS (Figura 4)⁶³.

Figura 4 - Lesão endotelial induzida pela produção intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs). ROS: espécies reativas de oxigênio; NFκB: fator nuclear kappa B [FONTE: Adaptado de Brownlee⁶²]

1.3.3 Via da proteína cinase C

A família da PKC compreende várias isoformas, algumas ativadas pelo segundo mensageiro diacilglicerol (DAG). A ativação da PKC resulta na diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da atividade da endotelina 1, alteração na expressão de fatores de crescimento, como o VEGF e o fator de crescimento transformante β (TGF β), além da ativação do fator de transcrição NF κ B, que estimula diversos genes pró-inflamatórios. Essas alterações resultam em vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e comprometimento do fluxo sanguíneo que podem transformar-se em edema, hipóxia e estímulo para neovascularização⁶².

1.3.4 Via da hexosamina

A glicose intracelular em excesso é desviada para a via da hexosamina, onde é convertida à frutose-6-fosfato, e, após outras reações intracelulares, originará a UDP-N-acetilglicosamina. Esse composto modula a expressão de fatores de transcrição que acabam por alterar a expressão de várias proteínas, como o inibidor tipo 1 do ativador do plasminogênio (PAI1) e o TGF β , ambos envolvidos na vasculopatia diabética.

Cada uma das vias descritas acima têm seu próprio mecanismo de lesão, mas todas culminam com estresse oxidativo. Este, por sua vez, perpetua a ativação das quatro vias deletérias, já que as ROS geradas pela sobrecarga mitocondrial secundária à hiperglicemia causa uma inibição parcial da enzima da via glicolítica gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), o que determina o acúmulo dos precursores da via glicolítica, os quais são desviados para cada uma das quatro vias deletérias, conforme evidenciado na Figura 5⁶².

Figura 5 - Resumo das principais vias deletérias relacionadas à hiperglicemia e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS: espécies reativas de oxigênio; NADPH: nicotinamida adenina difosfato forma reduzida; NADP⁺: nicotinamida adenina difosfato, GFAT: glutamina 6-frutose amidotransferase; UDP-GlcNAc: uridina difosfato N-acetilglicosamina; DHAP: fosfato de di-hidroxiacetona; NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; GAPDH: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase; AGEs: produtos finais de glicação avançada

1.3.5 Estresse oxidativo

Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e, neste processo, os produtos intermediários são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^\cdot$), que são as chamadas ROS. A produção de ROS é controlada por sistemas tampões. Um aumento na produção de ROS desproporcional à capacidade dos sistemas anti-oxidantes é que resulta no estresse oxidativo e pode promover alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA), em proteínas e em fosfolípidos que alteram a homeostase celular¹⁶.

1.4 Sistemas anti e pró-oxidantes pouco explorados na suscetibilidade genética às complicações crônicas do DM

Os sistemas enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo, bem como os sistemas geradores de ROS, foram pouco estudados na suscetibilidade a RD. A seguir, serão sucintamente descritos sistemas envolvidos nas defesas anti-oxidantes e na geração de ROS que nunca foram, ou foram pouco estudados, na RD.

1.4.1 O sistema glutathiona

A GSH é uma molécula ubíqua produzida intracelularmente em todos os órgãos e tipos celulares. Em torno de 85 a 90% da GSH está distribuída no citoplasma, no entanto, ela pode estar também compartimentalizada em organelas, como na mitocôndria, peroxissomos, matriz nuclear e retículo endoplasmático. A GSH é um potente agente redutor, agindo como um doador de prótons, assim como co-fator de conjugados nucleofílicos. Por ser o mais importante anti-oxidante

intracelular do organismo, a depleção de GSH pode ser tanto causa como pré-requisito para a formação de ROS⁶⁴.

A GSH é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina cuja síntese requer a ação consecutiva de duas enzimas, a primeira (limitante da reação) é a γ -glutamylcisteína sintetase (γ GCS). Essa enzima é um heterodímero formado por uma subunidade regulatória e uma subunidade catalítica, codificada pelo gene *GCLC*. A segunda enzima a atuar é a glutathione sintetase (GSS), que adiciona o aminoácido glicina aos aminoácidos glutamina e cisteína. A GSH também pode ser sintetizada em vias de recuperação que envolvem seu catabolismo ou a reciclagem após sua oxidação⁶⁴ pela enzima glutathione reductase (GSR). A GSH detoxifica uma série de compostos por meio da enzima glutathione S-transferase (GST) e das glutathione peroxidases (GPX) (Figura 6). A diminuição das concentrações de GSH foi demonstrada em pacientes com DM e complicações microvasculares, correlacionando-se diretamente com o controle glicêmico⁶⁵. Alterações nas concentrações de GSH foram associadas a complicações microangiopáticas no paciente diabético⁶⁶.

As GPX pertencem há um grupo de enzimas com origem filogenética comum do qual fazem parte a GPX1, GPX2, GPX3, GPX4 e GPX6 (somente em humanos), que são consideradas selenoproteínas, pois contêm uma selenocisteína no seus centros catalíticos. Elas geralmente utilizam a GSH como substrato redutor, e somente concentrações expressivamente baixas de GSH diminuem a atividade dessas enzimas.

A GPX1 é o protótipo das GPX e sua ação detoxificante é idêntica àquela da GPX3 e da GPX4, utilizando duas moléculas de GSH em uma via de três etapas.

Aparentemente, a GPX1 é a enzima desta classe mais importante contra o estresse oxidativo, mas em camundongos *knockout* para o *GPX1*, outras GPX conseguem compensar a falta de GPX1 em situações de estresse oxidativo habitual. No entanto, em situações de estresse oxidativo de grande magnitude, o camundongo *knockout* vai a óbito independentemente da suplementação de selênio, mostrando a importância da GPX1 e a impossibilidade de substituição desta enzima em situações de grande estresse oxidativo. Outras atividades das GPX incluem a redução da ativação de vias pró-inflamatórias e ação contra lipídios peroxidados, sendo que boa parte desta última atividade fica a cargo da GPX4⁶⁷.

Existe um *ranking* hierárquico entre as selenoproteínas, o que significa que em situações de depleção de selênio, as enzimas com posição inferior no *ranking* tendem a receber menos selênio e, portanto, sofrerão redução de suas concentrações mais precocemente. A região 3' não traduzida (3'UTR) dos genes que codificam as GPX parece ser importante na determinação do *ranking* dessas proteínas, sendo que a GPX1 torna-se muito sensível à depleção de selênio, estando em uma posição inferior no *ranking* em relação a GPX4⁶⁷.

Figura 6 - Biossíntese das selenoproteínas: selenoproteínas são formadas pela incorporação de uma selenoscisteína (Sec) durante a tradução da proteína. O local de incorporação da Sec é codificado como UGA, que é geralmente traduzido como *stop* códon. Portanto, para a incorporação da Sec é utilizado um ácido ribonucleico (RNA) transportador específico que é primeiramente ligado à serina e sofre transformações pelas enzimas Sec sintase e selenofosfato sintase do tipo 2 (SPS2) para formar o seleno cisteil RNA transportador (tRNA ((Ser)sec). Uma estrutura em forma de alça na região 3'terminal do RNA mensageiro chamada sequência de inserção da Sec (SECIS), recruta o tRNA(Ser)Sec por meio de um complexo de proteínas EFsec (fator de alongamento da Sec), SBP2 (proteína de ligação da Sec), SECp43 (proteína associada ao tRNA selenocisteína) e Ribossomo L30. A estabilidade desse complexo proteico de inserção é dependente da disponibilidade de selênio e do tipo de glutathione peroxidase, sendo essa reação que ocorre na região 3'terminal determinante na hierarquização das proteínas. Uma das vias de regulação seria por meio do fator de iniciação eucariótico 4a3 (EIF4a3) sensível a disponibilidade de selênio. Adaptado de Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases [FONTE: Brigelius-Flohé e Maiorino⁶⁷]

A GPX4 está presente na forma citosólica em praticamente todas as células e é capaz de reduzir tanto H₂O₂ quando hidroperóxidos aderidos a moléculas lipídicas, agindo portanto em membranas celulares. Ela pode utilizar-se de grupos tiol, além da GSH, como substrato redutor. A GPX4 é expressa, ainda, na mitocôndria e no núcleo dos espermatozoides, estando esta última forma restrita, obviamente, aos testículos⁶⁷. O silenciamento sistêmico do gene da *GPX4* é o único dentre todos os silenciamentos

de GPX que é incompatível com a vida, o que sugere que esta enzima não tenha apenas função antioxidante, mas ações essenciais para a vida, como, por exemplo, ação em membranas contrabalançando a via da lipoxigenase. A redução nas taxas de peroxidação de lipídios de membrana pode estar associada a maior sobrevivência neuronal; uma diminuição da atividade da GPX4 em camundongos levou a maior incidência de Doença de Alzheimer⁶⁷, enquanto sua superexpressão diminuiu a lesão neuronal induzida por β amiloide⁶⁸.

Conforme mencionado anteriormente, a retina é um tecido altamente suscetível ao estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. Estudo em roedores mostrou que a superexpressão de GPX4 reduziu lesão de células neuronais da camada externa da retina (fotorreceptores) e do epitélio pigmentar retiniano quando expostos ao estresse oxidativo⁶⁹. Além disso, descreveu-se a presença de altas concentrações de glutamato no vítreo de pacientes com glaucoma e com RDP, e o excesso desta substância extracelular pode induzir ao estresse oxidativo. Uma via proposta para explicar esse estresse oxidativo é a depleção de GSH, devido à competição no transporte de cisteína para o meio intracelular, culminando com peroxidação lipídica⁷⁰. Estudo com células neuro-retinianas de rato mostrou que aqueles animais com expressão reduzida de GPX4 tiveram maior acúmulo de lipídios peroxidados e aumento da toxicidade induzida pelo glutamato⁷⁰.

Já é conhecido na literatura que existem diferenças nas concentrações e nas ações da GPX4 entre o sexo feminino e masculino, com maiores concentrações nas mulheres e maior atividade nos homens, o que pode justificar diferenças clínicas encontradas entre os sexos⁷¹.

1.4.2 O sistema tioredoxina

O sistema tioredoxina é composto pela tioredoxina (TXN), pelas tioredoxinas redutases (TXNRD1 e TXNRD2) e pelo NADPH, que exerce um papel importante na manutenção do estado redox intracelular. Os sistemas TXN e GSH são considerados os dois principais sistemas anti-oxidantes redutores de tiol e ambos têm expressão ubíqua⁷².

O sistema TXN é responsável pela redução de grupos cisteína oxidados em proteínas, por meio da interação com o centro redox ativo da TXN. A TXN oxidada é reduzida com ajuda de TXNRDs e NADPH (Figura 7). É sabido que a TXN realiza a maior parte de sua função anti-oxidante por meio de peroxirredoxinas, também chamadas de tioredoxinas peroxidases⁷². Alterações deste sistema estão implicadas em diversas condições patológicas, entre elas as complicações do DM⁷³.

A TXN tem sua atividade anti-oxidante reduzida pela proteína de interação com a TXN (TXNIP), um antagonista endógeno da TXN que, sob condições hiperglicemiantes, tem sua transcrição aumentada e está envolvido na gênese da RD em ratos. Isso se dá por meio da indução de genes pró-inflamatórios e pró-apoptóticos, sendo que o bloqueio da TXNIP ameniza a lesão retiniana^{74,75}. A TXNIP também é vista como uma das responsáveis pelo fenômeno de memória metabólica, promovendo alterações epigenéticas na região promotora do gene que codifica a cicloxigenase do tipo 2²⁰.

Figura 7 - Sistema tiorredoxina. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; TXNiP: proteína de interação com a tiorredoxina [FONTE: Adaptado de Nordberg e Arnér⁷²]

1.4.3 O sistema NADPH oxidase

As NADPH oxidases são proteínas que transferem elétrons através de membranas e catalizam a redução de O_2 a O_2^- dependente de NADPH, gerando ROS. A proteína NOX2 é o protótipo das NADPH oxidases; ela é responsável pelo *respiratory burst*, que é a produção aumentada de ROS pelos fagócitos após rápido consumo de oxigênio. Essas ROS participam diretamente da defesa do hospedeiro contra microorganismos. Existem, no entanto, outras isoformas de NOX amplamente distribuídas nos tecidos que participam de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos⁷⁶.

O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático. No caso da NOX2, é composto de dois componentes de membrana (subunidade catalítica NOX2 [ou gp91phox] e a subunidade regulatória [p22phox] que formam um heterodímero e se estabilizam mutuamente), três componentes citosólicos (p40phox, p47phox e p67phox) e um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac2). Para que a ativação da NOX2 ocorra, há a necessidade da translocação dos fatores citosólicos para o

complexo que está na membrana. Concomitantemente, Rac se dissocia de um inibidor e é ativado pela troca de guanosina di-fosfato (GDP) por guanosina tri-fosfato (GTP) para que ocorra a ativação enzimática e produção de O_2^- após a transferência de elétron do NADPH para a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, a seguir para o oxigênio molecular (Figura 8).

Além de estar presente nos fagócitos, a NOX2 também é expressa em neurônios, cardiomiócitos, endotélio, músculo esquelético, músculo liso e hepatócitos. Ela é codificada pelo gene *CYBB* e é instável na ausência da subunidade p22phox, que é codificada pelo gene *CYBA*⁷⁶.

Os pericitos expressam NOX e acredita-se que o sistema NADPH oxidase esteja envolvido na apoptose dessas células que ocorre na RD⁷⁶. Camundongos *knockout* para NOX2 ou que sofreram inibição da atividade da NADPH oxidase apresentaram uma menor expressão da ICAM1 e de adesão leucocitária na retina, com manutenção da barreira hemato-retiniana, além de menor produção de ROS⁷⁷.

Figura 8 - Sistema NADPH oxidase em fagócitos com as subunidades de membrana (NOX2 e p22phox), os componentes citosólicos (p40phox, p47phox e p67phox) e um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac) [FONTE: Adaptado de Bedard *et al.*⁷⁶]

1.5 Justificativa

Algo intrigante é o fato de que pessoas com controle glicêmico semelhante podem ter desfechos microvasculares diferentes. A identificação de marcadores genéticos para o desenvolvimento das complicações pode ajudar a definir que pacientes necessitam de um controle glicêmico mais (ou menos) rigoroso, a depender da identificação de pacientes com risco aumentado (ou reduzido) de complicações. Outro resultado prático poderia ser a individualização da frequência do rastreamento, reduzindo o custo tanto psicológico quanto financeiro do atendimento médico. Estudos de genes candidatos contribuem para melhor compreensão da patogênese das complicações, abrindo caminhos para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas para prevenção e tratamento das mesmas.

1.6 Escolha dos polimorfismos

Quatro dos cinco polimorfismos foram selecionados por terem sido associados a DRD em populações de portadores de DM1 (em negrito no Quadro 2)⁷⁸⁻⁸⁰, dessa forma seria interessante avaliar se essas variantes genéticas também influenciariam o risco de outras complicações relacionadas ao DM, como a RD. Já o gene que codifica a proteína TXNIP foi escolhido por estar implicado na etiopatogenia das complicações crônicas, inclusive a RD⁸¹. O SNP selecionado já havia sido estudado em uma população brasileira e se mostrado significativamente polimórfico, juntamente com outros três dentre nove SNPs representativos da variação genética no *TXNIP*⁸².

Os SNPs selecionados estão localizados em regiões potencialmente regulatórias da expressão gênica; alguns já se demonstraram funcionais e associados a outras condições clínicas.

Quadro 2 -Polimorfismos de um único nucleotídeo que foram avaliados no presente estudo

Gene	Proteína	Polimorfismo	Posição
<i>GPX4</i>	Glutathione peroxidase 4	rs713041	+718C/T
<i>GCLC</i>	Subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase	rs17883901	-129 C/T
<i>CYBB</i>	NADPH oxidase 2	rs6610650	-2810 A/G
<i>CYBA</i>	Subunidade p22phox	Não registrado	-675 T/A
<i>TXNIP</i>	Proteína de interação com a tioredoxina	rs7211	+402 T/C

1.6.1 *GPX4*

O SNP rs713041 (+718C/T) está localizado na região 3'UTR do gene *GPX4*, situado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3) e seu papel funcional na síntese da proteína GPX4 já foi demonstrado, assim como sua participação na susceptibilidade a diversas condições clínicas⁸³. Um estudo na população russa mostrou uma maior prevalência de acidente vascular cerebral (AVC) em pacientes hipertensos portadores do alelo C⁸⁴ deste SNP. Nas complicações do DM, em estudo recente, foi demonstrado o papel nefroprotetor do alelo T na população masculina com DM1⁷⁸.

1.6.2 *GCLC*

O polimorfismo rs17883901 (-129C/T) está localizado na região promotora do gene *GCLC*, situado no braço curto do cromossomo 6 (6p12). Esse gene codifica a subunidade catalítica da γ GCS, enzima limitante na formação da GSH e que tem sua transcrição aumentada na presença de ROS. Estudos funcionais demonstraram que o alelo T está associado a uma transcrição diminuída do *GCLC* em resposta a H_2O_2 ⁸⁵ em comparação ao alelo C; esse mesmo alelo foi associado a maior risco de infarto agudo do miocárdio tanto em população japonesa quanto italiana^{85,86}.

Um estudo o mostrou que em um universo de 401 pacientes portadores de DM1 com mais de 10 anos de diagnóstico e controle glicêmico inadequado, a presença de pelo menos um alelo T conferiu risco para uma menor taxa de filtração glomerular estimada (TFGe)⁸⁰. Também em população com DM1, foi demonstrado que a presença do alelo T associou-se a maiores títulos de anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e a uma idade mais precoce de diagnóstico de DM1⁸⁷.

1.6.3 *CYBB*

O polimorfismo rs6610650 (-2810 A/G) está localizado na região promotora do gene *CYBB*, situado no braço curto do cromossomo X (Xp21.1) Esse SNP está em desequilíbrio de ligação com um microssatélite dinucleotídeo TA que modula a atividade da região promotora de *CYBB*)⁸⁸. A presença do alelo A em uma casuística de 451 pacientes com DM1 avaliada por nosso grupo foi associada a uma menor TFGe na população feminina. No mesmo estudo, o alelo A também se associou à presença de DRD estabelecida/avançada em mulheres francesas com DM1⁷⁸.

1.6.4 *CYBA*

O polimorfismo -675 A/T (não registrado) está localizado na região promotora (88718096) do gene *CYBA*, situado no braço longo do cromossomo 16 (16q24). O genótipo TT foi associado a maior risco de HAS essencial, aumento da espessura da camada íntima da artéria carótida, maior atividade da NADPH oxidase fagocítica e maior PA sistólica em uma população espanhola⁸⁹. Na nossa população de pacientes com DM1, a presença deste alelo conferiu risco para a presença de DRD⁸⁰.

1.6.5 *TXNIP*

O polimorfismo rs7211 (-1365 C/T) está localizado na região promotora do gene *TXNIP*, situado no braço longo do cromossomo 1 (1q21.1). Foi demonstrado que a presença do haplótipo rs7211T/ rs7212G conferiu maior risco de DM na população estudada, bem como maior concentração de insulina nas crianças carreadoras deste haplótipo. Fez-se a hipótese de que a presença deste haplótipo aumentaria a expressão de *TXNIP*, diminuindo a captação periférica da glicose e assim, aumentando as concentrações de glicose e de insulina circulante⁸².

Um estudo recente associou a magnitude da expressão de *TXNIP* em células do sedimento urinário de pacientes com DM1 com o declínio da TFG⁹⁰ e um estudo publicado em 2016 não encontrou associação entre o SNP rs7211 e o risco de DR em pacientes com DM tipo 2 eslovenos⁹¹.

2 OBJETIVOS

Caracterizar uma população de pacientes portadores de DM1 quanto ao grau de RD e avaliar a associação desta complicação microvascular com a frequência dos SNPs selecionados em genes que codificam proteínas de vias pró-oxidantes e antioxidantes endógenas.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Pacientes em seguimento no Ambulatório de DM1 da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com diagnóstico de DM1 há pelo menos cinco anos foram convidados a participar do estudo. Pacientes em seguimento no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com diagnóstico de DM1 há pelo menos cinco anos, DNA previamente coletado e armazenado no banco de DNA do Laboratório de Investigação Médica (LIM)-25 e fundoscopia indireta feita no período do estudo foram incluídos no projeto.

O DM1 foi definido como deficiência absoluta de secreção de insulina devida à destruição das células beta pancreáticas acompanhada ou não da presença de auto-anticorpos, tais como anticorpo anti-insulina, anti-GAD e anti-tirosina fosfatase. Pacientes com história de cetoacidose ao diagnóstico ou início precoce de insulinização plena com peptídeo-C indetectável também foram considerados DM1. Os critérios de exclusão foram: pacientes com diagnóstico de outros tipos de DM, que não DM1, e pacientes com DM1 com menos de cinco anos de diagnóstico ou que não possuísem dados clínicos e laboratoriais completos, avaliação do grau de RD ou DNA coletado.

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos A e B), os pacientes seguidos no Ambulatório de Diabetes do Serviço de

Endocrinologia do HC-FMUSP tiveram a avaliação da retina realizada no ambulatório, além da coleta de sangue para extração de DNA. O delineamento do estudo está sumarizado na Figura 9.

Figura 9 - Delineamento do estudo. A coleta de sangue para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) somente foi realizada naqueles pacientes que não possuíam amostra de DNA no biorrepositório (Banco de DNA). TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

3.2 Dados clínicos

Os seguintes dados clínicos foram coletados por meio da análise de prontuário ou questionário: idade atual, idade ao diagnóstico, história de gestação, diagnóstico de HAS (PA maior que 140 x 90 mmHg em, pelo menos, três medidas em posição sentada, ou uso de medicação antihipertensiva), tabagismo e dislipidemia (definida como uso de estatinas e/ou colesterol LDL superior a 100 mg/dL, meta previamente proposta para os pacientes com DM1 sem doença cardiovascular estabelecida)⁹².

Também foi registrada a utilização de inibidores da enzima conversora da

angiotensina (IECA), de inibidores do receptor da angiotensina II (BRA) e de estatinas.

Dados do exame físico como peso e estatura para o cálculo do IMC foram obtidos do prontuário eletrônico (Prontmed) dos HC-FMUSP.

A circunferência abdominal foi medida em centímetros com auxílio de fita métrica, no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela.

Os pacientes seguidos no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médica da UNICAMP tiveram os dados clínicos e oftalmológicos fornecidos no momento da incorporação do DNA ao Banco de DNA armazenado no LIM25, sob a responsabilidade da Profa. Maria Lucia Cardillo Correa Giannella.

3.3 Avaliação da neuropatia periférica

A avaliação da NP foi realizada por uma única médica, com base na soma das classificações obtidas no Escore de Sintomas Neuropáticos (*Neuropathy Symptoms Score*) modificado e no Escore de Comprometimento Neuropático (*Neuropathy Disability Score*) modificado e simplificado. Esta ferramenta diagnóstica já foi traduzida e validada para o português. Para diagnóstico de NP faz-se necessário uma das seguintes condições: presença de sinais moderados ou graves (com ou sem sintomas) ou presença de sinais leves com sintomas moderados ou graves⁹³.

3.4 Avaliação da neuropatia autonômica cardiovascular

O diagnóstico de NAC foi baseado em uma série de exames que avaliam as funções simpática (frequência cardíaca de repouso, relação expiração: inspiração, relação 30:15, manobra de Valsalva, avaliação da análise espectral) e parassimpática (avaliação da variabilidade da frequência cardíaca na análise espectral, avaliação da PA em ortostase). Para análise destes resultados, foi utilizado o programa Poly-Spectrum, versão 4.8.143 Neurosoft. O diagnóstico de NAC foi definido na presença de três testes alterados ou presença de hipotensão postural⁹⁴.

3.5 Avaliação laboratorial

Os dados laboratoriais foram coletados do *site* HCMED, considerando os exames mais próximos à avaliação da NP ou da RD. Em particular para a HbA1c, foi considerada a média aritmética dos três últimos exames, de preferência em semestres diferentes.

Os métodos de análise utilizados foram: enzimático hexocinase para glicemia de jejum, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para HbA1c; enzimático colorimétrico automatizado para colesterol total, colesterol HDL e triglicérides, cinético automatizado para colesterol LDL e colorimétrico automatizado para a creatinina plasmática.

A avaliação da TFGe foi realizada pela fórmula de CKD-EPI (www.kidney.org).

A avaliação da excreção de albumina urinária foi realizada por meio de coleta de amostra isolada ou de urina de 24 horas, com o uso da metodologia da nefrolometria.

3.6 Avaliação da doença renal diabética

A razão albumina creatinina urinária (ACR) e a TFGe foram utilizadas para definir os estágios de DRD: ausência de DRD (ACR <30 mg/g e TFGe ≥ 60 mL/min/1,73 m²), DRD incipiente (ACR entre 30 e 300 mg/g creatinina (A2), confirmado em duas amostras e TFGe ≥ 60 mL/min/1,73 m²) ou DRD franca (ACR >300 mg/g de creatinina [A3] e/ou TFGe < 60 mL/min/1,73 m², desde que excluídas outra causa de doença renal) ou história de transplante renal.

3.7 Avaliação da retina

A retina dos pacientes acompanhados no HC-FMUSP foi avaliada após a realização de fotos monoscópicas feitas com uso do retinógrafo TRC-NW8, com campo de visão de 45 graus munido de câmera Nikon de 16.2 megapixels, com o uso do sistema de aquisição de imagem IMAGeNet 1.53 1024, após dilatação da pupila com colírio de tropicamida (10 mg/mL). Foram fotografados sete planos, conforme mostrado na Figura 10, de acordo com os padrões internacionais definidos no estudo ETDRS. Pela dificuldade técnica na execução das fotos estereoscópicas (padrão ouro), foi optado pela utilização de foto única, que apresenta reprodutibilidade quase perfeita na graduação da RD⁹⁵. As imagens foram laudadas conforme a Classificação internacional de retinopatia diabética e edema macular⁹⁶ (Quadro 3) em: ausência de RD (ARD), RDNP leve, RDNP moderada, RDNP grave, RDP e avaliação impossível de ser realizada. No grupo RDP foram incluídos os pacientes que haviam feito panfotocoagulação para tratamento de RDP, mas no momento estavam com a doença controlada, além de pacientes que, apesar das imagens serem classificadas como “impossível”, apresentavam registro no prontuário de história e exame clínico

compatível com RDP. O método não é o ideal para avaliação de edema macular (EM), já que as imagens não são estereoscópicas, portanto os pacientes foram classificados conforme a suspeita em: aparentemente presente (EMP) ou aparentemente ausente (EMA) seguindo a Classificação internacional de retinopatia diabética e edema macular (Quadro 4)⁹⁶. As imagens da retina foram avaliadas com o uso de recursos de telemedicina, por uma mesma oftalmologista treinada e capacitada para avaliação de retina. Imagens das principais lesões presentes na RD visualizadas na retinografia estão exemplificadas na Figura 11.

Os pacientes seguidos no Ambulatório da UNICAMP, tiveram a retina avaliada por oftalmoscopia binocular indireta com biomicroscopia de fundo por um único oftalmologista, treinado e capacitado na avaliação de retina. O método apresenta boa correlação imagens digitais⁹⁷. A graduação foi dada conforme a Classificação internacional de retinopatia diabética e edema macular.

O olho afetado com maior grau de RD foi considerado para a classificação da RD. Para as análises, os pacientes foram agrupados em: ARD, RDNP (RDNP leve, RDNP moderada e RDNP grave) e RDP.

Figura 10 - Campos fotografados com o retinógrafo. Exemplo para o olho direito. Disco ótico-1, mácula-2, lateral temporal a mácula-3, súpero-nasal-6 e temporal-4 ao disco óptico e infero-temporal-5 e nasal-7 ao disco óptico [FONTE: Adaptado de Grading diabetic...⁹⁸ e Wong⁹⁹]

Quadro 3 - Classificação internacional de retinopatia diabética (RD)

Classificação	Descrição
RDNP Leve	Apenas Microaneurismas
RDNP Moderada	Mais que apenas microaneurismas, mas menos que RDNP Grave
RDNP Grave	Sem sinais de RDP, com qualquer dos achados abaixo: <ul style="list-style-type: none"> - Mais de 20 hemorragias intra-retinianas em cada um dos 4 quadrantes - “Ensalsichamento” venoso em pelo menos 2 quadrantes - Anormalidades microvasculares intra-retinianas (IRMAs) em pelos menos 1 quadrante
RDP	Qualquer dos achados abaixo: <ul style="list-style-type: none"> - Neovascularização - Hemorragia vítrea ou pré-retiniana

RDNP: Retinopatia diabética não proliferativa, RDP: Retinopatia diabética proliferativa.

Quadro 4 - Classificação internacional de edema macular (EM)

Classificação	Descrição
Edema macular aparentemente ausente (EMA)	Ausência de edema e exsudatos duros no polo posterior
Edema macular aparentemente presente (EMP)	Sinais sugestivos de edema e presença de exsudatos duros no polo posterior

Figura 11 - Lesões presentes na Retinopatia diabética A) Retinopatia diabética proliferativa: neovasos de retina (NV), exsudatos algodinosos (EA), hemorragias retinianas (HE), microaneurismas/microhemorragias (MA/MH). B) Cicatriz de fotocoagulação a laser (FC). C) Edema macular aparentemente presente: exsudatos duros (ED) próximos à mácula

3.8 Extração de DNA

Foram coletados 15 mL de sangue periférico de cada um dos pacientes para extração de DNA genômico de leucócitos, que foi realizada pelo método de *salting out*⁷⁰. O *pellet* final de DNA foi ressuspendido em 50 µL a 200 µL de água miliQ estéril e incubado a 37° C durante 15 minutos. O DNA assim obtido foi armazenado a temperatura de -20°C até sua posterior utilização para a genotipagem.

3.9 Genotipagem

Reações em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real foram realizadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), para detecção das variantes alélicas de cada SNP. Para preparação da PCR, foram utilizados: *TaqMan Genotyping Master Mix* (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs, referência passiva e mistura de componentes otimizados) e *TaqMan SNP Genotyping Assays* (contendo duas sequências de *primers* específicos para amplificar o polimorfismo de interesse e duas sondas alelo-específicas TaqMan MGB, para detectar os alelos do polimorfismo de interesse) (Applied Biosystems, CA, EUA). A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem das duas possíveis variantes do SNP: a sonda do alelo 1 é marcada com o Reporter VIC, e a sonda do alelo 2 é marcada com o Reporter FAM, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação. Os números de identificação dos ensaios para os SNPs estudados são: C__29975415_10 (rs6610650), C__2561693_20 (rs713041), C__8703952_1 (rs7211) e C__58724537_10 (rs17883901). Para o SNP -675 A/T (sem número de identificação) no gene *CYBA*, não havia ensaios inventoriados, tendo sido usados os

seguintes *primers*: *sense* 5'-GCGCTGGCTCACCAC-3' e *antisense*: 5'-ACTGGGAAAGCACAGAATGCA-3' e as seguintes sondas fluorescentes (VIC: 5'-CCTCCCGAACC- CAGG-3' e FAM: 5'-CCTCCCGTACCCAGG-3'), todos sintetizados pela Applied Biosystems.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), exceto quando especificado de outra maneira. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA e teste de chi-quadrado de Pearson. Após a genotipagem, a análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada em todos os grupos estudados ao nível de significância de 0,05 e SNPs que falharam neste teste não foram utilizados nas análises de associação com a RD. A associação dos SNPs com a RD foi realizada por modelos de regressão. Para as análises transversais, foi utilizado o modelo de regressão logística nominal politômica, tendo como categoria de referência a ARD ou dicotômica tendo como categoria de referência ausência de RDP (ARD + RDNP), ou somente ARD. Os resultados foram expressos em *odds ratio* (OR) para cada estágios de RD (RDNP e RDP) *versus* ARD, RDP *versus* ausência de RDP (RDNP + ARD) ou RD (RDNP+RDP) *versus* ARD, juntamente com seus respectivos IC de 95%. O modelo utilizado foi o dominante.

Quando estratificado por sexo, o cálculo dos efeitos estatísticos para homens e mulheres foi feito separadamente e ajustado para outras variáveis. Ajustes para variáveis clínicas e biológicas foram realizados mediante a inclusão dessas variáveis como co-variáveis no modelo de regressão. Os dados que apresentaram rejeição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk W foram logaritmizados para as análises. A

correção para múltiplas comparações devido aos múltiplos SNPs testados foi feita pela correção de Bonferroni, já que os polimorfismos se encontravam em genes diferentes. Desta forma, foi considerado significativo $p < 0,02$ para as análises. O programa JMP 9.0 (SAS Institute, Cary, NC) foi utilizado para a análise dos dados.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas

Entre os anos de 2012 e 2016 foram incluídos no estudo 341 pacientes, dos quais 289 em seguimento no Ambulatório da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP e 52 em seguimento no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Os pacientes foram categorizados conforme a Classificação internacional de RD em: ARD (n=96), RDNP leve (n=123), RDNP moderada (n=10), RDNP grave (n=11) e RDP (n=101) (Figura 12). No grupo RDP estão incluídos 15 pacientes que não puderam ser avaliados pelas imagens da retinografia ou pela fundoscopia indireta, mas que tinham história clínica ou dados do prontuário que confirmavam o diagnóstico de RDP.

Os pacientes foram agrupados em ARD, RDNP (RDNP leve, RDNP moderada e RDNP grave) e RDP para a realização das análises.

Figura 12 - Pacientes incluídos no estudo de acordo com o grau de retinopatia diabética (RD). ARD: ausência de RD; RDNPL, RDNPM, RDNPG: respectivamente, retinopatia diabética não proliferativa leve, moderada, grave; RDP: retinopatia diabética proliferativa

As mulheres representam 62% da população, que tem uma média de idade de 35 (± 11) anos, idade ao diagnóstico de 13 (± 9) anos, com 22 (± 9) anos de duração do DM e HbA1c média de 8,6% ($\pm 1,6$); 38% dos pacientes apresentavam HAS, 65% eram dislipidêmicos, 38% estavam em uso de estatina no momento da coleta dos dados e 40% estavam em uso de IECA ou BRA.

A maioria dos pacientes foi avaliada quanto à presença das outras complicações microvasculares: 39% dos 302 pacientes avaliados quanto à NP apresentavam essa complicação, 28% dos 293 pacientes avaliados quanto à NAC apresentavam essa complicação estabelecida e 24% dos 338 pacientes avaliados quanto a função renal apresentavam DRD.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com a classificação da RD estão mostradas na Tabela 1. Os pacientes com

ARD eram mais novos e tinham menos tempo de DM que aqueles com RDNP e RDP; os pacientes com RDNP tinham menos tempo de DM que os com RDP. A TFGe foi inferior nos pacientes com RDP em relação aos pacientes com ARD e RDNP, sem diferenças entre os grupos ARD e RDNP. Houve, ainda, diferenças significantes entre os grupos na distribuição de sexo (a relação entre sexo feminino/masculino foi mais baixa entre os pacientes com RDP). As frequências de HAS, de dislipidemia, de uso de IECA e de estatinas, bem como das demais complicações microvasculares avaliadas aumentaram com a gravidade da RD. Não houve diferença entre os três grupos na idade ao diagnóstico e nos valores de HbA1C, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicérides, IMC, dose de insulina, CA e uso de BRA.

O paciente diagnosticado com RDP apresentou uma maior chance de apresentar simultaneamente as outras complicações crônicas avaliadas:

- DRD: OR de 7,1; IC 95%: 3,18 a 18,9; $p=0,0001$
- NP: OR de 3,94; IC: 95%: 2,14 a 7,7; $p=0,0001$
- NAC: OR de 3,6; IC 95%: 1,9 a 7,8; $p=0,0001$

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes de acordo com a classificação da retinopatia diabética (RD)

	Ausência de RD	RD não proliferativa	RD proliferativa	<i>p</i>
N	96 (28%)	144 (42%)	101 (30%)	
Idade (anos)	32 ± 12	35 ± 11 ^a	37 ± 10 ^a	0,0002
Sexo: F/M (%)	66 / 34	67/33	51/49	0,037
Idade/diagnóstico (anos)	14 ± 10	13 ± 9	11 ± 7	0,0944
Tempo de DM (anos)	18 ± 8	22 ± 8 ^a	26 ± 9 ^{a,b}	<0,001
HAS (%)	20	33	62	<0,001
Dislipidemia (%)	57	62	75	0,02
Gestação	20	40	22	0,0116
IMC (kg/m²)	24 ± 3	26 ± 5	25 ± 8	0,16
CA (cm)	85 ± 11	90 ± 14	87 ± 14	0,14
DTI (ui/kg)	0,68 ± 0,28	0,68 ± 0,28	0,64 ± 0,29	0,59
IECA (%)	20	28	45	0,003
BRA (%)	4	10	13	0,09
Estatinas (%)	31	35	48	0,05
HDL (mg/dL)	61 ± 17	60 ± 18	58 ± 18	0,46
LDL (mg/dL)	93 ± 23	99 ± 31	99 ± 34	0,17
Triglicérides (mg/dL)	86 ± 54	96 ± 54	103 ± 71	0,22
HbA1c (%)	8,4 ± 1,37	8,63 ± 1,59	8,63 ± 1,69	0,55
TFGe (mL/min/1,73 m²)	105 ± 24	96 ± 28	63 ± 37 ^{a,b}	<0,0001
Albuminúria (A2/A3) %	11/3	9/7	24/36	<0,0001
DRD (%)	6	13	57	<0,0001
Neuropatia Periférica (%)	18	33	65	<0,0001
NAC (%)	13	25	50	<0,0001
Edema Macular (%)	0	14	54	<0,0001

Resultados expressos como média ± DP. Análise estatística das variáveis realizadas com ANOVA utilizando dados logaritmizados. Variáveis com diferença estatística foram submetidas ao pós-teste de Tukey-Kramer-HSD: diferença significativa entre pacientes com ausência de retinopatia (a), retinopatia diabética não proliferativa (b). HAS (hipertensão arterial sistêmica): pressão arterial sistólica >140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica >90 mmHg ou uso de medicamento anti-hipertensivos e história de hipertensão. Dislipidemia: LDL >100 mg/dL e/ou uso de estatinas. IMC: índice de massa corpórea. CA: circunferência abdominal. DTI: dose total de insulina diária. IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina. BRA: bloqueador do receptor de angiotensina. TFGe: taxa de filtração glomerular estimada pelo CKD EPI. A2: albuminúria de 30 a 300 mg/g creatinina; A3: albuminúria > 300 mg/g creatinina; DRD (doença renal diabética): TFGe < 60 ml/min/1,73m² e/ou A3. NAC: neuropatia autonômica cardiovascular. Edema Macular: suspeita de edema macular. *p* ≤ 0,05 foi considerado significante.

4.2 Associação dos polimorfismos de um único nucleotídeo com a retinopatia

Após a genotipagem, os SNPs foram avaliados quanto ao EHW e somente aqueles cuja distribuição dos genótipos respeitou esse equilíbrio foram analisados quanto a sua associação com a RD.

4.2.1 rs713041 no *GPX4*

A distribuição dos genótipos deste SNP respeitou o EHW. A análise da frequência deste SNP (+718C/T) não evidenciou associações significantes com a RD na população global (Tabela 2). Após a estratificação por sexo e ajuste pelas variáveis de confusão, a presença do alelo T conferiu proteção nominal contra a RDP nas mulheres, com um OR de 0,42 (IC 95%: 0,17 a 1,00; $p=0,05$) (Tabela 3).

Análises dicotômicas foram realizadas: RDP *versus* ausência de RDP (RDNP+ARD). Novamente na população feminina, a presença do alelo T aparece inversamente relacionada a RDP, com um OR de 0,36 (IC 95%: 0,17 a 0,75; $p=0,007$). Não houve diferença significativa entre os pacientes com RD (RDNP + RDP) *versus* ARD (OR de 0,90; IC 95%: 0,45 a 1,77; $p=0,76$).

Tabela 2 - Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene *GPX4* de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global

	ARD	RDNP	RDP	OR (IC 95%) para RDNP	<i>p</i>	OR (IC 95%) para RDP	<i>p</i>
				0,95 (0,51-1,76)	0,88	0,62 (0,31-1,24)	0,18
CC	0,302	0,303	0,380				
CT	0,521	0,486	0,490				
TT	0,177	0,211	0,130				
MAF	0,437	0,454	0,375				

OR (*odds ratio*) e intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, hipertensão arterial sistêmica, HbA1c e gestação. Referência ARD (ausência de retinopatia diabética). RDNP: retinopatia diabética não-proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa, MAF: frequência do alelo raro. $p \leq 0,02$ foi considerado significativo.

Tabela 3 - Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene *GPX4* de acordo com o grau de retinopatia diabética na população estratificada por sexo

	ARD	RDNP	RDP	OR (IC 95%) para RDNP	<i>p</i>	OR (IC 95%) para RDP	<i>p</i>
Mulheres				1,30 (0,62-2,74)	0,48	0,42 (0,17-1,00)	0,05
CC	0,333	0,287	0,530				
CT	0,508	0,500	0,333				
TT	0,159	0,213	0,137				
MAF	0,413	0,463	0,304				
Homens				0,46 (0,13-1,56)	0,21	0,90 (0,23-3,56)	0,88
CC	0,242	0,333	0,224				
CT	0,546	0,459	0,654				
TT	0,212	0,208	0,122				
MAF	0,485	0,437	0,449				

OR (*odds ratio*) e intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para idade, tempo de DM, índice de massa corpórea, hipertensão arterial sistêmica, HbA1c e gestação. Referência ARD: ausência de retinopatia diabética; RDNP: retinopatia diabética não proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa, MAF: frequência do alelo raro. $p \leq 0,02$ foi considerado significante.

4.2.2 rs17883901 no *GCLC*

A análise do polimorfismo rs17883901 (-129 C/T) no gene *GCLC* na população global evidenciou que o alelo T conferiu risco nominal para RDNP (OR de 2,72; IC 95%: 0,98 a 7,59; $p=0,05$) e risco significativo para RDP (OR de 4,23; IC 95%: 1,38 a 12,93; $p=0,01$) (Tabela 4).

Em uma análise dicotômica de ARD *versus* (RDNP+RDP), a presença do alelo T conferiu risco para a presença de qualquer grau de RD (OR de 3,07; IC 95%: 1,22-8,95; $p=0,02$). Não houve diferença significativa na análise dicotômica que comparou a frequência deste SNP em pacientes com RDP *versus* pacientes sem RDP (RDNP + ARD; OR de 2,03; IC 95%: 0,91 a 4,45; $p=0,08$).

Tabela 4 - Frequência genotípica do polimorfismo rs17883901 no gene *GCLC* de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global

	ARD	RDNP	RDP	OR (IC 95%) para RDNP	<i>p</i>	OR (IC 95%) para RDP	<i>p</i>
				2,72 (0,98-7,59)	0,05	4,23(1,38-12,93)	0,01
CC	0,927	0,874	0,842				
CT	0,063	0,126	0,148				
TT	0,010	0	0,010				
MAF	0,042	0,063	0,084				

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, hipertensão arterial sistêmica, HbA1c e gestação. Referência ARD (ausência de retinopatia diabética). RDNP: retinopatia diabética não- proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa, MAF: frequência do alelo raro. $p \leq 0,02$ foi considerado significativo.

4.2.3 rs6610650 no *CYBB*

A análise do polimorfismo rs6610650 no *CYBB* somente pôde ser feita para o sexo feminino, pois como homens são hemizigotos para o cromossoma X, o EHW não pode ser avaliado no sexo masculino.

A análise do polimorfismo na população do sexo feminino não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 5). Na análise dicotômica que considerou RDP *versus* ARD+RDNP, também não foi encontrada diferença significativa.

Tabela 5 - Frequência genotípica do polimorfismo rs6610650 no *CYBB* de acordo com o grau de retinopatia diabética na população global

	ARD	RDNP	RDP	OR (IC 95%) para RDNP	<i>p</i>	OR (IC 95%) para RDP	<i>p</i>
				1,00 (0,50-2,0)	0,98	1,62 (0,68-3,82)	0,27
GG	0,452	0,484	0,635				
GA	0,467	0,452	0,250				
AA	0,081	0,064	0,115				
MAF	0,314	0,290	0,240				

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, hipertensão arterial sistêmica, HbA1c e gestação. Referência ARD (ausência de retinopatia diabética). RDNP: retinopatia diabética não- proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa, MAF: frequência do alelo raro. $p \leq 0,02$ foi considerado significativo.

4.2.4 rs não registrado no *CYBA*

O polimorfismo não registrado (-675 T/A) não pôde ser analisado, pois a distribuição dos genótipos não respeitou o EHW na população avaliada.

4.2.5 rs 7211 no *TXNIP*

O polimorfismo rs7211 (-1365 C/T) não pôde ser analisado, pois a distribuição dos genótipos não respeitou o EHW na população avaliada.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada uma população de portadores de DM1 com uma média de 22 ± 9 anos de duração da doença e controle glicêmico aquém do ideal (HbA1c média de $8,6 \pm 1,6\%$), o que favorece o aparecimento das complicações crônicas do DM.

O tempo de DM, a frequência de HAS, de uso de IECA e a gestação foram significativamente diferentes entre os grupos. O tempo de DM aumentou conforme a gravidade da RD, o que é esperado, já que o tempo de exposição à hiperglicemia é um forte determinante da RD, conforme reportado em diversos estudos^{17,100,101}. Em relação à HAS, os dados mostram uma prevalência maior nos grupos de maior gravidade da RD, fato que pode ser atribuído à maior prevalência de DRD, especialmente nos pacientes com RDP, que apresentaram menores TFGe e maior frequência de albuminúria A2 e A3. Portanto, é difícil estabelecer uma relação de causa e efeito na participação da HAS na RD em pacientes com DM1, mas é provável que a HAS que se estabelece com a DRD contribua para a progressão da RD. Por ser a droga mais utilizada no tratamento da hipertensão em pacientes com DM, além de ser utilizada no controle da albuminúria, a frequência do uso de IECA diferiu entre os grupos, sendo maior em pacientes com RDP, que também apresentam maior frequência de HAS e albuminúria. A prevalência de gestação também diferiu entre os grupos, sendo aparentemente maior nas mulheres com RDNP. Uma possível explicação para esse achado é que a piora da RD que ocorre durante a gestação pode não ter influência no desfecho no longo prazo, como visto nos pacientes do estudo DCCT²⁸.

Houve diferenças entre os grupos na proporção entre homens e mulheres, com aumento na proporção de homens no grupo de pacientes com RDP. Apesar de discutíveis, existem dados na literatura que atribuem aos homens um maior risco para o desenvolvimento das complicações microvasculares¹⁰². O sexo masculino foi associado a um maior risco de RDP e diálise, especialmente em pacientes com diagnóstico a partir dos 15 anos, em uma coorte finlandesa com 4.416 pacientes¹⁰³. Em uma análise de 8.784 pacientes do sistema de documentação alemã que incluiu crianças, adolescentes e adultos, ser do sexo masculino foi associado a ter qualquer grau de RD¹⁰⁴. Por outro lado, em crianças e adolescentes, já se descreveu uma maior prevalência de RD no sexo feminino^{32,105}.

As frequências das outras complicações microvasculares analisadas, quais sejam, DRD (24% de 338 pacientes), NP (39% de 302 pacientes) e NAC (28% de 293 pacientes) foram inferiores a frequência da RD (72% de 341 pacientes), mostrando que a RD é a complicação microvascular mais comum, o que está de acordo com dados obtidos em outras populações, inclusive nos pacientes seguidos no estudo DDCT/EDIC^{55,106,107}. A alta prevalência de RD em pacientes DM1 não é exclusividade da população deste estudo. Programas de rastreamento no Reino Unido mostraram que 56% dos pacientes com DM1 apresentavam RDNP e 11,2% apresentaram RDP, enquanto na Dinamarca 54,3% dos pacientes com DM1 teriam algum grau de RD. Em um estudo finlandês que incluiu 172 pacientes com idade de 30 ± 3 anos e duração da doença de 23 ± 4 anos, ou seja, características semelhantes à da presente casuística, a prevalência RDNP foi de 59% e a de RDP foi de 35%. Números semelhantes foram descritos em um programa de rastreamento norueguês, no qual 66% e 38% dos pacientes DM1 apresentaram RDNP e RDP, respectivamente^{101,106,108,109}.

Nos pacientes com ARD ou RDNP, as frequências das outras complicações microvasculares foram menores do que 34%, enquanto foram maiores do que 50% nos pacientes com RDP. Esses achados evidenciam que a RDNP se estabelece em um período onde ainda existe a oportunidade de prevenção das demais complicações crônicas microvasculares. Já o paciente com RDP tem uma chance muito grande de já ter outras complicações microvasculares estabelecidas: 3,6 vezes mais chance de ter NAC, quatro vezes mais chance de ter NP e sete vezes mais chance de ter DRD que um paciente sem RDP. Esses dados são semelhantes a dados relatados em estudos realizados em outras populações^{55,57,58,61}.

Sabe-se que os métodos utilizados, no presente estudo, não são ideais para o diagnóstico de EM, mas durante o exame de 20% de 308 pacientes, essa suspeita foi levantada. No exame de 54% dos pacientes com RDP, houve a suspeita de EM, em comparação a 14% dos pacientes com RDNP; esse achado é explicado pela própria fisiopatologia da RDP, na qual existe aumento da produção de VEGF e uma maior chance de manifestações exsudativas¹³.

Existem poucos dados na literatura sobre a prevalência de EM em pacientes com DM1. A proporção de 20% dos pacientes com suspeita de EM na presente casuística é muito semelhante àquela de 23,8% encontrada em um estudo recentemente publicado, que avaliou a prevalência de EM em 819 pacientes com DM1 participantes do WESDR, com duração média de doença de 27,7 anos e HbA1c média de 8,7%¹¹⁰.

Na análise de associação dos SNPs com a RD, os resultados que alcançaram significância estatística foram: a associação inversa do alelo T do SNP rs713041 no gene que codifica a proteína GPX4 com RDP na população do sexo feminino; a

associação entre o alelo T do polimorfismo rs17883901 no gene *GCLC* com RDP e a associação entre o alelo T deste mesmo SNP com a presença de qualquer grau de RD (RDNP + RDP).

A função da proteína GPX4 não é somente tamponar o estresse oxidativo; ela está envolvida no desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos, especialmente de células do sistema nervoso. Na retina, atua na maturação de cones e bastonetes¹¹¹. Além disso, nos homens, ela está relacionada com a fertilidade⁶⁷. Diferenças na concentração e na atividade da GPX4 entre homens e mulheres já foram relatadas, sendo que as mulheres têm maiores concentrações, enquanto homens têm maior atividade desta proteína, o que pode justificar variações na ação conforme o sexo⁷¹.

Outros dados relevantes em relação a GPX4 é ela fazer parte do grupo das selenoproteínas, sua síntese sofrer influência das concentrações de selênio e ela ser priorizada no *ranking* de hierarquia das selenoproteínas em detrimento, por exemplo, da GPX1⁶⁷. Sabe-se que existem diferenças nas concentrações de GPXs entre os diversos órgãos e tecidos; no rim, por exemplo, a GPX1 é responsável por 96% da atividade das GPXs¹¹². Não foram encontrados dados relacionados à retina.

O SNP rs713041 está localizado na região 3'UTR do *GPX4*, em uma área crítica para a definição da hierarquia das GPX e para a incorporação das selenocisteínas e já foram descritas diferenças na expressão de GPX4 entre células de pacientes com genótipos CC e TT, no que concerne à afinidade e à competitividade pelo selênio: células linfomononucleares de sangue periférico de indivíduos com o genótipo CC, especialmente de voluntárias do sexo feminino, não apresentam variação nas concentrações de GPX4, mas sim de GPX1, quando suplementadas com selênio, enquanto células de indivíduos com o genótipo TT não apresentam variação

nas concentrações de GPX1⁷¹. Em um outro experimento realizado em uma situação de depleção de selênio, RNAs mensageiros contendo o C na posição do rs713041 tiveram uma capacidade de competição maior pela maquinaria de síntese das selenoproteínas do que os RNAs mensageiros contendo o T. Esses dados sugerem que, em vigência de deficiência de selênio, indivíduos com genótipo CC conseguirão manter a síntese de GPX4 em detrimento de outras selenoproteínas (como a GPX1)⁷¹.

A GPX4 é descrita como importante fator de proteção para as camadas mais externas da retina, onde estão presentes as células do epitélio pigmentar da retina e as células fotorreceptoras. Essas últimas apresentam alta atividade metabólica e, por serem neurônios, estão sujeitas a peroxidação de fosfolípidos de membrana, situação na qual a superexpressão de GPX4 se mostrou superior a de GPX1 na proteção ao dano celular induzido pelo estresse oxidativo⁶⁹.

No entanto, a RD é uma complicação crônica que envolve em especial as camadas mais internas da retina, com o desaranjo da interação neurovascular, espessamento de membrana basal capilar e perda de barreira hemato-retiniana. Ela afeta o endotélio dos vasos retinianos potencialmente dependente e muito sujeito à ação da GPX1, que é essencial em situações de grande estresse oxidativo (por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes)¹¹³.

Embora não existam estudos em RD, em ratos com retinopatia da prematuridade, o silenciamento da GPX1 gerou maior estresse oxidativo, aumento da expressão de VEGF e neovascularização, características comuns a RD¹¹⁴. Os achados deste trabalho sugerem que o SNP s713041 pode interferir no balanço entre as GPX4 e a GPX1 em pacientes com DM1 do sexo feminino, sendo as portadoras do

alelo T mais protegidas contra a RDP por não apresentarem aumento na síntese de GPX4 em detrimento da GPX1, que parece ser essencial para a proteção das camadas mais internas da retina.

Além disso, existe a possibilidade de que a GPX4 exerça outros efeitos além dos antioxidantes: um estudo que teve o objetivo de avaliar a vascularização de tumores em situação de baixa expressão de GPX4 encontrou menor produção de VEGF, o que pode sugerir que uma menor expressão de GPX4 (como pode ocorrer nas portadoras do alelo de proteção T) influencia positivamente a evolução da RD por estar associada à menor produção de VEGF¹¹⁵.

É interessante notar que a presença do alelo T do rs713041 no *GPX4* conferiu proteção para a RDP apenas na população do sexo feminino, enquanto um estudo prévio do grupo evidenciou um papel protetor do alelo T para a DRD apenas no sexo masculino⁷⁸. No presente momento, não há explicações para esses resultados heterogêneos, no entanto, já está descrito um dimorfismo sexual relacionado ao genótipo deste SNP na expressão e atividade da GPX4, bem como na interação com outras selenoproteínas em linfócitos de indivíduos saudáveis⁷¹, embora não se possa sugerir que diferenças entre o rim e a retina poderiam justificar os achados observados. Um aspecto que merece comentário é que a hipótese da hierarquia das selenoproteínas está estabelecida para situações de deficiência de selênio, condição já descrita em portadores de DM¹¹⁶, mas não avaliada na presente população.

Os resultados da análise do SNP rs17883901 no gene *GCLC* evidenciaram que o alelo T conferiu risco para a RDP e, na análise dicotômica de ARD *versus* (RDNP+RDP), a presença do alelo T conferiu risco para a presença de qualquer grau de RD. Esses achados estão de acordo com outros estudos, que evidenciaram que o

alelo T conferiu risco para condições clínicas nas quais o estresse oxidativo desempenha papel importante, como o infarto agudo do miocárdio^{85,86}, a DRD⁸⁰ e a esteato-hepatite não alcoólica¹¹⁷. O alelo T do SNP rs17883901 foi associado com altos títulos de anti-GAD e, talvez, com uma idade mais precoce de início do DM1⁸⁷, o que poderia influenciar negativamente o desfecho das complicações microvasculares. Na presente casuística, entretanto, os pacientes portadores do alelo T deste SNP não diferiram em relação à idade ao diagnóstico em relação aos não portadores deste alelo.

Estudos funcionais mostraram uma menor atividade da região promotora do gene *GCLC* em células endoteliais de veia umbilical apresentando o genótipo TT do SNP rs17883901 após estímulo com H₂O₂ em comparação a células com o genótipo CC. Frente a esses resultados, os autores sugerem que as células portadoras do alelo T teriam uma menor capacidade de produção de GSH em comparação a células portadoras do genótipo CC, o que favoreceria danos relacionados ao estresse oxidativo⁸⁵.

Esses dados sugerem que uma menor produção de GSH em resposta ao estresse oxidativo nos pacientes com DM1 portadores do alelo T os predisporia não apenas a DRD⁸⁰, como também a RD. É importante mencionar que já se demonstrou redução das concentrações de GSH em modelos animais de retinopatia diabética¹¹⁸, no entanto, nesses estudos não se observou diminuição da atividade da enzima γ GCS¹¹⁹. Por outro lado, já se demonstrou em retina de pacientes com RD uma redução no conteúdo de mRNA e da proteína *GCLC* em comparação a doadores não diabéticos¹²⁰.

Estudos recentes sugeriram que alterações epigenéticas na região promotora do gene *GCLC* poderiam explicar o fenômeno da memória metabólica associada ao desenvolvimento da RD. Sabe-se que a presença de ROS estimula a translocação do

fator de transcrição *nuclear factor, erythroid 2 like 2* (NRF2) para o núcleo, onde este se liga a elementos de resposta antioxidante (ARE) localizados na região promotora do gene *GCLC*, estimulando sua transcrição e, consequentemente, o aumento da síntese de GSH. Zhong *et al.* mostraram uma redução da ligação do NRF2 ao ARE localizado no gene *Gclc* na retina de ratos diabéticos¹²⁰ e Mishra *et al.* mostraram que essa redução deve-se à mudanças no padrão de metilação das histonas nessa região gênica, tanto na retina de ratos diabéticos como na retina de doadores com RD em comparação a, respectivamente, ratos e doadores não diabéticos pareados para a idade. Como a alteração no padrão de metilação das histonas detectada nos roedores diabéticos não foi revertida por um período de bom controle glicêmico, os autores sugeriram que esse mecanismo está implicado na memória metabólica¹²¹. Esses resultados corroboram nossa hipótese de que alterações no conteúdo de *GCLC* na retina podem participar da patogênese da RD.

Os resultados deste estudo devem ser interpretados no contexto das limitações de estudos transversais e os SNPs nos genes *GPX4* e *GCLC* devem ser validados em outras populações. Outras limitações deste estudo são o número relativamente pequeno de pacientes (embora se possa observar no Quadro 1 que dos poucos estudos semelhantes publicados em pacientes com DM1, apenas um incluiu casuística maior que a avaliada no presente estudo) e a não avaliação da suficiência de selênio na nossa população, o que poderia ajudar a explicar os desfechos encontrados com o polimorfismo rs713041 no gene da *GPX4*. Como pontos positivos salienta-se a análise sistemática da RD por um único oftalmologista experiente por centro e a análise concomitante das demais complicações microvasculares.

6 CONCLUSÕES

Na população de pacientes com DM1 avaliada, 28% não apresentaram retinopatia diabética, 42% apresentaram retinopatia diabética não proliferativa e 30% apresentaram retinopatia diabética proliferativa.

A presença de pelo menos um alelo T do SNP rs713041 no gene *GPX4* foi inversamente associada a RDP na população de pacientes do sexo feminino.

A presença de pelo menos um alelo T do SNP rs17883901 no gene *GCLC* foi associada a RD e a RDP na população global.

Não houve associação entre o polimorfismo rs6610650 no gene *CYBB* e a RD na população de pacientes do sexo feminino.

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HC-FMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO..... CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO..... CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Associação entre retinopatia e polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas de sistemas pró- e anti-oxidantes e proteínas transportadoras de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1.
PESQUISADOR: Dra. Maria Lúcia C. Corrêa-Giannella.
CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Associada. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62926
UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒	RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável.....

Rubrica do pesquisador.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HC-FMUSP

1 - Desenho do estudo e objetivo:

O diabetes melito tipo 2 é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue). O descontrole do diabetes por longo tempo pode levar ao desenvolvimento de complicações crônicas com prejuízo da função dos olhos, rins e problemas nos nervos. Convidamos o(a) Senhor(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar genes presentes no seu DNA que possam estar relacionados ao desenvolvimento da complicação do diabetes que atinge os olhos, que é chamada de retinopatia diabética.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso o(a) Senhor(a) concorde em participar deste estudo, vamos colher uma amostra de seu sangue por meio de uma picada na veia de seu braço para a retirada de sangue. Este sangue servirá para análise do material genético (DNA) e estudo dos genes potencialmente envolvidos no risco de você desenvolver problemas no olho ocasionados pelo diabetes (retinopatia diabética). Este material genético será armazenado e poderá ser utilizado em novos projetos de pesquisa devidamente aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP). Caso seja novamente utilizado, o Senhor (a) será contactado para autorizar ou não o uso do seu material genético. Será realizado um questionário e um exame dos olhos com uso de um aparelho que possibilita fotografar o fundo de olho do paciente (retinógrafo), direcionado para avaliação da presença de lesões ocasionadas pelo diabetes, que é um procedimento que deve ser feito em todos pacientes com diabetes, pelo menos uma vez por ano. Este exame será avaliado posteriormente por um médico especialista em olhos. Caso o (a) senhor apresente alterações no exame, será encaminhado para o serviço de oftalmologia. Se por ventura o sr (a) já tiver feito este exame no ambulatório da endocrinologia e o sr (sra) permitir, poderemos utilizá-lo e não será necessário repetir o procedimento.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, questionário e fotografia do fundo de olho com um aparelho (retinógrafo) pós dilatação da pupila com 3 gotas do colírio de tropicamida 1%.

4 - Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Você sentirá uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa das alterações no DNA. Os riscos deste procedimento são mínimos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local. Será aplicado um colírio que leva a um discreto ardor e deixará a visão turva por um período que pode durar até 6 horas, dificultando trabalhar e dirigir neste dia. O ideal é que venha acompanhado (a) e traga óculos escuros. O exame dura cerca de dez minutos e será feito em um ambiente com baixa claridade, o Sr (a), ficará com o queixo apoiado em um suporte e o aparelho será direcionado para próximo do seus olhos (inicialmente o direito e depois o esquerdo), você terá que seguir uma luz verde e sentirá uma luz forte como as de fotografia, por sete vezes em cada olho.

5 - Benefícios para o participante

O Sr(a) terá um exame de fundo de olho feito no ambulatório da endocrinologia e terá acesso a esse resultado. Existe a possibilidade de que sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento de lesões no olho derivadas do diabetes. Com isso você poderá contribuir para ajudar a compreender melhor como acontecem estas alterações no olho do diabético, quem são as pessoas mais propensas a ter estes problemas e a preparar novas estratégias de prevenção.

6 - Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não há procedimentos alternativos.

7 - Garantia de acesso:

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Maria Lucia Correa Giannella que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 4305 Telefone 3061-7467. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 - Direito de confidencialidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 - Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Uso do material coletado.

O pesquisador compromete-se a usar o material somente para fins de pesquisa. No futuro podem-se encontrar outras associações entre o papel genético e as complicações do diabetes.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

- () SIM, eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual o material for utilizado
- () NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que estou doando.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HC-FMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Associação entre retinopatia e polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas de sistemas pró- e anti-oxidantes e proteínas transportadoras de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1."

Eu discuti com a Dra. Maria Lucia C. Correa-Gianella sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo B - Aprovação do Projeto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Associação entre retinopatia e polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas pró- e anti-oxidantes e transportadores de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20599313.2.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 488.720

Data da Relatoria: 11/12/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado, que irá avaliar a associação de polimorfismos em genes que codificam proteínas pró e anti-oxidantes e transportadores de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1 com o desenvolvimento ou não de retinopatia. Os pacientes estudados serão provenientes do Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal da pesquisa é estudar a frequência e a associação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) na região regulatória de genes que codificam enzimas de vias pró- e anti-oxidantes endógenas e transportadores de glicose com o desenvolvimento de retinopatia em portadores de DM tipo 1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores os riscos existentes são apenas aqueles relacionados à coleta de sangue (dor e formação de hematoma) e dilatação da pupila (diminuição da acuidade visual por 4-6 horas).

O benefício direto ao paciente seria o de que todos teriam uma avaliação com retinografia.

Os benefícios da pesquisa seriam o de uma possível identificação de marcadores genéticos para o

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hcfm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 488.720

desenvolvimento das complicações resultantes da DM1, podendo auxiliar na definição dos pacientes que necessitam de um controle glicêmico mais (ou menos) rigoroso, além de permitir melhor compreensão da patogênese das complicações, o que pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias direcionadas para prevenção e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área, podendo auxiliar na melhor compreensão da etiologia e consequências relacionadas ao diabetes mellitus tipo I.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora encaminhou todos os documentos solicitados de maneira adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais nenhuma pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hcfm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 488.720

SAO PAULO, 11 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Associação entre retinopatia e polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas pró- e anti-oxidantes e transportadores de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 20599313.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.096.834

Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado, que irá avaliar a associação de polimorfismos em genes que codificam proteínas pró e anti-oxidantes e transportadores de glicose em portadores de diabetes mellitus tipo 1 com o desenvolvimento ou não de retinopatia. Os pacientes estudados serão provenientes do Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal da pesquisa é estudar a frequência e a associação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) na região regulatória de genes que codificam enzimas de vias pró- e anti-oxidantes endógenas e transportadores de glicose com o desenvolvimento de retinopatia em portadores de DM tipo 1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores os riscos existentes são apenas aqueles relacionados à coleta de sangue (dor e formação de hematoma) e dilatação da pupila (diminuição da acuidade visual por 4-6 horas).

O benefício direto ao paciente seria o de que todos teriam uma avaliação com retinografia.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.096.634

Os benefícios da pesquisa seriam o de uma possível identificação de marcadores genéticos para o desenvolvimento das complicações resultantes da DM1, podendo auxiliar na definição dos pacientes que necessitam de um controle glicêmico mais (ou menos) rigoroso, além de permitir melhor compreensão da patogênese das complicações, o que pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias direcionadas para prevenção e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área, podendo auxiliar na melhor compreensão da etiologia e consequências relacionadas ao diabetes mellitus tipo I.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora encaminhou emenda solicitando a inclusão de amostras de DNA de pacientes seguidos no Ambulatório de Diabetes da Faculdade de ciências médicas da UNICAMP, justificando a necessidade de aumento no número de amostras. Não haverá coleta de material biológico, uma vez que essas amostras já estão armazenadas no laboratório da pesquisadora solicitante.

Há também o envio de carta de anuência sobre o uso desse material pelos médicos/pesquisadores da UNICAMP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação da solicitação de inclusão de pacientes da UNICAMP.

Uma vez que a pesquisadora atestou que o projeto está na sua fase final, e o cronograma apresentado tem a data de Junho/2017 para o encerramento do mesmo, faz-se necessário o encaminhamento do Relatório Final do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.096.634

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_910214 E1.pdf	22/05/2017 18:12:30		Aceito
Outros	Formularioemenda.pdf	22/05/2017 18:05:57	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	Esclarecimento.pdf	22/05/2017 18:04:35	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	Anuencia.docx	27/04/2017 15:16:52	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	MCI.pdf	27/04/2017 15:10:43	Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella	Aceito
Outros	Regulamento do Biorrepositório.doc	29/11/2013 10:22:25		Aceito
Outros	Carta com esclarecimentos à CEP.PDF	21/11/2013 22:19:50		Aceito
Outros	Mudança no Protocolo de avaliação oftalmológica.PDF	21/11/2013 22:19:04		Aceito
Outros	Carta do responsável pelo Biorrepositório.PDF	21/11/2013 22:17:01		Aceito
Outros	Carta de concordância do oftalmologista assinada.PDF	21/11/2013 22:16:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo Consentimento Retino modificado.docx	21/11/2013 22:14:58		Aceito
Outros	Cappesq HCFMUSP Formulário on line.docx	19/09/2013 10:32:50		Aceito
Folha de Rosto	Plataforma Brasil.jpg	15/09/2013 20:06:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo Consentimento Retino.doc	28/08/2013 13:57:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	12/08/2013 19:41:59		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.096.634

SAO PAULO, 02 de Junho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 REFERÊNCIAS

1. Association AD. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015; 38 Suppl:S8-S16.
2. Lachin JM, Orchard TJ, Nathan DM, Group DER. Update on cardiovascular outcomes at 30 years of the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2014; 37(1):39-43.
3. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993; 329(14):977-86.
4. Gomes MB, Coral M, Cobas RA, Dib SA, Canani LH, Nery M, de Freitas MC, Faria M, Felício JS, da Silva SC, Pedrosa H, Costa e Forti A, Rea RR, Pires AC, Montenegro Junior R, Oliveira JE, Rassi N, Negrato CA. Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: a nationwide multicenter study in Brazil. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 97(1):63-70.
5. Stevens GA, White RA, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Taylor H, Bourne RR; Vision Loss Expert Group. Global prevalence of vision impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010. *Ophthalmology*. 2013; 120(12):2377-84.

6. Leasher JL, Bourne RR, Flaxman SR, Jonas JB, Keeffe J, Naidoo K, Pesudovs K, Price H, White RA, Wong TY, Resnikoff S, Taylor HR; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010. *Diabetes Care*. 2016; 39(9):1643-9.
7. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Taylor HR; Vision Loss Expert Group. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2013; 1(6):e339-49.
8. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1981; 88(7):583-600.
9. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol*. 1985; 103(12):1796-806.
10. Association AD. 10. Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes Care*. 2017; 40(Suppl 1):S88-S98.
11. Klein R, Klein BE. Are individuals with diabetes seeing better?: a long-term epidemiological perspective. *Diabetes*. 2010; 59(8):1853-60.
12. LeCaire TJ, Palta M, Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. Assessing progress in retinopathy outcomes in type 1 diabetes: comparing findings from the Wisconsin Diabetes Registry Study and the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2013; 36(3):631-7.

13. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2012; 366(13):1227-39.
14. Stewart MW. Pathophysiology of Diabetic retinopathy. In: Browning DJ (Ed.). *Diabetic retinopathy evidence-based management*. 2010. p. 1-30.
15. Knott RM, Robertson M, Muckersie E, Forrester JV. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *Biochem J*. 1996; 318 (Pt 1):313-7.
16. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007; 2007:43603.
17. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004; 27(10):2540-53.
18. Group DCaCTDEoDiACER. Effect of Intensive Diabetes Therapy on the Progression of Diabetic Retinopathy in Patients With Type 1 Diabetes: 18 Years of Follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes*. 2015; 64(2):631-42.
19. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000; 321(7258):405-12.
20. Perrone L, Matrone C, Singh LP. Epigenetic modifications and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*. 2014; 2014:789120.
21. 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.

22. Chaturvedi N, Porta M, Klein R, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Sjølie AK; DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet*. 2008; 372(9647):1394-402.
23. Chaturvedi N, Sjølie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z, Fuller JH. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet*. 1998; 351(9095):28-31.
24. Sjølie AK, Klein R, Porta M, Orchard T, Fuller J, Parving HH, Bilous R, Chaturvedi N; DIRECT Programme Study Group. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008; 372(9647):1385-93.
25. Morgan CL, Owens DR, Aubonnet P, Carr ES, Jenkins-Jones S, Poole CD, Currie CJ. Primary prevention of diabetic retinopathy with fibrates: a retrospective, matched cohort study. *BMJ Open*. 2013; 3(12):e004025.
26. ACCORD Study Group; ACCORD Eye Study Group, Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, Hubbard L, Esser BA, Lovato JF, Perdue LH, Goff DC Jr, Cushman WC, Ginsberg HN, Elam MB, Genuth S, Gerstein HC, Schubart U, Fine LJ. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010; 363(3):233-44.

-
27. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG; FIELD study investigators. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007; 370(9600):1687-97.
 28. Group DCaCTR. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care*. 2000; 23(8):1084-91.
 29. Cho YH, Craig ME, Donaghue KC. Puberty as an accelerator for diabetes complications. *Pediatr Diabetes*. 2014; 15(1):18-26.
 30. Hanberger L, Samuelsson U, Lindblad B, Ludvigsson J, SWEDIABKIDS SCDR. A1C in children and adolescents with diabetes in relation to certain clinical parameters: the Swedish Childhood Diabetes Registry SWEDIABKIDS. *Diabetes Care*. 2008; 31(5):927-9.
 31. Miller KM, Foster NC, Beck RW, Bergenstal RM, DuBose SN, DiMeglio LA, Maahs DM5, Tamborlane WV6; T1D Exchange Clinic Network. Current state of type 1 diabetes treatment in the U.S.: updated data from the T1D Exchange clinic registry. *Diabetes Care*. 2015; 38(6):971-8.
 32. Kubin M, Tossavainen P, Hannula V, Lahti S, Hautala N, Falck A. Prevalence of retinopathy in Finnish children and adolescents with type 1 diabetes: a cross-sectional population-based retrospective study. *Arch Dis Child*. 2011; 96(10):963-8.
 33. Man RE, Sabanayagam C, Chiang PP, Li LJ, Noonan JE, Wang JJ, Wong TY, Cheung GC, Tan GS, Lamoureux EL. Differential Association of Generalized and Abdominal Obesity With Diabetic Retinopathy in Asian Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134(3):251-7.

-
34. Anan F, Takayuki M, Takahashi N, Nakagawa M, Eshima N, Saikawa T, Yoshimatsu H. Diabetic retinopathy is associated with insulin resistance and cardiovascular autonomic dysfunction in type 2 diabetic patients. *Hypertens Res.* 2009; 32(4):299-305.
 35. Pop A, Clenciu D, Anghel M, Radu S, Socea B, Mota E, Panduru NM, RomDiane Study Group. Insulin resistance is associated with all chronic complications in type 1 diabetes. *J Diabetes.* 2016; 8(2):220-8.
 36. Emanuele N, Sacks J, Klein R, Reda D, Anderson R, Duckworth W, Abaira C; Veterans Affairs Diabetes Trial Group. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care.* 2005; 28(8):1954-8.
 37. Leslie RD, Pyke DA. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes.* 1982; 31(1):19-21.
 38. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes.* 1997; 46(11):1829-39.
 39. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, Iyengar SK, Chew EY, Davis MD, Satko SG, Bowden DW, Duggirala R, Elston RC, Guo X, Hanson RL, Igo RP Jr, Ipp E, Kimmel PL, Knowler WC, Molineros J, Nelson RG, Pahl MV, Quade SR, Rasooly RS, Rotter JI, Saad MF, Scavini M, Schelling JR, Sedor JR, Shah VO, Zager PG, Abboud HE; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(9):3839-45.
 40. Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 2009; 49(2):35-52.

41. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Genetics in diabetic retinopathy: current concepts and new insights. *Curr Genomics*. 2013; 14(5):289-99.
42. Priščáková P, Minárik G, Repiská V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol Biol Rep*. 2016; 43(12):1327-45.
43. 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.
44. Richeti F, Noronha RM, Waetge RT, de Vasconcellos JP, de Souza OF, Kneipp B, Assis N, Rocha MN, Calliari LE, Longui CA, Monte O, de Melo MB. Evaluation of AC(n) and C(-106)T polymorphisms of the aldose reductase gene in Brazilian patients with DM1 and susceptibility to diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2007; 13:740-5.
45. Syreeni A, El-Osta A, Forsblom C, Sandholm N, Parkkonen M, Tarnow L, Parving HH, McKnight AJ, Maxwell AP, Cooper ME, Groop PH; FinnDiane Study Group. Genetic examination of SETD7 and SUV39H1/H2 methyltransferases and the risk of diabetes complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(11):3073-80.
46. Roy MS, Hallman DM, Fu YP, Machado M, Hanis CL. Assessment of 193 candidate genes for retinopathy in African Americans with type 1 diabetes. *Arch Ophthalmol*. 2009; 127(5):605-12.
47. Kwak SH, Park KS. Genetic Studies on Diabetic Microvascular Complications: Focusing on Genome-Wide Association Studies. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015; 30(2):147-58.
48. Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, Below JE, Cox NJ, Nicolae DL. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(12):2472-81.

-
49. Nakanishi K, Watanabe C. Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene intron 2 are markers for early progression of diabetic retinopathy in Japanese with type 1 diabetes. *Clin Chim Acta*. 2009; 402(1-2):171-5.
 50. Abhary S, Burdon KP, Gupta A, Lake S, Selva D, Petrovsky N, Craig JE. Common sequence variation in the VEGFA gene predicts risk of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50(12):5552-8.
 51. Lindholm E, Bakhtadze E, Sjögren M, Cilio CM, Agardh E, Groop L, Agardh CD. The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*. 2006; 49(11):2745-55.
 52. Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, Chandrasegaran R, Boulton AJ, Larijani B, Hutchinson IV. eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic Genet*. 2010; 31(3):103-7.
 53. Brondani LA, de Souza BM, Duarte GC, Kliemann LM, Esteves JF, Marcon AS, Gross JL, Canani LH, Crispom D. The UCP1 -3826A/G polymorphism is associated with diabetic retinopathy and increased UCP1 and MnSOD2 gene expression in human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(12):7449-57.
 54. Crispim D, Fagundes NJ, dos Santos KG, Rheinheimer J, Bouças AP, de Souza BM, Macedo GS, Leiria LB, Grss JL, Canani LH. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with proliferative diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010; 72(5):612-9.
 55. Rossing P, Hougaard P, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients: a 10-year prospective observational study. *Diabetes Care*. 2002; 25(5):859-64.

-
56. Stephenson JM, Fuller JH, Viberti GC, Sjolie AK, Navalesi R. Blood pressure, retinopathy and urinary albumin excretion in IDDM: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia*. 1995; 38(5):599-603.
 57. Villar G, García Y, Goicolea I, Vázquez JA. Determinants of development of microalbuminuria in normotensive patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 1999; 25(3):246-54.
 58. El-Asrar AM, Al-Rubeaan KA, Al-Amro SA, Moharram OA, Kangave D. Retinopathy as a predictor of other diabetic complications. *Int Ophthalmol*. 2001; 24(1):1-11.
 59. Diabetic Sensory and Motor Neuropathy. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1402.
 60. Sharma V, Joshi M, Vishnoi A. Interrelation of retinopathy with peripheral neuropathy in diabetes mellitus. *J Clin Ophthalmol Res*. 2016; 4:83-7.
 61. Dafaalla MD, Nimir MN, Mohammed MI, Ali OA, Hussein A. Risk factors of diabetic cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Open Heart*. 2016; 3(2):e000336.
 62. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865):813-20.
 63. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes*. 2008; 57(2):460-9.
 64. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*. 2007; 113(4-5):234-58.

-
65. Dinçer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akçay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clin Biochem*. 2002; 35(4):297-301.
 66. Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Tara C, Rema M, Mohan V. Association of hypoglutathionemia with reduced Na⁺/K⁺ ATPase activity in type 2 diabetes and microangiopathy. *Mol Cell Biochem*. 2006; 282(1-2):169-76.
 67. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(5):3289-303.
 68. Ran Q, Gu M, Van Remmen H, Strong R, Roberts JL, Richardson A. Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity. *J Neurosci Res*. 2006; 84(1):202-8.
 69. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Campochiaro PA. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(4):715-24.
 70. Sakai O, Uchida T, Roggia MF, Imai H, Ueta T, Amano S. Role of Glutathione Peroxidase 4 in Glutamate-Induced Oxytosis in the Retina. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0130467.
 71. Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(4):1019-27.
 72. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(11):1287-312.

-
73. Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1780(11):1368-82.
 74. Perrone L, Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) induces inflammation through chromatin modification in retinal capillary endothelial cells under diabetic conditions. *J Cell Physiol*. 2009; 221(1):262-72.
 75. Perrone L, Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis*. 2010; 1:e65.
 76. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007; 87(1):245-313.
 77. Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, El-Remessy A, Bartoli M, Parpia AK, Liou G, Caldwell RB. Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(7):3239-44.
 78. Monteiro MB, Patente TA, Mohammedi K, Queiroz MS, Azevedo MJ, Canani LH, Parisi MC, Marre M, Velho G, Corrêa-Giannella ML. Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (CYBB) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) genes with kidney disease in type 1 diabetes. *Free Radic Res*. 2013; 47(10):804-10.
 79. Patente TA, Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Sanchez M, Fumeron F, Roussel R, Hadjadj S, Corrêa-Giannella ML, Marre M, Velho G. Allelic variations in the CYBA gene of NADPH oxidase and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2015; 86:16-24.

-
80. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, Queiroz M, Dib SA, Vendramini MF, Azevedo MJ, Canani LH, Parisi MC, Pavin EJ, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2011; 12:129.
81. Singh LP. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) and Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2013 Aug 5; 4. doi: 10.4172/2155-9570.1000287.
82. Ferreira NE, Omae S, Pereira A, Rodrigues MV, Miyakawa AA, Campos LC, Santos PC, Dallan LA, Martinez TL, Santos RD, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. Thioredoxin interacting protein genetic variation is associated with diabetes and hypertension in the Brazilian general population. *Atherosclerosis*. 2012; 221(1):131-6.
83. Crosley LK, Bashir S, Nicol F, Arthur JR, Hesketh JE, Sneddon AA. The single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene influences endothelial cell function: interaction with selenium and fatty acids. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(12):2185-94.
84. Polonikov AV, Vialykh EK, Churnosov MI, Illig T, Freidin MB, Vasil'eva OV, Bushueva OY, Ryzhaeva VN, Bulgakova IV, Solodilova MA. The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 2012; 35(5):507-12.

-
85. Koide S, Kugiyama K, Sugiyama S, Nakamura S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M, Ogawa H. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41(4):539-45.
 86. Campolo J, Penco S, Bianchi E, Colombo L, Parolini M, Caruso R, Sedda V, Patrosso MC, Cighetti G, Marocchi A, Parodi O. Glutamate-cysteine ligase polymorphism, hypertension, and male sex are associated with cardiovascular events. Biochemical and genetic characterization of Italian subpopulation. *Am Heart J*. 2007; 154(6):1123-9.
 87. Bekris LM, Shephard C, Janer M, Graham J, McNeney B, Shin J, Zarghami M, Griffith W, Farin F, Kavanagh TJ, Lernmark A. Glutamate cysteine ligase catalytic subunit promoter polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset and GAD65 autoantibody levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115(4):221-8.
 88. Uhlemann AC, Szlezák NA, Vonthein R, Tomiuk J, Emmer SA, Lell B, Kremsner PG, Kun JF. DNA phasing by TA dinucleotide microsatellite length determines in vitro and in vivo expression of the gp91phox subunit of NADPH oxidase and mediates protection against severe malaria. *J Infect Dis*. 2004; 189(12):2227-34.
 89. Moreno MU, San José G, Fortuño A, Belouqui O, Redón J, Chaves FJ, Corella D, Díez J, Zalba G. A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007; 25(8):1620-6.
 90. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Admoni SN, Perez RV, Machado CG, Queiroz MS, Nery M, Oliveira-Souza M, Woronik V, Passarelli M, Giannella-Neto D, Machado UF, Corrêa-Giannella ML. Thioredoxin interacting protein expression in the urinary sediment associates with renal function decline in type 1 diabetes. *Free Radic Res*. 2016; 50(1):101-10.

91. Ramus SM, Cilensek I, Petrovic MG, Soucek M, Kruzliak P, Petrovic D. Single nucleotide polymorphisms in the Trx2/TXNIP and TrxR2 genes of the mitochondrial thioredoxin antioxidant system and the risk of diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2016; 30(2):192-8.
92. de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, Magge SN, Marx N, McGuire DK, Orchard TJ, Zinman B, Eckel RH. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2014; 130(13):1110-30.
93. Moreira RO, Castro AP, Papelbaum M, Appolinário JC, Ellinger VC, Coutinho WF, Zagury L. Translation into Portuguese and assessment of the reliability of a scale for the diagnosis of diabetic distal polyneuropathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005; 49(6):944-50.
94. Agelink MW, Malessa R, Baumann B, Majewski T, Akila F, Zeit T, Ziegler D. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy humans, and effects of age, gender, and heart rate. *Clin Auton Res*. 2001; 11(2):99-108.
95. Li HK, Hubbard LD, Danis RP, Esquivel A, Florez-Arango JF, Krupinski EA. Monoscopic versus stereoscopic retinal photography for grading diabetic retinopathy severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(6):3184-92.
96. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT; Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003; 110(9):1677-82.

-
97. Malerbi FK, Morales PH, Farah ME, Drummond KR, Mattos TC, Pinheiro AA, Mallmann F, Perez RV, Leal FS, Gomes MB, Dib SA; Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. Comparison between binocular indirect ophthalmoscopy and digital retinography for diabetic retinopathy screening: the multicenter Brazilian Type 1 Diabetes Study. *Diabetol Metab Syndr*. 2015; 7:116.
 98. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991; 98(5 Suppl):786-806.
 99. Wong K. Defining diabetic retinopathy severity. In: Browning DJ (Ed.). *Diabetic retinopathy evidence-based management*. New York: Springer Science + Business Media; 2010. p. 105-20.
 100. Romero-Aroca P, Navarro-Gil R, Valls-Mateu A, Sagarra-Alamo R, Moreno-Ribas A, Soler N. Differences in incidence of diabetic retinopathy between type 1 and 2 diabetes mellitus: a nine-year follow-up study. *Br J Ophthalmol*. 2017 Mar 7. pii: bjophthalmol-2016-310063.
 101. Larsen MB, Henriksen JE, Grauslund J, Peto T. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in 17 152 patients from the island of Funen, Denmark. *Acta Ophthalmol*. 2017 Apr 26. doi: 10.1111/aos.13449. [Epub ahead of print].
 102. Maric-Bilkan C. Sex differences in micro- and macro-vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 2017; 131(9):833-46.
 103. Harjutsalo V, Maric C, Forsblom C, Thorn L, Wadén J, Groop PH; Finn Diane Study Group. Sex-related differences in the long-term risk of microvascular complications by age at onset of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011; 54(8):1992-9.

-
104. Hammes HP, Kerner W, Hofer S, Kordonouri O, Raile K, Holl RW; DPV-Wiss Study Group. Diabetic retinopathy in type 1 diabetes-a contemporary analysis of 8,784 patients. *Diabetologia*. 2011; 54(8):1977-84.
 105. Minuto N, Emmanuele V, Vannati M, Russo C, Rebora C, Panarello S, Pistorio A, Lorini R, d'Annunzio G. Retinopathy screening in patients with type 1 diabetes diagnosed in young age using a non-mydratiac digital stereoscopic retinal imaging. *J Endocrinol Invest*. 2012; 35(4):389-94.
 106. Hautala N, Hannula V, Palosaari T, Ebeling T, Falck A. Prevalence of diabetic retinopathy in young adults with type 1 diabetes since childhood: the Oulu cohort study of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2014; 92(8):749-52.
 107. Nathan DM, Group DER. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014; 37(1):9-16.
 108. Thomas RL, Dunstan FD, Luzio SD, Chowdhury SR, North RV, Hale SL, Gibbins RL, Owens Dr. Prevalence of diabetic retinopathy within a national diabetic retinopathy screening service. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99(1):64-8.
 109. Kilstad HN, Sjølie AK, Gøransson L, Hapnes R, Henschien HJ, Alsbirk KE, Fossen K, Bertelsen G, Holstad G, Bergrem H. Prevalence of diabetic retinopathy in Norway: report from a screening study. *Acta Ophthalmol*. 2012; 90(7):609-12.
 110. Klein BE, Myers CE, Howard KP, Klein R. Serum Lipids and Proliferative Diabetic Retinopathy and Macular Edema in Persons With Long-term Type 1 Diabetes Mellitus: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *JAMA Ophthalmol*. 2015; 133(5):503-10.

-
111. Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *J Biol Chem*. 2012; 287(10):7675-82.
112. de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(3):F544-51.
113. Sharma A, Yuen D, Huet O, Pickering R, Stefanovic N, Bernatchez P, de Haan JB. Lack of glutathione peroxidase-1 facilitates a pro-inflammatory and activated vascular endothelium. *Vascul Pharmacol*. 2016; 79:32-42.
114. Tan SM, Stefanovic N, Tan G, Wilkinson-Berka JL, de Haan JB. Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 (GPx1) exacerbates retinopathy of prematurity in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(1):555-62.
115. Schneider M, Wortmann M, Mandal PK, Arpornchayanon W, Jannasch K, Alves F, Strieth S, Conrad M, Beck H. Absence of glutathione peroxidase 4 affects tumor angiogenesis through increased 12/15-lipoxygenase activity. *Neoplasia*. 2010; 12(3):254-63.
116. Ruíz C, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. *J Trace Elem Med Biol*. 1998; 12(2):91-5.
117. Oliveira CP, Stefano JT, Cavaleiro AM, Zanella Fortes MA, Vieira SM, Rodrigues Lima VM, Santos TE, Santos VN, de Azevedo Salgado AL, Parise ER, Ferreira Alves VA, Carrilho FJ, Corrêa-Giannella ML. Association of polymorphisms of glutamate-cystein ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25(2):357-61.

118. Kern TS, Kowluru RA, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35(7):2962-7.
119. Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(4):587-92.
120. Zhong Q, Mishra M, Kowluru RA. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(6):3941-8.
121. Mishra M, Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic modifications of Nrf2-mediated glutamate-cysteine ligase: implications for the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon associated with its continued progression. *Free Radic Biol Med*. 2014; 75:129-39.