SHARON NINA ADMONI

**O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041
no gene *GPX4* modula a susceptibilidade
à neuropatia autonômica cardiovascular
em portadores de 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. Dra. 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

Admoni, Sharon Nina

O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041 no gene *GPX4* modula a susceptibilidade à neuropatia autonômica cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1 / Sharon Nina Admoni. -- 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 2.Neuropatias diabéticas 3.Estresse oxidativo 4.Glutationa peroxidase 5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Complicações do diabetes

USP/FM/DBD-067/17

DEDICATÓRIA

Aos meu pais Yaffa e Daniel, meus modelos e base de tudo
Aos meus irmãos Keren, Doron e Amir, sem eles não sou nada
Ao meu esposo Vladimir, que torna tudo mais colorido
Aos meus filhos Vitor e Alan, que me inspiram a ser uma pessoa
melhor e que nasceram junto com esta tese

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, razão e finalidade de toda fonte de estudo.

À Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannela, minha orientadora, que além de excelente orientadora, sempre presente e disponível, tornou-se grande amiga, também sempre presente e disponível. Minha admiração e agradecimento.

Ao meu querido esposo Vladimir, por toda a paciência, carinho, dedicação e apoio nestes anos de crescimento pessoal e profissional. Construímos uma casa, um consultório e uma família enquanto esta tese foi elaborada.

Aos meus pais Yaffa e Daniel Admoni, que sempre acreditaram na educação como pilar do ser humano. Sempre presentes e dispostos a ajudar em qualquer momento e de todas as formas possíveis, impossíveis e existentes.

À Daniele Santos-Bezerra, amiga nova e já antiga, que com seu humor contagiante ajudou-me a dar mais leveza a este trabalho.

Ao Thiago Patente, pela amizade e ajuda inesgotável para realização da análise estatística.

Aos meus irmãos Keren e Amir Admoni, que com quatro olhos de designers me ajudaram na formatação e embelezamento do manuscrito.

Aos amigos do grupo de complicações, inicial quarteto fantástico que se expandiu e continua a crescer, trabalhando com amizade e parceria: Ricardo Perez, Daniele Santos-Bezerra, Maria Beatriz Monteiro, Marcos Tadashi, Gustavo Daher, Tatiane Pelaes, Suzana Vieira, Karina Thiemi e Marisa Passarelli.

À Ana Mercedes, por toda ajuda de bancada com paciência e carinho no ensinamento. A toda equipe do LIM-25, em particular a Maria Auxiliadora Higa e a Norisa Herrera, sempre com um café acolhedor.

À Dra. Marcia Nery, modelo de pessoa e médica.

Ao grupo de diabetes do HC-FMUSP, em particular à Dra. Marcia Queiroz, sempre parceira do grupo de complicações e ao Dr. Simão Augusto Lottenberg, meu primeiro contato acadêmico com o mundo do diabetes na Liga de Diabetes.

Ao Dr. Bernardo Léo Wajchenberg, com seu conhecimento inesgotável.

Ao grupo de diabetes da UNICAMP, pela parceria na avaliação dos pacientes e em particular à Dra Maria Candida Parisi, grande entusiasta do pé diabético.

Aos Drs. Aaron Vinik e Dan Ziegler, pelas valiosas contribuições nos parâmetros de normalidade utilizados no trabalho.

Às enfermeiras Francisca, Renata, Efigênia e equipe de enfermagem Milena e Selma. À Marilda, Graça, Cleo, e Roseli, pelo apoio na coleta e execução de exames.

Aos secretários da Disciplina de Endocrinologia Rubens, Cida e Rosana, pela ajuda na execução de etapas burocráticas e administrativas deste trabalho.

Aos residentes e preceptores da endocrinologia, inúmeros, que ajudaram a selecionar os pacientes.

À minha banca de qualificação Drs. Maria Elizabeth Rossi, Sandra Villares e Sergio Dib pelas preciosas sugestões.

À Maria Cristina Arruda, carinhosa e cuidadosa com minha agenda.

À Dra Maria Cecilia Brein, por cuidar de mim nas duas gestações ocorridas durante esta tese.

Aos meus queridos sobrinhos Caubi, Lior, Erico, Maya, David, Naomi e Shay, que tornam as horas vagas mais leves e divertidas. Ao Ricardo Karman, com seu olhar questionador sobre a medicina.

À Carmen de Freitas, pela ajuda no cuidado de meus filhos e à D. Rosa da Silva, pela ajuda no cuidado de minha casa.

Aos meus amigos Tatiana Goldbaum, Luciana Audi, Priscilla Cukier, Michelle Vidinha, Adriana Angelucci, Patricia Zanoni, Marcos Tadashi, Gustavo Akerman, Juliana Padua, Flavia Duch, Fernando Sebastianes, Guilherme Marquezine, Alina Feitosa, Andrea Glezer, Daniel Freire, Denise Iezzi que me ajudam em dúvidas endocrinológicas, dividem angústias, incertezas e alegrias desta maravilhosa especialidade.

Aos meus amigos de sempre e para sempre Karen Strougo, Fabito Rychter, Adriana Haasz, Leandro Gaunszer, Pedro Castro Soares, Ana Prync, Thais Batelochio, Priscila Rosalba, Kelly Costa, Mayra Dorna, Raquel Ajub Moyses, Claudia Jerussalmy, Iara Haasz e Karen Feldman que me apoiam incondicionalmente.

Aos queridos Leonard Zajdenweg e Myrian Ajub Moyses, que confiaram em mim e me ajudaram a crescer como médica.

À Disciplina de Endocrinologia, minha casa no Hospital das Clínicas desde 2005.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

À Faculdade de Medicina da USP, sempre bela e encantadora.

Planet Earth is blue, and there's nothing I can do.

David Bowie

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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. Divisão 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 Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Definição e Epidemiologia da Neuropatia Diabética	1
1.2 Revisão Histórica da Neuropatia Diabética	2
1.3 Classificação e Diagnóstico da Neuropatia Diabética	5
1.4 Neuropatia Sensorial-Motora Crônica ou Periférica	6
1.4.1 Prevalência e Fatores de Risco	6
1.4.2 Quadro Clínico.....	7
1.4.3 Diagnóstico	8
1.5 Neuropatia Autonômica Cardiovascular.....	10
1.5.1 Prevalência e Fatores de Risco	10
1.5.2 Quadro clínico e diagnóstico.....	11
1.6 Fatores genéticos de susceptibilidade à neuropatia diabética	12
1.7 Fisiopatologia das complicações	13
1.7.1 Hiperglicemia e Estresse oxidativo nas complicações do Diabetes Mellitus.....	13
1.8 Sistemas enzimáticos e não-enzimáticos com potencial de participação na susceptibilidade genética das complicações crônicas do diabetes mellitus.....	18
1.8.1 O sistema antioxidante glutathiona.....	20
1.8.2 O sistema antioxidante tioredoxina.....	23
1.8.3 O sistema pró-oxidante NADPH oxidase	25
1.9 Relevância da exploração genética.....	27

2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Escolha dos polimorfismos.....	31
3.1.1 GPX4	31
3.1.2 GCLC	31
3.1.3 TXNIP	32
3.1.4 CYBB.....	32
3.1.5 CYBA.....	33
3.2 Casuística.....	34
3.3 Avaliação laboratorial e de variáveis clínicas.....	35
3.4 Avaliação da Neuropatia Diabética.....	38
3.4.1 Neuropatia Periférica.....	38
3.4.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular	40
3.5 Extração do DNA.....	44
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	44
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Características clínicas dos pacientes	50
5.1.1 Neuropatia Periférica.....	50
5.1.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular	52
5.2 Polimorfismos.....	54
5.2.1 GPX4	54
5.2.2 GCLC	55
5.2.3 CYBB.....	56
5.2.4 CYBA e TXNIP	57
5.3 Associação entre complicações.....	58
5.3.1 Neuropatia Periférica.....	58
5.3.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular	61

6. DISCUSSÃO	64
6.1 Polimorfismos.....	64
6.2 Achados clínicos.....	69
7. CONCLUSÕES.....	76
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
9. ANEXOS.....	80
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
A1	Albuminúria A1
A2	Albuminúria A2
A3	Albuminúria A3
ACE	Enzima conversora da angiotensina
AcGAD	Anticorpo anti-glutamato descarboxilase
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
CAT	Catalase
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
Cys	Cisteína
D.C.	Depois de Cristo
DCCT	<i>Diabetes Control and Complication Trial</i>
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al.</i>	e outros
FC	Frequência cardíaca
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GCL	Glutamilcisteína ligase
GCLC	Subunidade pesada da glutamilcisteína ligase
GCLR	Subunidade leve reguladora da glutamilcisteína ligase

GLO1	Glioxalase 1
GPX	Glutational peroxidase
GS	Glutational sintetase
GSH	Glutational reduzida
GSR	Glutational redutase
GSSG	Glutational oxidada
GST	Glutational S-transferase
GTPase	Guanosina trifosfato hidrolase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina a1c
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	<i>High frequency</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IC	Intervalo de Confiança
IECA	Inibidora enzima conversora da angiotensina
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-4	Interleucina-4
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LF	<i>Low Frequency</i>
MAF	Frequência do alelo raro
<i>MTHFR</i>	Metilenoetrahidrofolato redutase
NAC	Neuropatia Autonômica Cardiovascular
NADP	Nicotinamida adenina fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato
ND	Neuropatia diabética
NDS	<i>Neuropathy Disability Score</i>

NF κ b	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NO	Óxido nítrico
NOX	Nicotinamida adenina difosfato oxidase
NP	Neuropatia periférica
NSS	<i>Neuropathy Symptoms Score</i>
NT-3	Neurotropina 3
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH	Radical hidroxil
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pressão arterial
PAI-1	Inibidor do plasminogênio ativado 1
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PKC	Proteína cinase C
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
Relação E:I	Relação expiração: inspiração
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
SDH	Sorbitol desidrogenase
SECIS	Sequência de inserção da selenocisteína
Sel	Selênio
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TG	Triglicérides
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TRX	Tiorredoxina
TRXR1 e	Tiorredoxinas redutases 1 e 2
TRXR2	
TSH	Hormônio tireo-estimulante
TXNIP	Proteína de interação com a tiorredoxina

UDP-GlcNAC	Uridina difosfato N-acetilglucosamina
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VLf	<i>Very low frequency</i>
γ-GCS	γ-Glutamilcisteína sintetase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
=	igual a
<	menor que
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
cm	centímetro
dL	decilitro
g	gramas
Hz	herz
Kg	quilogramas
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
°C	graus Celcius
UI	unidades internacionais
μL	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de neuropatia diabética proposta por Thomas PK e adaptada por AJM Boulton	5
Tabela 2	Estudos de susceptibilidade genética para neuropatia periférica e autonômica cardiovascular em população com diabetes mellitus tipo 1	12
Tabela 3	Escore de Sintomas Neuropáticos	38
Tabela 4	Escore de Comprometimento Neuropático	39
Tabela 5	Testes utilizados para avaliação da neuropatia autonômica cardiovascular	40
Tabela 6	Características dos pacientes sem e com neuropatia periférica .	50
Tabela 7	Características dos pacientes sem e com neuropatia autonômica cardiovascular clínica.....	52
Tabela 8	Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população estudada	54
Tabela 9	Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene <i>GPX4</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular para a população estudada	54
Tabela 10	Frequência genotípica do polimorfismo rs1788390 no gene <i>GCLC</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população estudada	55
Tabela 11	Frequência genotípica do polimorfismo rs1788390 no gene <i>GCLC</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular para a população estudada.....	55
Tabela 12	Frequência genotípica do polimorfismo rs661065 no gene <i>CYBB</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população feminina	56
Tabela 13	Frequência genotípica do polimorfismo rs661065 no gene <i>CYBB</i> de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular para a população feminina	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do aumento do fluxo da via dos polióis induzido pela hiperglicemia	14
Figura 2	Representação dos mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas	15
Figura 3	Representação esquemática de um polimorfismo de um único nucleotídeo	19
Figura 4	Representação da estrutura da glutathione	20
Figura 5	Representação da síntese da glutathione	21
Figura 6	Representação do sistema tioredoxina	24
Figura 7	Ilustração da ativação da NADPH oxidase fagocitária NOX2	26
Figura 8	Avaliação do risco (expresso em odds ratio) determinado pela presença de neuropatia periférica para a presença de neuropatia autonômica cardiovascular, para os graus de albuminúria e para os graus de retinopatia	58
Figura 9	Avaliação de risco (expresso em odds ratio) entre a presença de neuropatia periférica e o grau de neuropatia autonômica cardiovascular	59
Figura 10	Comparação entre a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes sem e com neuropatia periférica.....	60
Figura 11	Avaliação do risco (expresso em <i>odds ratio</i>) determinado pela presença de neuropatia autonômica cardiovascular para a presença de neuropatia periférica, para os graus de albuminúria e para os graus de retinopatia	61
Figura 12	Comparação entre a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes sem e com neuropatia autonômica cardiovascular	62
Figura 13	Representação da estrutura da selenioproteína GPX4 e posição do polimorfismo 718	65

RESUMO

Admoni SN. O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041 no gene *GPX4* modula a susceptibilidade à neuropatia autonômica cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: As neuropatias periférica (NP) e autonômica cardiovascular (NAC) são complicações prevalentes do diabetes mellitus (DM). Há indícios de que seu desenvolvimento se deve não somente ao controle metabólico. Neste sentido, a busca por preditores genéticos faz-se imperativa. Diversos genes relacionados às vias bioquímicas que levam ao dano celular induzido pela hiperglicemia têm sido investigados, destacando-se os genes relacionados às vias do estresse oxidativo. O balanço entre os sistemas antioxidantes (como glutatona e tioredoxina) e pró-oxidantes (como o NADPH-oxidase) é um importante fator na defesa celular contra o estresse oxidativo. **Objetivo primário:** avaliar a associação entre os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) pertencentes às vias anti- e pró-oxidantes mencionadas e a NP e NAC em pacientes DM tipo 1: 718C/T na região 3' UTR (*untranslated region*) (rs713041) no gene da glutatona peroxidase 4 (*GPX4*); -129 C/T (rs1788390) no gene da glutamato cisteína ligase (*GLCL*); -1365 C/T (rs7211) no gene da proteína de interação com a tioredoxina (*TXNIP*); -2810 A/G (rs6610650) no gene do *CYBB*; - 675 T/A (não registrado) no gene do *CYBA*. **Objetivo secundário:** avaliar a relação entre as diferentes complicações microvasculares entre si (neuropatia, doença renal diabética [DRD] e retinopatia diabética [RD]). **Material e métodos:** foram selecionados 378 pacientes com DM tipo 1 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas com mais de 10 anos de doença e controle inadequado (HbA1c >8% em algum período da vida), e examinados para NP e NAC. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Sistema Taqman®). Foram avaliadas variáveis clínicas, laboratoriais do metabolismo glicêmico e lipídico e a presença de DRD e de RD. Foram avaliados 257 pacientes retrospectivamente quanto à evolução da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em relação à NP e NAC. O teste de Pearson foi usado para comparar as frequências dos genótipos e a magnitude de associação foi estimada pelo cálculo do *odds ratios* (OR), com respectivo intervalo de confiança (IC) ajustada por regressão logística para possíveis fatores de confusão. **Resultados:** A presença de pelo menos um alelo T do SNP +718C/T no gene *GPX4* conferiu proteção para NAC (OR=0,39; IC 95% 0,17 – 0,84; *P* = 0,0165). Na análise de associação entre as complicações, observou-se que: (1) na presença de NP há aumento na

probabilidade de NAC (OR = 3,38; IC95% 2,01 – 5,73; $P < 0,0001$), de albuminúria A3 (OR = 7,17; IC95% 3,68 – 14,53; $P < 0,0001$) e de RD proliferativa (OR = 9,58; IC95% 5,04 – 19,09; $P < 0,0001$) e (2) na presença de NAC há aumento na probabilidade de NP (OR = 3,72; IC95% 2,14 – 6,53; $P < 0,0001$), de albuminúria A3 (OR = 9,37; IC95% 4,68 – 19,65; $P < 0,0001$) e de RD proliferativa (OR = 3,30; IC95% 1,81 – 6,18, $P < 0,0001$). No subgrupo avaliado retrospectivamente, a presença de NP e de NAC associou-se com queda de TFGe anual maior (-4,74 mL/min/ano vs. -1,22 mL/min/ano; $P < 0,0001$ e -3,74 mL/min/ano vs. -1,54 mL/min/ano; $P = 0,04$, respectivamente). **Conclusões:** (1) a presença do alelo T no SNP +718C/T (rs713041) no gene *GPX4* confere proteção para NAC na população com DM tipo 1 estudada e (2) existe associação de risco para NP e NAC entre si e para as formas graves de DRD e RD.

Descritores: Diabetes Mellitus tipo 1; Neuropatias diabéticas; Estresse oxidativo; Glutathione peroxidase; Polimorfismo de nucleotídeo único; Complicações do diabetes

ABSTRACT

Admoni SN. The polymorphism of a single nucleotide rs713041 in the *GPX4* gene modulates the susceptibility to cardiovascular autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introduction: Peripheral (PN) and cardiovascular autonomic neuropathies (CAN) are prevalent complications of diabetes mellitus (DM). There are indications that their development occurs not only secondary to metabolic control. Thus, search for genetic predictors is very important. Several genes related to the biochemical pathways that lead to cellular damage induced by hyperglycemia have been investigated, emphasizing the genes related to the pathways of oxidative stress. The balance between antioxidant systems (such as glutathione and thioredoxin) and pro-oxidants (such as NADPH oxidase) is an important factor in cell defense against oxidative stress. **Primary objective:** to evaluate the association between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of the mentioned anti-and pro-oxidant pathways and NP and NAC in type 1 DM patients: 718C / T in the 3'UTR (untranslated region) (rs713041) of the glutathione peroxidase 4 gene (*GPX4*); -129 C / T (rs1788390) in the glutamate cysteine ligase gene (*GLCL*); -1365 C / T (rs7211) in the thioredoxin interaction protein gene (*TXNIP*); -2810 A / G (rs6610650) in the *CYBB* gene; - 675 T / A (unregistered) in the *CYBA* gene. **Secondary objective:** to evaluate the relationship between different microvascular complications (neuropathy, diabetic renal disease [DRD] and diabetic retinopathy [DR]). **Material and methods:** 378 type 1 patients DM were selected from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and from Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas; they had more than 10 years of disease and inadequate control (HbA1c > 8% at some period of life), and were examined for NP and NAC. Polymorphism genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (Taqman System®). Clinical, glycemic and lipid metabolism laboratorial variables and the presence of DRD and DR were evaluated. Also 257 patients were retrospectively evaluated regarding the evolution of the estimated glomerular filtration rate (eGFR) in relation to PN and CAN. The Pearson test was used to compare the frequencies of the genotypes and the magnitude of association was estimated by the odds ratios (OR), with the respective confidence interval (CI) adjusted by logistic regression for possible confounding factors. **Results:** The presence of at least one T allele at the SNP + 718C / T of the *GPX4* gene protected for CAN (OR = 0.39; 95% CI 0.17-0.84; P = 0.0165). In the analysis of the association between complications, it was observed that: (1) in the presence of NP, there was an increase in risk of NAC (OR = 3.38; 95% CI 2.01 - 5.73; P <0.0001), of

albuminuria A3 (OR = 7.17; 95% CI 3.68 - 14.53; $P < 0.0001$) and of proliferative DR (OR = 9.58; 95% CI, 5.04 - 19.09; $P < 0.0001$) (2) in the presence of CAN, there was an increase in risk of PN (OR = 3.72; 95% CI 2.14 - 6.53; $P < 0.0001$), albuminuria A3 (OR = 9.37; CI95% 4.68 – 19.65; $P < 0.0001$) and proliferative DR (OR = 3.30; CI95% 1.81 – 6.18; $P < 0.0001$.) In the subgroup evaluated retrospectively, the presence of PN and CAN was associated with a greater annual decrease of eGFR (-4.74 mL / min / year vs. -1.22 mL / min / year, $P < 0.0001$ and - 3.74 mL / min / yr vs. -1.54 mL / min / yr, $P < 0.04$, respectively). **Conclusions:** (1) the presence of the T allele at the SNP + 718C / T (rs713041) in the *GPX4* gene confers protection for the presence of CAN in the studied type 1 DM population and (2) there is a risk association for PN and CAN among themselves and for severe forms of DRD and RD.

Descriptors: Diabetes mellitus, type 1; Diabetic neuropathies; Oxidative stress; Glutathione peroxidase; Polymorphism single nucleotide; Diabetes complications

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 é caracterizado por uma destruição imunomediada das células beta pancreáticas produtoras de insulina, resultando em deficiência absoluta de insulina e consequente hiperglicemia¹. Assim como o DM tipo 2 (DM2), o DM tipo 1 (DM1) também apresentou um aumento crescente de sua incidência e prevalência² e a preocupação em relação a este aumento de casos novos de DM refere-se principalmente ao desenvolvimento de suas complicações crônicas.

As complicações crônicas podem ser divididas em complicações macro e microvasculares. As complicações macrovasculares estão relacionadas ao desenvolvimento de aterosclerose acelerada, levando ao aumento de risco de eventos como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência vascular periférica; as microvasculares compreendem a retinopatia diabética (RD), a doença renal diabética (DRD) e a neuropatia diabética (ND), esta última, escopo principal do presente estudo.

1.1 Definição e Epidemiologia da Neuropatia Diabética

Define-se ND como “a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção do nervo periférico em pessoas com diabetes mellitus, após a exclusão de outras causas”^{3, 4}.

Embora a ND seja a complicação microvascular mais comum do DM³, há uma dificuldade no cálculo de sua real prevalência devido à falta de padronização em relação ao critério diagnóstico utilizado e ao fato de ser uma

complicação negligenciada, principalmente do ponto de vista diagnóstico. Além disso, por ser uma complicação de amplo espectro clínico, a dificuldade da classificação do paciente em relação ao seu tipo de neuropatia representa outra barreira para o cálculo desta prevalência.

Apesar dos fatores supracitados, estima-se que a ND esteja presente em 50% dos pacientes com DM1 ou DM2 após 20 anos de doença, sendo 10% associados a anormalidades sensoriais ou de dor. A ND é a forma mais comum de neuropatia nos países desenvolvidos e é responsável por 50 a 75% das amputações não traumáticas⁵.

Será relatada, em particular, a epidemiologia e os fatores de risco convencionais da ND periférica ou sensorial-motora e da autonômica cardiovascular, objetos deste estudo.

1.2 Revisão Histórica da Neuropatia Diabética

A história de complicações diabéticas, incluindo neuropatias, não pode ser separada da história do DM. Nos textos antigos em que se encontram descrições do que se acreditava ser o DM (registros clínicos de estados poliúricos associados ao aumento da sede, perda de massa muscular e morte prematura) raramente encontram-se elementos sobre neuropatia⁶.

Os primeiros registros de que se tem notícia sobre o diabetes datam de aproximadamente 1.550 A.C. e referem-se aos papiros de Ebers, em que se encontravam descrições de uma “condição poliúrica, cujo tratamento consistia no cozimento de ossos, farinha, grãos, areia, chumbo verde e terra”. Já os primeiros registros do que se acredita serem sintomas atribuíveis à ND

apareceram muito tempo depois, no século 5 D.C. Nesta época, o médico Susruta, na Índia, realizou o seguinte relato: "Os sintomas deste pacientes são de sensação de queimação nas palmas das mãos e plantas dos pés, o corpo torna-se oleoso e viscoso e com uma sensação de peso, a urina é doce, com olfato ruim e de cor branca, e uma sede profunda... As complicações incluem diarreia, obstipação e desmaio"⁶.

Algum tempo depois, o filósofo e médico persa Ibn Sina, conhecido como Avicena (980-1.037 D.C.) no Ocidente, observou a gangrena e o "colapso da função sexual" como complicações do DM. Durante a Idade Média, uma série de escritores fez menção ao DM, mas não às suas complicações neurológicas⁶.

No século 18 D.C, John Rollo, um cirurgião da *British Royal Artillery*, que tem o mérito de ter sido o primeiro a recomendar uma dieta pobre em carboidratos como um tratamento para o DM, colocou em suas observações clínicas detalhadas sintomas compatíveis com neuropatia autonômica diabética: "O paciente tem sua pele seca, seu rosto é enrubescido. Ele frequentemente está doente e vomita um material de natureza viscosa e de gosto amargo e adocicado. Depois de comer, ele tem uma dor de estômago que muitas vezes dura mais de meia hora... Ele urina muito, 5 – 6 litros em 24 horas, para o esvaziamento da qual tem urgência e é particularmente angustiante...". Nesta mesma época, Frederick William Pavy, em seu discurso à Seção de Medicina da *British Medical Association*, forneceu uma descrição clássica de sinais e sintomas neuropáticos associados ao DM, reconhecendo o vínculo entre eles; sua descrição incluía "pernas pesadas, pés dormentes, dor

lancinante e profunda nos pés, hiperestesia, fraqueza muscular e comprometimento do reflexo patelar”⁶.

No final do século 19, Charcot resume as características clínicas da ND periférica: "É um paciente que se queixa de dor intermitente, que o acorda à noite. A dor ocorre cinco a seis vezes por dia, seguido de hiperestesia. O paciente também sente alfinetadas e agulhadas nas pernas que o impedem de sentir a natureza do chão. Ele sempre sente muito calor ou muito frio em seus pés. Ao exame físico, há uma completa ausência de reflexos patelares, o sinal de Rhomberg muito positivo, reflexo pupilar absolutamente normal para a luz e para acomodação”⁶.

A descoberta da insulina por Banting em 1921 mudou não só o mundo do DM, mas também a história da medicina. A era pós insulina trouxe uma enorme gama de pesquisas relacionadas com ND, citando-se os estudos de Wayne Rundles⁷ em 1950, nos quais se observou uma correlação entre a ND e o grau de controle glicêmico e os estudos de Sven-Erik Fagerberg⁸, na década de 60, em que foi proposto uma associação entre neuropatia, retinopatia e DRD como complicações microvasculares do DM.

O final do século 20 foi um período em que grandes ensaios clínicos foram realizados testando potenciais agentes terapêuticos, incluindo estudos com agentes com potencial ação anti-oxidante. No entanto, até agora nenhum dos agentes testados, com a exceção da insulina, conseguiu alterar o curso da ND de forma segura e eficiente.

1.3 Classificação e Diagnóstico da Neuropatia Diabética

Diversas classificações foram propostas para a neuropatia que ocorre no DM, podendo basear-se no padrão de acometimento clínico, na fisiopatologia, ou no padrão de instalação^{3, 9}.

A classificação utilizada é a baseada na proposta inicialmente por PK Thomas em 1997¹⁰ e adaptada por AJM Boulton em 2005¹¹, demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de neuropatia diabética proposta por Thomas PK e adaptada por AJM Boulton

Polineuropatias Simétricas e Generalizadas		Neuropatias focal e multifocal
Sensorial aguda Sensorial-motora crônica	Autonômica	Cranial Focal de membro Tóraco-lombar Motora proximal (amiotrofia)

[adaptado de Boulton AJ *et al.*¹¹]

1.4 Neuropatia Sensorial-Motora Crônica ou Periférica

1.4.1 Prevalência e Fatores de Risco

A neuropatia periférica (NP) é a apresentação mais comum da ND e objeto deste estudo.

Embora seja a forma mais prevalente de ND, existe uma dificuldade no cálculo da real prevalência desta complicação. Isso se deve a inúmeros fatores, como já enumerado por PJ Dyck *et al.*¹²: a) diagnóstico do DM (esta dificuldade mais específica para DM2); b) variabilidade do DM nos pacientes estudados; c) caracterização da disfunção neurológica; d) faixa de normalidade para os testes neurológicos realizados; e) critérios mínimos necessários para diagnóstico de ND; e) exclusão de causas não diabéticas para neuropatia; f) correta atribuição do tipo de neuropatia; g) dificuldade em estimar a frequência de anormalidades a partir de múltiplas avaliações; h) dificuldade em estimar a gravidade da ND.

Além disso, devido ao fato de muitos pacientes apresentarem a forma assintomática desta complicação, a prevalência costuma ser subestimada. Em estudos transversais em pacientes com DM1, observou-se uma prevalência que varia de 34 a 54%⁶. Nestes estudos, os principais fatores de risco associados a esta complicação incluíam hemoglobina glicada (HbA1c) elevada, duração do DM, idade, altura, presença de RD, HDL colesterol baixo, tabagismo atual e qualquer doença macrovascular – embora nem todos os estudos sejam concordantes com estes fatores de risco.

O *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), estudo epidemiológico mais importante conduzido em pacientes com DM1, foi

realizado com o intuito de comparar o impacto do tratamento intensivo com aquele do tratamento convencional nas complicações do DM. Após 5 anos de seguimento, observou-se uma incidência cumulativa de 18% de NP clínica no grupo convencional. Na avaliação dos estudos de velocidade de condução nervosa, esta incidência foi maior – de 36%. A redução de risco para neuropatia incidente no grupo intensivo foi de 64% neste período¹³. No seguimento epidemiológico desta coorte de pacientes (estudo *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*, EDIC), após 13/14 anos da randomização, houve uma redução do risco de NP incidente de 30% no grupo tratado de forma intensiva¹⁴. Estes dados demonstram a importância do controle da glicemia no desenvolvimento da NP, o qual deve ser realizado de forma intensiva e imediata ao diagnóstico.

1.4.2 Quadro Clínico

Sintomas como queimação, parestesia, hiperestesia ou dor ocorrem em até 50% dos pacientes, com uma característica de piora noturna. O padrão de acometimento é conhecido como bota e luva: geralmente com início nos pés e parte distal dos membros inferiores, com evolução ascendente – em direção aos joelhos e, quando estes são acometidos, com início de acometimento de membros superiores. Sintomas negativos, como insensibilidade, muitas vezes não são relatados ativamente por pacientes, mas são referidos na anamnese direcionada. Mais de 50% dos pacientes são assintomáticos, e o diagnóstico nestes casos é feito por meio do exame físico direcionado, ou em alguns casos, tardiamente na presença de úlcera.

Os sinais da NP também ocorrem com padrão em bota e luva. Os reflexos aquileus estão diminuídos ou ausentes, há uma redução da sensibilidade tátil, térmica, vibratória e de propriocepção. A redução de força muscular é incomum, devendo-se excluir causas não diabéticas quando esta for a principal manifestação clínica.

1.4.3 Diagnóstico

Algumas ferramentas podem ser utilizadas para o diagnóstico da NP, com vantagens e desvantagens relacionadas à sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, custo, invasibilidade, entre outras.

Para o presente estudo, optou-se pela associação da avaliação de sintomas e sinais da seguinte forma:

- Avaliação dos sintomas: o *Neuropathy Symptom Score* (NSS)¹⁵ foi o questionário utilizado para avaliar a qualidade e a gravidade dos sintomas, e tem por base caracterizar aspectos relacionados à dor da NP. O paciente recebe uma pontuação para os sintomas referidos e a soma desta pontuação é classificada segundo a gravidade em leve, moderada e grave, conforme demonstrado na Tabela 3 no item Materiais e Métodos. É importante ressaltar que o aspecto mais importante para o diagnóstico da NP é a avaliação de sinais, uma vez que, como relatado, muitos pacientes apresentam sintomas negativos. Sendo assim, não é possível utilizar a avaliação de sintomas como rastreamento de NP.

- Avaliação dos sinais: o *Neuropathy Disability Score* (NDS), inicialmente proposto por Dyck *et al.*¹⁶ consiste em uma ampla avaliação da força muscular (face, dorso e extremidades), reflexos dos membros superiores e inferiores e

da sensibilidades dolorosa, vibratória e posicionamento da articulação do dedo indicador e do hálux. No entanto, este questionário deve ser realizado por neurologistas bem treinados, levando a uma dificuldade na sua reprodutibilidade. Young *et al.* modificaram o NDS de forma que pudesse ser realizado por não especialistas¹⁷, avaliando as sensibilidades dolorosa (*pin prick*), tátil (algodão), ao frio (diapasão inserido em água gelada) e vibratória (diapasão de 128 Hz), e graduando as alterações encontradas em níveis anatômicos (sem alteração, base do hálux, médio pé, tornozelo, região tibial e joelho), além de reflexos aquileus e patelares, gerando um escore que vai de 0 a 28. O NDS Modificado e Simplificado, demonstrado na Tabela 4 no item Materiais e Métodos e utilizado no presente estudo, é uma ferramenta em que se avalia as sensibilidades térmica (diapasão em água gelada/ água morna no dorso do pé), dolorosa (distinção entre ponta romba ou aguda no hálux) e vibratória (distinção entre vibrando/ não vibrando no hálux) e o reflexo aquileu (presente/ ausente), gerando um score de 0 a 10. Sua grande vantagem em detrimento aos demais é que é de grande reprodutibilidade, tendo por principal objetivo diagnosticar a presença da NP, sem se preocupar com pontuar o nível anatômico deste déficit³.

1.5 Neuropatia Autonômica Cardiovascular

A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) é a forma mais estudada de neuropatia autonômica do DM. É definida pelo dano da inervação autonômica das fibras responsáveis pelo coração e vasos sanguíneos, levando à disfunção no controle da frequência cardíaca e na dinâmica vascular. Inicialmente observa-se disfunção da função parassimpática e, em estágios avançados, da função simpática¹⁸.

1.5.1 Prevalência e Fatores de Risco

A prevalência da NAC em pacientes com DM1 é objeto de poucos estudos, quando comparada à NP. No entanto, é a neuropatia autonômica mais estudada. A prevalência de NAC em DM1 tem uma dispersão muito grande, variando de 1,6 a 90%, dependendo do critério diagnóstico utilizado, da idade do paciente e, principalmente, da duração do DM¹⁸.

Na coorte de pacientes do estudo DCCT-EDIC, o grupo de tratamento intensivo apresentou uma diminuição de incidência de 31% de NAC quando comparado ao grupo de tratamento convencional, após 13/14 anos de seguimento¹⁴.

A NAC é relacionada ao aumento de mortalidade cardiovascular. Os fatores de risco envolvidos com esta complicação não são claros, havendo uma associação entre sexo feminino, alto LDL colesterol, baixo HDL colesterol, alto triglicérides (TG), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e mau controle glicêmico.

1.5.2 Quadro clínico e diagnóstico

A manifestação clínica da NAC envolve taquicardia de repouso (>100 batimentos por minuto), intolerância ao exercício, hipotensão ortostática (queda de >20 mmHg na pressão sistólica ou >10 mmHg na pressão diastólica), instabilidade cardiovascular cirúrgica, disfunção de ventrículo esquerdo, infarto do miocárdio silencioso e morte súbita.

A NAC tem grande impacto na morbi-mortalidade do paciente com DM. Em uma metanálise realizada com 15 estudos, observou-se um risco relativo de mortalidade que variou de 1,20 a 3,45, dependendo do critério diagnóstico utilizado¹⁸.

Assim como para NP, existem diversas ferramentas que podem ser utilizadas para diagnóstico de NAC, com suas vantagens e desvantagens¹⁹. Para o presente estudo, utilizamos os Testes de Ewing e a Análise Espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca, os quais contemplam a avaliação dos sistemas parassimpático e simpático e serão discutidos com maiores detalhes no item 4 (Material e Métodos).

1.6 Fatores genéticos de susceptibilidade à neuropatia diabética

Sumarizamos na Tabela 2 os dados de literatura relacionados à susceptibilidade genética para ND em pacientes com DM1. A maioria dos estudos relacionados a esta susceptibilidade foram realizados em população com DM2 (não representados na tabela) ou população mista. Poucos trabalhos na literatura médica focaram na população com DM1.

Tabela 2 – Estudos de susceptibilidade genética para neuropatia periférica e autonômica cardiovascular em população com diabetes mellitus tipo 1

Gene	SNP	Etnia	Efeito da Associação	Valor de P	N	Referência
Neuropatia Periférica						
<i>ACE</i>	I>D	Turcos	Risco	0,032	235 DM1 e 2	Iananir <i>et al.</i> ²⁰
<i>MTHFR</i>	rs1801133 C>T	Turcos	Risco	0,003	230 DM1 e 2	Serbulent <i>et al.</i> ²¹
<i>GLO1</i>	rs2736654 A>C	Caucasianos	Risco	0,03	251 DM1 e 2	Groener <i>et al.</i> ²²
<i>VEGF</i>	rs25648 C>T	Britânicos-Caucasianos	Risco	0,02	240 DM1	Tavakkoly-Bazzaz <i>et al.</i> ²³
<i>IL4</i>	VNTR (P1/P2 alelo)	Turcos	Risco	0,0002	241 DM1 e 2	Basol <i>et al.</i> ²⁴
<i>GPX1</i>	rs1050450 C>T	Caucasianos	Risco	0,01	211 DM1 e 2	Tang <i>et al.</i> ²⁵
<i>CAT</i>	-262T>C	Russos	Protetção	0,002	466 DM1	Babizhayev MA <i>et al.</i> ²⁶
Neuropatia Autonômica Cardiovascular						
<i>GST</i>	Wild/null	Eslovacos	Risco	<0,04	46 DM1	Vojtkova <i>et al.</i> ²⁷

[adaptado de Politi C *et al.*¹⁹]

ACE: enzima conversora da angiotensina; CAT: Catalase; GLO1: Glioxalase 1; GPX1:

Glutathione peroxidase 1; GST: glutathione S-transferase; IL4: Interleucina 4; MTHFR:

Metilene tetrahydrofolate reductase; SNP: polimorfismo de um único nucleotídeo; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

1.7 Fisiopatologia das complicações

1.7.1 *Hiperglicemia e Estresse oxidativo nas complicações do Diabetes Mellitus*

O dano tecidual causado pela hiperglicemia ocorre quando, na presença de susceptibilidade genética e de possíveis fatores aceleradores (como HAS e dislipidemia [DLP]), há alterações repetidas agudas no metabolismo celular e alterações cumulativas crônicas em macromoléculas estáveis. Estas alterações agudas e crônicas ocorrem principalmente em células que não têm a capacidade de diminuir o transporte de glicose para o intracelular na presença de hiperglicemia – como células da retina, do glomérulo renal e dos nervos periféricos²⁸.

O dano celular induzido pela hiperglicemia pode ser explicado por diversos mecanismos, sendo os principais:

- Aumento da ativação da via dos polióis: o consumo da nicotinamida adenina difosfato (NADPH) para conversão da glicose em sorbitol diminui a capacidade de regeneração da glutathione oxidada para sua forma reduzida (diminuindo assim o *pool* de defesa anti-oxidante) (Figura 1).

Figura 1 – Representação do aumento do fluxo da via dos polióis induzido pela hiperglicemia [adaptado de Brownlee M²⁸]

GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; NADP: nicotinamida adenina fosfato; NADPH: nicotinamida adenina difosfato; ROS: espécies reativas de oxigênio; SDH: sorbitol dehidrogenase

- Aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end-products* ou AGEs): devido à reação não enzimática do grupamento aldeído reativo da glicose com o grupamento amino das proteínas, ocorre a formação dos produtos de Amadori e, a seguir, de um grupo de compostos denominados AGEs. Estes levam à lesão celular por meio de três mecanismos: modificação intracelular de proteínas, modificação de proteínas da matriz extracelular e modificação de proteínas circulantes.

- Aumento da ativação da proteína cinase C (PKC): esta ativação resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da atividade da endotelina-1, alteração na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e do inibidor do plasminogênio ativado 1 (PAI-1) e ainda ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF κ b e do sistema pró-oxidante NADPH oxidase.

- Aumento da ativação da via da hexosamina: devido ao excesso de glicose intracelular, ocorre um aumento do fluxo através da via da hexosamina, em detrimento da via glicolítica. Com isso, há aumento de substratos para glicosilação de proteínas intracelulares, alterando suas funções.

O estresse oxidativo foi proposto como o elemento unificador de todas essas vias na instalação das complicações diabéticas conforme ilustrado na Figura 2^{28 29}.

Figura 2 – Representação dos mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas [adaptado de Corrêa-Giannella ML e Viera SM²⁹]

O₂⁻: radical superóxido; AGEs: produtos finais de glicação avançada; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; GSH: glutatona reduzida, GSSG: glutatona oxidada, NADP: nicotinamida adenina fosfato; NADPH: nicotinamida adenina difosfato; PKC: proteína cinase C; UDP-GlcNAc: uridina difosfato N-acetilglucosamina

Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e, neste processo, os produtos intermediários são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^\cdot$), que são as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses compostos são extremamente reativos e têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios. Assim, a avaliação do estresse oxidativo é feita pela mensuração dos compostos modificados pelas EROs. Os compostos modificados têm uma atividade biológica diminuída, com perda de energia para o metabolismo e comprometimento da sinalização celular, transporte e outras funções maiores. Estes produtos alterados também são alvo de degradação proteossômica, diminuindo mais a função celular. O acúmulo de tal dano leva, por fim, à morte celular, por meio de mecanismos de necrose ou apoptose³⁰.

O estresse oxidativo é estabelecido quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar as EROs e/ou quando há produção excessiva de EROs, levando à lesão do tecido alvo.

Já é consenso na literatura que o controle glicêmico intensivo do DM diminui a frequência de complicações micro e macrovasculares, como demonstrado nos estudos DCCT e *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), em pacientes com DM1 e 2, respectivamente^{13, 31-33}. Na coorte de pacientes com DM1, que representa cerca de 5 a 10% dos pacientes com DM, a hiperglicemia tem papel majoritário no desenvolvimento e na progressão das complicações. Há evidências de que a exposição, mesmo que temporária, do tecido-alvo à hiperglicemia desencadeie um processo de dano celular.

Os valores de todos os marcadores do estresse oxidativo estão modificados em pacientes portadores de DM1 e 2. Em particular na ND, estudos experimentais em animais diabéticos já demonstraram que o estresse oxidativo leva à diminuição no fator de crescimento neural (NGF), da neurotrophina 3 (NT3), do fator neurotrófico ciliar e do IGF1 neural, e que esta diminuição está relacionada com diminuição da função neural e perda do apoio neurotrófico e, em longo prazo, à apoptose de células de Schwann³⁴. Recentemente, Ziegler *et al.*³⁵ demonstraram em pacientes com DM1 e 2 que o aumento da geração de superóxido está associada ao declínio da função nervosa sensorial e autonômica.

Além do papel da hiperglicemia, existem inúmeras evidências sugerindo que uma predisposição genética participe da susceptibilidade para o desenvolvimento das complicações microvasculares no DM1. Genes relacionados aos mecanismos dos danos induzidos pela hiperglicemia têm sido investigados. Em particular, genes que codificam enzimas que participam dos mecanismos antioxidantes e pró-oxidantes são candidatos a conferirem susceptibilidade ou proteção para as complicações crônicas.

1.8 Sistemas enzimáticos e não-enzimáticos com potencial de participação na susceptibilidade genética das complicações crônicas do diabetes mellitus

Por não existirem fortes preditores para o desenvolvimento de complicações no DM, marcadores genéticos têm sido estudados na tentativa de se identificar pacientes sob maior risco. Neste sentido, duas principais estratégias são usadas para explorar o genoma humano: a primeira delas é conhecida como rastreamento genômico (*genome scan*), que identifica genes não com base em suas funções, mas sim em sua posição no genoma. Na segunda estratégia, investigam-se genes envolvidos em vias biológicas específicas relacionadas ao que se conhece da fisiopatologia da doença que está sendo estudada.

Aproximadamente 0,1% da sequência do genoma difere entre os seres humanos e a maioria dessas diferenças corresponde a polimorfismos (variações presentes em mais de 1% da população). A forma mais comum de polimorfismo é conhecida por SNP (*single nucleotide polymorphism*), na qual há troca, inserção ou deleção de um único nucleotídeo na molécula de DNA²⁹, conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de um polimorfismo de um único nucleotídeo (adaptado de Corrêa-Giannella ML e Vieira SM²⁹)
 SNP – polimorfismo de um único nucleotídeo.

A predisposição às doenças poligênicas, como obesidade, DM e suas complicações, é determinada por esses polimorfismos. Alguns desses polimorfismos são funcionais, por serem capazes de influenciar a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a quantidade final da proteína codificada por aquele gene³⁶. A associação entre SNPs e alterações funcionais é atualmente uma poderosa ferramenta de estudo de doenças poligênicas. Os sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo envolvem inúmeros compostos. Estes sistemas tem um potencial de estarem envolvidos no mecanismo de estresse oxidativo causado pela hiperglicemia.

No presente trabalho serão estudados polimorfismos relacionados aos sistemas de defesas anti-oxidante glutatona (GSH) e tiorredoxina (TRX) e ao sistema pró-oxidante NADPH oxidase. Acredita-se que estes sistemas possam estar envolvidos no desenvolvimento das complicações diabéticas, já que participam da regulação do estado redox das células e alguns deles já foram estudados em situações de hiperglicemia.

1.8.1 O sistema antioxidante glutathiona

A GSH é uma molécula ubíqua produzida intracelularmente em todos os órgãos e tipos celulares, porém mais abundante no fígado e pulmões. Em torno de 85 a 90% está livremente distribuída no citoplasma, podendo também estar compartimentalizada em organelas como mitocôndrias, peroxissomos, matriz nuclear e retículo endoplasmático. A GSH é um potente agente redutor, agindo como um doador de prótons e é o mais abundante antioxidante intracelular do organismo. A sua depleção pode ser tanto causa como pré-requisito para formação de EROs³⁷.

A GSH é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina (Figura 4).

Figura 4 – Representação da estrutura da glutathiona [adaptado de Franco R *et al.*³⁷]

Sua síntese requer a ação consecutiva de duas enzimas: a primeira (etapa limitante) é a γ -glutamylcisteína ligase ou sintetase (GCL ou γ -GCS), que forma uma ponte entre uma cisteína e um resíduo de glutamato. A seguir, a glicina é adicionada ao composto pela ação da glutathiona sintetase (GS). A GSH pode também ser sintetizada pelas vias de recuperação que envolvem seu catabolismo ou pela reciclagem após sua oxidação pela enzima glutathiona redutase (GSR), utilizando o NADPH como cofator. A GSH detoxifica uma série

de compostos pela enzima glutathiona S-transferase (GST) e pelas glutathionas peroxidases (GPX). Lipídeos peróxidos tóxicos ligam-se a duas moléculas de GSH, sob o controle das GPXs, formando um grupo de lipídio hidroxila inerte, a glutathiona oxidada (GSSG) e água. Como já citado, após a sua participação nas reações redox, a GSR regenera a GSH a partir da GSSG, utilizando o NADPH como cofator (Figura 5)^{30 37}.

Figura 5 – Representação da síntese da glutathiona [adaptado de Dickinson DA e Forman HJ³⁸]

GPX: glutathiona peroxidase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; NADP: nicotinamida adenina fosfato; NADPH: nicotinamida adenina difosfato

Estudos já mostraram que o DM causa profundas alterações no metabolismo e no transporte da GSH. Diversas complicações do DM, como lesões nervosas periféricas, malformações fetais e angiopatias têm sido associadas à depleção de GSH e, consequentemente, à formação de EROs^{37,39}. Babizhayev *et al.*²⁶ demonstraram em uma coorte de pacientes com DM1 o papel protetor do alelo T no polimorfismo -262T>C no gene que codifica a catalase (CAT), também um conhecido sistema antioxidante para a presença de ND.

1.8.1.1 Glutamato Cisteína Ligase

Como já descrito, a GSH é sintetizada nas células pela ação da GCL. A GCL é um heterodímero formado por uma subunidade catalítica pesada (GCLC) e por uma subunidade leve reguladora ou modificadora (GCLR). A subunidade GCLC carrega toda a atividade enzimática e é sujeita a um *feedback* negativo pela GSH, enquanto que o GCLR tem apenas um papel regulatório, aumentando a eficácia da enzima. As concentrações das duas subunidades estão *upregulated* em condições de oxidação, em uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo.

Dias-Hernandez *et al.*⁴⁰ demonstraram a importância da atividade das duas subunidades para a sobrevivência dos neurônios. Em seu estudo de cultura de células do córtex neural de ratos, ao serem silenciadas as duas proteínas, houve aumento da apoptose. Os neurônios não contêm a enzima GCL, devendo o dipeptídeo ser secretado pelas células gliais³⁰.

1.8.1.2 Glutathionas peroxidases

As GPX são um grupo de oito tipos de selenoproteínas (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7 e GPX8) com função enzimática de catalisar a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos em água e nos seus correspondentes álcoois, utilizando a GSH como cofator⁴¹, conforme ilustrado na Figura 5. Já foi demonstrado que há uma redução da atividade das GPXs em pacientes com DM mau controlado³⁹.

Este trabalho focou na GPX4, pois tem sido proposto que ela pode ter papel primário na proteção das células contra o estresse oxidativo. A GPX4 é

um monômero, em contraste com as outras GPX, que são tetrâmeros. Ela existe em três isoformas: citosólica, mitocondrial e no núcleo do espermatozoide; seu pequeno tamanho e superfície hidrofóbica estão implicadas na habilidade desta enzima de reduzir fosfolípidos peroxidados e colesterol nas membranas.

Em relação a sua ação em nervo periférico, Barriere *et al.* demonstraram uma diminuição da expressão de RNA mensageiro da GPX4 na raiz do gânglio dorsal de ratos diabéticos com NP causada pelo quimioterápico Paclitaxel⁴². Também em estudos experimentais, a depleção da GPX4 neuronal levou a neurodegeneração *in vivo* e *ex vivo*, frisando a importância desta via nas células neuronais⁴³. No sistema nervoso central, há uma associação da disfunção desta proteína com algumas doenças, como Doenças de Alzheimer e de Parkinson⁴¹.

1.8.2 O sistema antioxidante tiorredoxina

O sistema antioxidante tiorredoxina é composto pela TRX, Tiorredoxinas redutases (TRXR1 e TRXR2) e NADPH e exerce um papel importante na manutenção do estado redox intracelular. Os sistemas TRX e GSH são considerados os dois principais sistemas antioxidantes redutores de tiol e ambos têm expressão ubíqua^{37, 44}. Além do seu importante papel nas defesas antioxidantes, a TRX tem papel modulador na sinalização de vias intra e extracelulares, na regulação de fatores de transcrição e na modulação da resposta imune⁴⁵.

O sistema TRX é responsável pela redução de grupamentos cisteína oxidados em proteínas, por meio da interação com o centro redox ativo da tiorredoxina. A tiorredoxina oxidada formada é reduzida com ajuda de TRXRs

e NADPH. É sabido que a tiorredoxina realiza a maior parte de sua função antioxidante por intermédio de peroxirredoxinas, também chamadas de tiorredoxinas peroxidases (Figura 6). Alterações deste sistema estão implicadas em diversas condições patológicas, entre elas, complicações do DM. Já foi demonstrado que a TRX é expressa no sistema nervoso central e periférico^{44, 45}.

Figura 6 – Representação do sistema Tiorredoxina [adaptado de Maulik N e Das DK⁴⁴].

NADPH: nicotinamida adenina difosfato; TRX: tiorredoxina,

1.8.2.1 Proteína de interação com a tiorredoxina

A proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) interage com a forma reduzida da TRX, inibindo sua atividade redutora. Esta ação se dá por meio de interação com seu sítio catalítico ativo. Sendo assim, a TXNIP age como um inibidor endógeno da TRX. O estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia age por meio da indução da TXNIP, levando à inibição da atividade antioxidante da TRX⁴⁴.

O papel da TRX e de seu inibidor endógeno, a TXNIP, foi demonstrado em modelos animais e humanos com DRD: ratos diabéticos nos quais a TRX é

superexpressa apresentavam proteção contra o desenvolvimento desta complicação⁴⁶ e pacientes diabéticos com DRD apresentavam um aumento da expressão da TXNIP⁴⁷. Este sistema também tem um papel crítico no efeito da glicotoxicidade sobre a apoptose da célula beta pancreática⁴⁸.

Em relação à ND, Price *et al.*⁴⁹ demonstraram que a TXNIP está *upregulated* no raiz do gânglio dorsal de ratos diabéticos, sugerindo um possível papel desta proteína na patogênese da ND.

1.8.3 O sistema pró-oxidante NADPH oxidase

As NADPH oxidases (NOX) são uma família de proteínas que transferem elétrons através de membranas e catalisam a redução dependente de NADPH de O_2 a O_2^- , gerando EROs.

A proteína NOX2, considerada o modelo das NADPH oxidases, é responsável pelo *respiratory burst*, que é a produção aumentada de EROs pelos fagócitos após rápido consumo de oxigênio. Estas EROs participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos. O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático e, no caso da NOX2, é composto de dois componentes de membrana, três componentes citosólicos e um substrato GTPase relacionado a Ras (Rac2). Os componentes de membrana são a subunidade catalítica NOX2 e a subunidade regulatória p22phox que formam um heterodímero e se estabilizam mutuamente. Para que ocorra ativação deste complexo, é necessária a translocação das proteínas citosólicas p40phox, p47phox e p67phox. O complexo enzimático ativo transporta elétrons do NADPH citoplasmático para o extracelular, gerando superóxidos, conforme ilustrado na Figura 7⁵⁰.

Figura 7 – Ilustração da ativação da NADPH oxidase fagocitária NOX2⁵⁰. A ativação ocorre com a translocação das proteínas citosólicas p40phox, p47phox e p67phox. O complexo enzimático ativo transporta elétrons do NADPH citoplasmático para o meio extracelular, gerando superóxidos.

Estudos prévios em modelos animais diabéticos e em pacientes com DM1 demonstraram associação entre o aumento de atividade de NOX relacionado à hiperglicemia e o dano neural^{51, 52}.

1.8.3.1 NADPH oxidase 2 (NOX2) e p22phox

A enzima NOX2 é codificada pelo gene *CYBB* e a enzima p22phox é codificada pelo gene *CYBA*. Este sistema enzimático é considerado um sistema pró-oxidante, desempenhando papel importante na defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos.

A NOX2 é expressa em neurônios, onde juntamente com a NOX1 e NOX4, modifica a atividade neuronal e participa da sinalização intercelular⁵⁰.

1.9 Relevância da exploração genética

Exceto pela hiperglicemia, HAS e fator de risco familiar, não existem fatores preditivos genéticos, clínicos ou laboratoriais para o desenvolvimento de complicações microvasculares em pacientes com DM. Assim, a busca de marcadores para identificar pacientes de risco torna-se importante, pois pode possibilitar o rastreamento daqueles com maior susceptibilidade para o desenvolvimento das complicações e a otimização do tratamento intensivo nesta população, já que há uma dificuldade de adesão ao tratamento intensivo nos portadores de DM^{53, 54}.

Além disso, o estudo de marcadores genéticos permite melhor compreensão da patogênese das complicações, o que pode possibilitar o desenvolvimento de novas terapias direcionadas para prevenção e tratamento²⁹.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo primário deste estudo é avaliar a frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam enzimas dos sistemas GSH, TRX e NADPH oxidase e sua associação com a NP e NAC em pacientes portadores de DM1. Serão estudados os seguintes polimorfismos:

GPX4: 718C/T na região 3' UTR (*untranslated region*) (rs713041)

GLCL: -129 C/T (rs1788390)

TXNIP: -1365 C/T (rs7211)

CYBB: -2810 A/G (rs6610650)

CYBA: – 675 T/A (não registrado)

O objetivo secundário deste estudo é avaliar a relação entre as diferentes complicações microvasculares entre si (ND, DRD e RD).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha dos polimorfismos

3.1.1 *GPX4*

O polimorfismo rs713041 (+718C/T) está localizado na região 3'UTR do gene *GPX4*, situado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3).

Já foi demonstrado seu papel funcional na síntese e função da proteína *GPX4*, tendo sido estudado em diversas condições clínicas^{55, 56}. Nas complicações do DM, em estudo recente de nosso grupo, foi demonstrado o papel nefroprotetor do alelo T em relação a prevalência de DRD em população masculina com DM1⁵⁷.

3.1.2 *GCLC*

O polimorfismo rs17883901 (-129C/T) está localizado na região 53410037 do gene *GCLC*, situado no braço curto do cromossomo 6 (6p12).

Koide *et al.*⁵⁸ demonstraram que a presença do polimorfismo -129T na região promotora deste gene confere uma menor transcrição do mRNA e está associada a um aumento do risco para infarto agudo do miocárdio na população estudada.

Estudo de nosso laboratório mostrou que em um universo de 263 pacientes portadores de DM1 com mais de 15 anos de diagnóstico e mau controle glicêmico, a presença de pelo menos um alelo T do polimorfismo -129 C/T do gene *GCLC* (subunidade catalítica da γ -CGS) conferiu risco para a presença de DRD na população de pacientes estudada⁵⁹.

Também em população com DM1, foi demonstrado que a presença do alelo T no polimorfismo em questão conferiu maiores títulos de anticorpo anti-glutamato descarboxilase (AcGAD) e associou-se a uma idade mais precoce de diagnóstico⁶⁰.

3.1.3 *TXNIP*

O polimorfismo rs7211 (-1365 C/T) está localizado na região promotora do gene *TXNIP*, situado no braço longo do cromossomo 1 (1q21.1).

Em estudo recente 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 aumente a expressão da *TXNIP*, diminuindo a captação periférica da glicose e assim aumentando as concentrações de glicose e insulina circulante⁶¹.

Até o presente momento, não há publicações correlacionando este polimorfismo com as complicações do DM.

3.1.4 *CYBB*

O polimorfismo rs6610650 (-2810 A/G) está localizado na região promotora do gene *CYBB*, situado no braço curto do cromossomo X (Xp21.1) e está em desequilíbrio de ligação com o microssatélite dinucleotídeo TA localizado na região promotora⁶².

Em estudo de nosso laboratório, a presença do alelo A em casuística de 451 pacientes com DM1 foi associada com menor taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) na população feminina⁵⁷.

3.1.5 *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).

Foi demonstrado o papel de risco do alelo T para a presença de HAS – a presença do alelo A está associada à menor atividade transcricional do gene em questão, diminuindo assim a transcrição da proteína p22phox⁶³. Na população com DM1, em nossa casuística, a presença deste alelo demonstrou-se de risco para o desenvolvimento de DRD⁵⁹.

3.2 Casuística

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram estudados 378 pacientes portadores de DM1 acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3 Avaliação laboratorial e de variáveis clínicas

Os pacientes foram selecionados tendo um tempo de doença mínimo de 10 anos e uma HbA1c >8% em algum período da vida. As seguintes informações foram coletadas para os pacientes diabéticos: idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de diagnóstico, pesquisas de tabagismo (atual ou pregresso), etilismo (atual ou pregresso), história obstétrica para mulheres, comorbidades (com ênfase em HAS e DLP), uso de medicações orais, terapêutica insulina (tipo e doses de insulina). Nos pacientes que apresentavam NP, foram afastadas causas secundárias como deficiência de vitamina B12, hipotireoidismo, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (VHB) ou vírus da hepatite C (VHC). Nos pacientes que apresentavam NAC, as causas secundárias ou de interferência no exame afastadas foram insuficiência adrenal e uso de medicações que interfiram na frequência cardíaca (beta bloqueadores). Na presença de causas secundárias de ND, os pacientes foram excluídos da avaliação.

Os resultados dos exames complementares foram consultados no sistema HCMED, avaliando-se os últimos exames prévios à avaliação de NP. Para a HbA1c, foram avaliados os últimos três exames em semestres diferentes, fazendo-se a média aritmética destes. Os exames e os métodos utilizados foram:

- Glicemia de jejum: enzimático hexoquinase;
- HbA1c: cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Frutosamina: colorimétrico automatizado;
- Colesterol total, HDL colesterol: enzimático colorimétrico automatizado;

- LDL colesterol: cinético automatizado;
- Triglicérides (TG): enzimático colorimétrico automatizado;
- Creatinina plasmática: colorimétrico automatizado;
- Vitamina B12: eletroquimioluminescência;
- Hormônio Tireo-Estimulante (TSH): imunofluorométrico;
- Sorologia para HIV: eletroquimioluminescência;
- Sorologia para VHB: eletroquimioluminescência;
- Sorologia para VHC: quimioluminescência amplificada (imunométrica) semi-quantitativo automático;
- Cortisol sérico: quimioimunoensaio;

Os dados antropométricos registrados foram peso, altura e circunferência abdominal. A avaliação destes dados foi feita por meio de consulta em prontuário, questionário ou aferição direta.

A avaliação da presença de tabagismo, etilismo, DLP e HAS foi realizada por meio de questionário direto ou consulta em prontuário.

A avaliação de dados de medicação foi realizada por meio de questionário ou consulta de prescrição ou de prontuário.

A avaliação da RD foi realizada por meio de retinografia direta com avaliação de sete campos em retinógrafo TRC-NW8 *Non-Mydriatic Retinal Camera* (TOPCOM, NJ, USA). As fotografias foram avaliadas por um único oftalmologista treinado em RD, seguindo a classificação internacional de RD e de edema macular. Os pacientes foram classificados em ausência de RD, RD não proliferativa (RDNP) ou RD proliferativa (RDP).

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. A razão albumina/ creatinina urinária foi utilizada para definir os estágios de DRD. Os pacientes foram classificados como A1 ou normoalbuminúricos (<30mg/g creatinina), A2 ou microalbuminúricos (30 – 300mg/g creatinina) ou A3 ou macroalbuminúricos (>300mg/g creatinina).

A avaliação da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foi realizada pela fórmula de CKD-EPI⁶⁴.

Avaliamos retrospectivamente a TFGe de 257 pacientes da coorte dos pacientes do HC-FMUSP. O intervalo mediano entre as datas da primeira e da última dosagem das creatininas séricas usadas para o cálculo da diferença da TFGe foi de 10 anos.

3.4 Avaliação da Neuropatia Diabética

3.4.1 Neuropatia Periférica

Para diagnóstico de NP, a seguinte avaliação foi realizada: soma das classificações obtidas no Escore de Sintomas Neuropáticos NSS (*Neuropathy Symptoms Score*) modificado e no Escore de Comprometimento Neuropático NDS (*Neuropathy Disability Score*) modificado e simplificado. Esta ferramenta diagnóstica já foi traduzida e validada para o português (Tabelas 3 e 4)^{15, 65}.

Tabela 3 – Escore de Sintomas Neuropáticos: pergunta-se ao paciente as características de sua dor e pontua-se de acordo com a resposta. A partir da soma, os sintomas são classificados em leve, moderado ou grave¹⁵

1. O senhor(a) tem experimentado dor ou desconforto nas pernas?	() Se NÃO, interromper a avaliação () Se SIM, continuar a avaliação
2. Que tipo de sensação mais te incomoda? (descrever os sintomas se o paciente não citar nenhum deste)	() Queimação, dormência ou formigamento (2) () Fadiga, câimbras ou prurido (1)
3. Qual a localização mais frequente deste sintoma descrito?	() Pés (2) () Panturrilha (1) () Outra localização (0)
4. Existe alguma hora do dia em que este sintoma descrito aumenta de intensidade?	() Durante a noite (2) () Durante o dia e a noite (1) () Apenas durante o dia (0)
5. Este sintoma já o acordou durante a noite?	() Sim (1) () Não (0)
6. Alguma manobra que o senhor realiza é capaz de diminuir este sintoma? (descrever as manobras para o paciente se ele não citar nenhuma)	() Andar (2) () Ficar de pé (1) () Sentar ou deitar (0)
Total:	
Classificação de Sintomas:	3 – 4 LEVE 5 – 6 MODERADO 7 – 10 GRAVE

Tabela 4 – Escore de Comprometimento Neuropático: examina-se os pés do paciente e pontua-se de acordo com o resultado encontrado. A partir da soma, os sinais são classificados em leve, moderado ou grave¹⁵

		Direito	Esquerdo
Reflexo Aquileu		() Presente (0) () Ausente (2)	() Presente (0) () Ausente (2)
Sensação	Vibratória Diapazão 128 Hz Articulação interfalangiana hálux Presente = consegue distinguir entre vibrando/ não vibrando	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)
	Dolorosa Palito japonês (face romba e pontiaguda) Próximo a raiz da unha do hálux, suficiente para deformar a pele Presente = consegue distinguir face romba de pontiaguda	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)
	Térmica Diapazão colocado em água gelada e martelo colocado em água morna Região dorsal do pé Presente = consegue distinguir as temperaturas	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)	() Presente (0) () Reduzido/ Ausente (1)
Total			
Classificação de sinais		3-5 LEVE 6-8 MODERADO 9-10 GRAVE	

Para diagnóstico de NP faz-se necessário uma das seguintes condições:

- Presença de sinais moderados ou graves (com ou sem sintomas);
- Presença de sinais leves com sintomas moderados ou graves.

Foram examinados 356 pacientes para NP, tendo sido incluídos na avaliação 346 pacientes (10 pacientes excluídos devido a presença de causas secundárias a NP: 6 com deficiência de vitamina B12, 2 com hipotireoidismo não compensado, 1 com diagnóstico de HIV e 1 com diagnóstico de VHC).

3.4.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular

O diagnóstico de NAC é baseado em uma série de exames que avaliam as funções simpática e parassimpática, com a utilização dos testes indicados na Tabela 5. Para análise destes resultados, foi utilizado o programa Poly-Spectrum, versão 4.8.143.

Tabela 5 – Testes utilizados para avaliação da neuropatia autonômica cardiovascular

Parassimpático	Simpático
Frequência cardíaca de repouso	Avaliação VLF na análise espectral
Relação E:I [#]	Avaliação da PA em ortostase [#]
Relação 30:15 [#]	
Relação de Valsalva [#]	
Avaliação HF da análise espectral	

[adaptado de Vinik AI⁶⁶]

Relação E:I: relação expiração: inspiração profunda, HF: *high frequency*, VLF: *very low frequency*, PA: pressão arterial

[#]Testes de Ewing

3.4.2.1 Testes de Ewing^{18, 66, 67}

- **Variação da frequência cardíaca (FC) à respiração profunda** (*Beat-to-beat variation with deep breathing – E [expiration]: I [inspiration] ratio*) – a variação da FC com a respiração depende da inervação parassimpática. Estando em repouso, em decúbito dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente é orientado a realizar manobras de inspiração e expiração profunda, com duração de 5 segundos cada uma (aproximadamente 6 respirações por minuto). A variação de sua FC é mensurada durante esta manobra. Com esta manobra, ocorre uma ativação do sistema simpático

durante a inspiração e uma contra regulação do parassimpático durante a expiração. A razão E:I é obtida pela divisão da FC máxima pela FC mínima.

- **Relação da FC sob Manobra de Valsalva** – esta manobra é mediada pela alternância da ativação das fibras parassimpáticas e simpáticas. Em indivíduos saudáveis, o reflexo de resposta à Manobra de Valsalva inclui taquicardia e vasoconstrição periférica durante a manobra, seguido de bradicardia após a liberação da manobra. Estando em repouso em decúbito dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente é orientado a manter uma expiração constante com força de 40 mmHg aferida por um manômetro, durante 15 segundos. Espera-se que durante a Valsalva o paciente faça uma taquicardia (que é máxima em torno do 14º segundo) e após ocorra uma bradicardia reflexa (que ocorre durante os 30-45 segundos seguintes a taquicardia). A razão de Valsalva é a relação entre a taquicardia e a bradicardia máximas.

- **Relação 30:15 após ortostase** (*30:15 heart rate ratio with standing*) – em indivíduos saudáveis, há um aumento da FC em resposta à ortostase que é máxima ao redor do 15º batimento após a mudança de posição (maior atuação do simpático). Esta é seguida por uma bradicardia relativa, que é máxima ao redor do 30º batimento após a mudança de posição (maior atuação do parassimpático). Estando em repouso, em decúbito dorsal e em monitorização eletrocardiográfica, o paciente é orientado a ficar em ortostase. A avaliação da relação destes dois momentos é chamada de relação 30:15.

- **Avaliação da pressão arterial (PA)** – mensura-se a PA em decúbito e em ortostase após o 3º minuto após a mudança de posição.

Os valores de normalidade para os testes avaliados de Valsalva, índice 30:15, relação E:I e análise espectral da VFC são baseadas em estudos prévios⁶⁷⁻⁶⁹. Foi considerada presença de hipotensão postural uma queda > 20 mmHg da PA sistólica após a mudança de posição, após 3 minutos em ortostase.

3.4.2.2 Avaliação da Variabilidade da Frequência Cardíaca

A Variabilidade da FC (VFC) pode ser avaliada calculando-se os índices dos intervalos R-R, seja sob a forma de análise baseada em função do tempo (*time-domain analyses*) ou em função da frequência (*frequency-domain analysis*).

Para a análise baseada na frequência, utiliza-se a análise espectral de uma matriz. A análise espectral envolve a decomposição de uma sequência seriada de intervalos R-R em uma soma de funções sinusoidais de diferentes amplitudes e frequências realizadas por diversas abordagens matemáticas (como transformação de *fast* Fourier ou modelos auto-regressivos). O resultado (poder espectral) pode ser exibido como a magnitude da variabilidade em função da frequência. Em outras palavras, o poder do espectro reflete a amplitude das flutuações da FC presentes em diferentes oscilações de frequência. O poder do espectro da VFC é composto por 3 picos predominantes^{66, 70}:

- **Componente de muito baixa frequência** (*Very Low Frequency* – VLF), abaixo de 0,4Hz – relacionado às flutuações no tônus vasomotor associado com termorregulação. Mediado primariamente pelo sistema nervoso simpático;

- **Componente de baixa frequência** (*Low Frequency* – LF), ao redor de 0,1Hz – Mediado pelo sistema nervoso simpático, com modulação vagal;

- **Componente de alta frequência** (*High Frequency* – HF), ao redor de 0,25Hz – relacionado à atividade respiratória. Mediado pelo sistema nervoso parassimpático.

A avaliação da análise espectral da FC é realizada pela manhã, estando o paciente em repouso, sem ingestão de café por 8 horas, em jejum de, no mínimo, 2 horas, sem estar em hipoglicemia e sem utilizar drogas que alterem a FC. O paciente é então monitorizado e o traçado eletrocardiográfico é avaliado pelo programa Poly-Spectrum. A vantagem da avaliação da análise espectral da VFC é que é um exame que não precisa de cooperação ativa do paciente. Os resultados obtidos são comparados com uma padronização baseada em faixa etária e sexo⁶⁸.

Utilizando estes sete parâmetros, com especificidade de 100%, o diagnóstico de NAC foi feito da seguinte forma⁷⁰:

- Sem NAC: 0 ou 1 teste alterado
- NAC incipiente ou *borderline*: 2 testes alterados
- NAC instalada: ≥ 3 testes alterados ou presença de hipotensão postural

Para a presente avaliação, foi considerada como presença de NAC clínica o diagnóstico de NAC instalada.

Foram examinados 357 pacientes para presença de NAC, tendo sido incluídos na avaliação 342 pacientes (15 pacientes excluídos da avaliação devido ao uso de beta bloqueadores).

3.5 Extração do DNA

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram colhidos 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*, conforme previamente descrito⁷¹. O *pellet* final foi ressuspensionado em 50 – 200 µl H₂O miliQ estéril e incubado a 37°C durante 15 minutos. O DNA assim obtido ficou armazenado a temperatura de –20°C.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Foi utilizado o equipamento de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), que permite o processamento de 96 amostras de DNA simultaneamente (em placas). Este ensaio de genotipagem detecta as variantes alélicas de um SNP, sem quantificar o alvo.

Para preparação da reação de PCR, foram utilizados: *TaqMan Genotyping Master Mix* (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs sem dUTP, referência passiva e *mix* de componentes otimizados) e *TaqMan SNP Genotyping Assays* (contém 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*). 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 dye* VIC, e a sonda do alelo 2 é marcada com o *Reporter dye* FAM, que apresentam fluorescências diferentes durante a reação.

O sinal de fluorescência gerado pela amplificação de PCR indica quais alelos estão presentes na amostra.

Durante a reação, primeiramente a sonda contendo os fluoróforos se liga à fita de DNA, essas fluorescências são chamadas *Quencher* (molécula inibidora) e *Reporter* (molécula que emitirá a fluorescência). Em seguida, o *primer* se liga à fita de DNA e a enzima Taq DNA polimerase começa a estendê-lo, adicionando os nucleotídeos. Neste momento o *software* começa a registrar a reação. Quando a DNA polimerase encontra a sonda, o *Reporter* e o *Quencher* são separados e a emissão de fluorescência do *Reporter* não é mais absorvida pelo *Quencher*, resultando em um aumento de fluorescência que é detectada.

O *software* StepOne normaliza a fluorescência do *Reporter dye* com o *dye* da referência passiva em cada amostra. Em seguida, o *software* coloca as intensidades normalizadas (R_n) do *reporter dye* em um Gráfico de Discriminação Alélica, que contrasta as intensidades do *reporter dye* das sondas alelo-específicas. De acordo com a posição nesse gráfico, gera-se o resultado do genótipo de cada amostra.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartilico, exceto quando especificado de outra maneira. Os dados que apresentaram rejeição da normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* W foram logaritmizados para as análises e em caso de persistência da rejeição ao teste, a alternativa não-paramétrica foi utilizada. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis, de acordo com a rejeição ou não no teste de normalidade, com pós teste de Tukey-HSD, teste de chi-quadrado e teste exato de Fischer. 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 os SNPs que falharam neste teste não foram utilizados nas análises de associação com a NP ou a NAC.

As associações dos SNPs com a NP e NAC foram verificadas por modelos de regressão. Para as análises realizadas com a prevalência de NP e de NAC, foi utilizado o modelo de regressão logística nominal. Os resultados foram expressos de acordo com o *Odds Ratio* (OR) para presença de NP/ NAC *versus* ausência de NP/ NAC, no modelo de regressão logística nominal, juntamente com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%. O modelo co-dominante foi utilizado: os dados dos genótipos foram classificados de acordo com o número de alelos polimórficos (0; 1 ou 2) e o OR foi computado para o número de alelos polimórficos como variáveis quantitativas (1 vs. 0 e 2 vs. 1 cópias, com o menor número de cópias de cada par considerado como apresentando um OR de 1).

Ajustes para outras variáveis clínicas e biológicas foram realizados mediante a inclusão dessas variáveis como co-variáveis no modelo de regressão. A correção para múltiplas comparações devido aos múltiplos *SNPs* testados foi feita pela correção de Bonferroni e desta forma, foi considerado significativo $P < 0,016$ ($0,05$ dividido pelos três *SNPs* avaliados, uma vez que dois *SNPs* não foram avaliados quanto à associação com NP e NAC por suas distribuições não estarem consistentes com o EHW). As análises estatísticas foram realizadas com o *software JMP (SAS Institute, Cary, NC)* e *software* de livre distribuição R⁷².

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas dos pacientes

5.1.1 Neuropatia Periférica

A Tabela 6 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com e sem NP.

Tabela 6 – Características dos pacientes com e sem neuropatia periférica

	Sem NP	Com NP	Valor de <i>P</i>
N	229	117	
Idade (Anos)	31 (25 – 39)	36 (29,5 – 44)	<0,0001
Sexo: Feminino/ Masculino (%)	63,8 / 36,2	55,7/ 45,3	0,10
Idade ao Diagnóstico (Anos)	11 (6 – 18)	12 (7 – 18)	0,23
Tempo de DM (Anos)	19 (15 – 25)	23 (17 – 31)	0,0003
Tabagismo [#] (%)	10 / 83,4 / 6,5	13,7/ 79,8/ 6,8	0,58
Etilismo [#] (%)	4/ 92/ 4	6/ 87,2/ 6,8	0,34
Altura (cm)	160 (150 – 168)	163 (153 – 171)	0,032
IMC (kg/m ²)	24,5 (22,1 – 26,8)	23,4 (21,1 – 28,1)	0,12
Circunferência Abdominal (cm)	86 (80 – 92)	87,2 (80 – 100)	0,17
Dose de Insulina (UI/Kg)	0,63 (0,47 – 0,81)	0,60 (0,42 – 0,81)	0,22
HAS (%)	30,8	53	<0,0001
DLP (%)	36,2	53	0,004
Colesterol (mg/dL)	172 (149 – 196)	171 (145 – 194)	0,95
Triglicérides (mg/dL)	75 (57 – 97)	85 (64 – 121)	0,005
Uso de estatinas (%)	34,9	41	0,29
HbA1c (%)	8,3 (7,4 – 9,2)	8,3 (7,3 – 10)	0,85
TFGe (mL/min/1,73m²)	104 (85 – 118)	70 (20 – 100)	<0,0001
Uso de IECA (%)	28,4	36,7	0,14
Albuminúria[#] (%)	79 / 14,3/ 6,7	52/ 16,3/ 31,7	<0,0001
Retinopatia[#] (%)	40,9/ 41,8/ 17,3	13,7/ 30,8/ 55,6	<0,0001
NAC clínica (%)	21,5	50,9	<0,0001
NAC subgrupos[#] (%)	67,1/ 11,4/ 21,5	34/ 15,1/ 50,9	<0,0001

Resultados expressos como mediana e intervalo interquartilico. Análise estatística das variáveis realizadas com o teste T de Student utilizando dados logaritmizados.

IMC: índice de massa corpórea; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; NP: neuropatia periférica

[#]Tabagismo: Ex-tabagista, Não, Sim; Etilismo: Ex-etilista, Não, Sim; Albuminúria: A1, A2, A3; Retinopatia: Ausente, Não proliferativa, Proliferativa; NAC subgrupos: Ausente, Incipiente, Instalada

P≤0,05 foi considerado significante

Dos 346 pacientes incluídos na avaliação, 117 apresentavam NP (33,8%).

Observa-se que os pacientes com NP quando comparados aos sem NP são mais velhos [36 (29,5 – 44) vs. 31 (25 – 39) anos] e têm mais tempo de DM [23 (17 – 31) vs. 19 (15 – 25) anos]. Além disso, os pacientes com NP são mais altos que os pacientes sem NP (163 cm vs. 160 cm).

Em relação às comorbidades, os pacientes com NP, quando comparados aos sem NP, têm mais DLP (53% vs. 36,2%,) e mais HAS (53% vs. 30,8%).

Os pacientes com NP, quando comparados aos sem NP, apresentam concentrações mais elevadas de TG [85 (64 – 121) vs. 75 (57 – 97) mg/dL], TFGe menor [70 (20 – 100) vs. 104 (85 – 118) mL/min/1,73m²] e maior prevalência de albuminúria A2 e A3 (16,3/ 31,7% vs. 14,3/ 6,7%, reepectivamente).

Os pacientes com NP, quando comparados aos pacientes sem NP, apresentam maior prevalência da forma proliferativa de retinopatia (55,6% vs 17,3%) e maior prevalência de NAC clínica (21,5% vc 50,9%).

5.1.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular

A Tabela 7 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com e sem NAC.

Tabela 7 – Características dos pacientes sem e com neuropatia autonômica cardiovascular clínica

	Sem NAC clínica	Com NAC clínica	Valor de P
N	243	99	
Idade (Anos)	34 (27 – 43)	33 (26- 42)	0,53
Sexo: Feminino/ Masculino (%)	61,3/38,7	62,6/37,4	0,82
Idade ao Diagnóstico (Anos)	12 (6 – 19)	11 (7 – 18)	0,46
Tempo de DM (Anos)	20 (15 – 27)	21 (15 – 28)	0,98
Tabagismo [#] (%)	12,5/ 80/ 7,5	10,2/ 83,7/ 6,1	0,74
Etilismo[#] (%)	3/ 92/ 5	11,3/ 84,6/ 4,1	0,008
IMC (kg/m ²)	24,3 (22,0 – 26,5)	23,3 (21,1 – 27,3)	0,18
Circunferência Abdominal (cm)	86 (80 – 93,4)	85,5 (79 – 95)	0,9
Dose de Insulina (UI/kg)	0,62 (0,44 – 0,82)	0,59 (0,44 – 0,78)	0,53
HAS (%)	30,4	52	0,0003
DLP (%)	38,7	51	0,04
Colesterol (mg/dL)	171 (149 – 193)	176 (147 – 211)	0,19
Triglicérides (mg/dL)	75 (57 – 96)	89 (63 – 129)	0,0007
Uso de estatinas (%)	35,4	40,8	0,38
HbA1c (%)	8,2 (7,3 – 9,0)	8,5 (7,5 – 10,2)	0,01
Uso de IECA (%)	29,2	40,8	0,004
TFGe (mL/min/1,73m²)	100 (78 – 115)	85 (16 – 106)	0,0002
Albuminúria[#] (%)	78,5/ 15,5/ 6	49,4/ 15/ 35,6	<0,0001
Retinopatia[#] (%)	38,6/ 38,6/ 22,8	22,4/ 33,7/ 43,9	0,0003
Neuropatia Periférica (%)	24,9	52,7	<0,0001

Resultados expressos como mediana e intervalos interquartílicos. Análise estatística das variáveis realizadas com o teste T de Student utilizando dados logaritmizados.

IMC: índice de massa corpórea, HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IECA: inibidores da enzima conversora da angiotensina; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular

[#]Tabagismo: Ex-tabagista, Não, Sim; Etilismo: Ex-etilista, Não, Sim; Albuminúria: A1, A2, A3; Retinopatia: Ausente, Não proliferativa, Proliferativa;

P≤0,05 foi considerado significativo

Dos 342 pacientes incluídos na avaliação, 99 (28,9%) apresentavam o diagnóstico de NAC.

Os pacientes com NAC, quando comparados aos pacientes sem NAC, têm maior prevalência de HAS (52% vs. 30,4%) e DLP (51% vs. 38,7%). Além disso, há uma maior prevalência de pacientes ex-etilistas no grupo NAC (11,3% vs. 3%).

Em relação à avaliação laboratorial, os pacientes com NAC apresentam maiores concentrações de TG que os pacientes sem NAC [89 mg/dL (63 – 129) vs. 75 mg/dL (57 – 96)] e HbA1c maior [8,5% (7,5 – 10,2) vs. 8,2% (7,2 – 9,0)].

Em relação às demais complicações microvasculares, os pacientes com NAC apresentam menor TFGe quando comparados aos sem NAC [85 (16 – 106) vs. 100 mL/min/1,73m² (78 – 115)], maior prevalência de albuminúria A3 (16,3/ 31,7% vs. 14,3/ 6,7%) e maior prevalência de RDP (43,9% vs. 22,8%)

Os pacientes com NAC apresentam maior prevalência de NP quando comparados aos sem NAC (52,7% vs 24,9%).

5.2 Polimorfismos

5.2.1 GPX4

Não houve associação do polimorfismo rs713041 com a NP (Tabela 8).

A presença do alelo T deste polimorfismo conferiu proteção contra a NAC na população com DM1 estudada (Tabela 9).

Tabela 8 – Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene *GPX4* de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população estudada

Genótipos	Sem NP	Com NP	OR (IC 95%) para NP	Valor de P
rs713041				
CC	0,297	0,353	1,26 (0,61-2,62)	0,53
CT	0,507	0,457		
TT	0,196	0,190		
MAF	0,449	0,418		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NP: neuropatia periférica

Tabela 9 – Frequência genotípica do polimorfismo rs713041 no gene *GPX4* de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular clínica para a população estudada

Genótipos	Sem NAC	Com NAC	OR (IC 95%) para NAC	P
rs713041			0,39 (0,17 – 0,84)	0,0165
CC	0,285	0,384		
CT	0,517	0,515		
TT	0,198	0,101		
MAF	0,455	0,358		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular

$P \leq 0,0166$ foi considerado significativo

5.2.2 GCLC

Não houve associação entre o polimorfismo rs1788390 no gene *GCLC* com os desfechos NP e NAC avaliados (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Frequência genotípica do polimorfismo rs1788390 no gene *GCLC* de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população estudada

Genótipos	Sem NP	Com NP	OR (IC 95%) para NP	Valor de P
rs17883901			0,99 (0,53 – 1,88)	0,97
CC	0,860	0,845		
CT	0,122	0,138		
TT	0,018	0,017		
MAF	0,079	0,086		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NP: neuropatia periférica

Tabela 11 – Frequência genotípica do polimorfismo rs1788390 no gene *GCLC* de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular clínica para a população estudada

Genótipos	Sem NAC	Com NAC	OR (IC 95%) para NAC	Valor de P
rs17883901			1,24 (0,65 – 2,25)	0,50
CC	0,855	0,848		
CT	0,124	0,121		
TT	0,021	0,031		
MAF	0,083	0,090		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NAC: neuropatia autonômica clínica

5.2.3 CYBB

A análise do polimorfismo rs6610650 foi feita apenas para o sexo feminino, pois o gene *CYBB* encontra-se no cromossomo X e este SNP não se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos homens.

Não houve associação do polimorfismo rs1788390 com os desfechos NP e NAC avaliados (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 – Frequência genotípica do polimorfismo rs661065 no gene *CYBB* de acordo com o diagnóstico de neuropatia periférica para a população feminina

Genótipos	Sem NP	Com NP	OR (IC 95%) para NP	Valor de <i>P</i>
rs6610650				
Mulheres			1,37 (0,49 – 3,99)	0,55
GG	0,476	0,556		
AG	0,441	0,365		
AA	0,083	0,079		
MAF	0,304	0,262		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NP: neuropatia periférica

Tabela 13 – Frequência genotípica do polimorfismo rs661065 no gene *CYBB* de acordo com o diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular clínica para a população feminina

Genótipos	Sem NAC	Com NAC	OR (IC 95%) para NAC	Valor de <i>P</i>
rs6610650				
Mulheres			0,89 (0,52 – 1,49)	0,67
GG	0,480	0,548		
AG	0,432	0,355		
AA	0,088	0,097		
MAF	0,371	0,304		

OR (*odds ratio*) e Intervalo de Confiança (IC) 95% para o alelo raro em um modelo co-dominante de regressão logística ajustada para sexo, idade, tempo de DM, IMC, HbA1c, TG, TFGc.

MAF: frequência do alelo raro; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular

5.2.4 *CYBA* e *TXNIP*

As distribuições dos genótipos dos SNPs estudados nos genes *CYBA* e *TXNIP* não foram consistentes com o EHW, razão pela qual a associação desses SNPs com NP e NAC não foi avaliada.

5.3 Associação entre complicações

5.3.1 Neuropatia Periférica

A Figura 8 demonstra as relações de risco entre os pacientes com NP e a presença de NAC e de complicações renais e de retina.

Figura 8 – Avaliação do risco (expresso em *odds ratio*) determinado pela presença de neuropatia periférica para a presença de neuropatia autonômica cardiovascular, para os graus de albuminúria e para os graus de retinopatia A1: albuminúria A1; A2: albuminúria A2; A3: albuminúria A3; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; NP: neuropatia periférica; OR: *odds ratio*. RD: retinopatia diabética; RDNP: retinopatia diabética não proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa; $P \leq 0,05$ foi considerado significativo

Os pacientes com NP também foram avaliados em relação ao seu risco de apresentar a forma incipiente e instalada da NAC, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Avaliação de risco (expresso em *odds ratio*) entre a presença de neuropatia periférica e o grau de neuropatia autonômica cardiovascular
NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; NP: neuropatia periférica;
 $P \leq 0,05$ foi considerado significativo

Na análise retrospectiva da TFGe de 257 pacientes, a queda anual da TFGe foi significativamente maior nos pacientes com NP em relação aos pacientes sem essa complicação microvascular, mesmo após ajuste para potenciais fatores de confusão, conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10 – Comparação entre a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes com e sem neuropatia periférica

NP: neuropatia periférica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

Ajustado para idade ao diagnóstico, idade atual, HbA1c e TFGe inicial

$P \leq 0,05$ foi considerado significativo

5.3.2 Neuropatia Autonômica Cardiovascular

A Figura 11 demonstra as relações de risco entre os pacientes com NAC clínica e a presença de NP e de complicações renais e de retina.

Figura 11 – Avaliação do risco (expresso em *odds ratio*) determinado pela presença de neuropatia autonômica cardiovascular para a presença de neuropatia periférica, para os graus de albuminúria e para os graus de retinopatia

A1: albuminúria A1; A2: albuminúria A2, A3: albuminúria A3; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; NP: neuropatia periférica; OR: *odds ratio*. RD: retinopatia diabética; RDNP: retinopatia diabética não proliferativa; RDP: retinopatia diabética proliferativa;

$P \leq 0,05$ foi considerado significativo

Na análise retrospectiva da TFGe de 257 pacientes, a queda anual da TFGe foi significativamente maior nos pacientes com NAC clínica em relação aos pacientes sem essa complicação microvascular, mesmo após ajuste para potenciais fatores de confusão, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Comparação entre a taxa de filtração glomerular estimada em pacientes com e sem neuropatia autonômica cardiovascular
NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; TFGGe: taxa de filtração glomerular estimada
Ajustado para idade ao diagnóstico, idade atual, HbA1c e TFGGe inicial
 $P \leq 0,05$ foi considerado significativo

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Polimorfismos

Os polimorfismos estudados foram escolhidos por estarem em genes que codificam proteínas de sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, o que os torna potenciais candidatos a participarem da susceptibilidade para o desenvolvimento das complicações do DM.

O principal achado deste estudo foi que a presença do alelo T no polimorfismo rs713041 no gene *GPX4* (GPx4c718t) conferiu proteção para a NAC clínica na população com DM1 estudada.

Para melhor entendimento de como este SNP na *GPX4* poderia influenciar a susceptibilidade a NAC, é importante a compreensão do funcionamento do grupo GPX de selenioproteínas, de como elas organizam-se de forma hierárquica e o papel da concentração de selênio no grau de sua atividade enzimática.

As selenioproteínas apresentam um sítio de ligação com o selênio, denominado SECIS (sequência de inserção da seleniocisteína). A região 3'-UTR tem um papel fundamental na formação das selenioproteínas, por conter as estruturas necessárias para a incorporação do selênio na proteína. Sem estas estruturas, a tradução pararia no códon UGA, resultando em uma proteína truncada. Por essa razão, aventou-se a possibilidade de que variantes genéticas desta região pudessem alterar a função da proteína. No estudo que primeiro descreveu o polimorfismo GPX4c718t, rastreou-se em 66 voluntários a região 3'UTR do gene *GPX4* e observou-se a variante T/C na posição 718⁷³.

Na Figura 13 é possível observar a relação entre a região SECIS, a região 3'UTR e a posição do polimorfismo 718.

Figura 13 – Representação da estrutura da selenioproteína GPX4 e posição do polimorfismo 718 [adaptado de Villete S *et al.*⁷³]
SECIS: sequência de inserção da seleniocisteína

A incorporação do selênio é determinante para a função deste grupo de proteínas e o grau de suprimento nutricional de selênio será determinante para definir alguns fatores relacionados a síntese das GPXs, de uma maneira geral, e da GPX4, em particular.

A síntese das selenioproteínas é regida por uma hierarquia, que é fruto da competição entre as diferentes GPX pelo selênio disponível: algumas desaparecem rapidamente em situações de deficiência de selênio, enquanto outras continuam estáveis⁴¹. Nesta hierarquização, a GPX4 tem maior afinidade pelo selênio que a GPX1, fato importante em situações de deficiência deste elemento. Em tecidos nos quais a GPX1 é a glutathiona peroxidase mais importante, situações de deficiência de selênio resultam em estresse oxidativo,

pois a maior afinidade da GPX4 pelo selênio resultará em mais formação desta, em detrimento da GPX1^{56, 74}.

Na deficiência de selênio também ocorre um aumento da afeição do sítio de ligação de selênio para o aminoácido cisteína (Cys). Este aumento de GPX4-Cys em detrimento da GPX4-Sel leva a uma menor atividade antioxidante da GPX4 (em torno de 100 vezes), levando a um acúmulo de EROs e NO⁷⁵.

Além destes fatores supracitados, variantes genéticas no gene *GPX4* podem alterar o metabolismo e grau de atividade desta proteína, de acordo com o grau de suprimento dietético de selênio. O polimorfismo rs713041 na região 3'UTR já teve seu papel funcional demonstrado no primeiro estudo que o descreveu: metabólitos da linfócito-5-lipoxigenases estavam em diferentes concentrações de acordo com o genótipo deste polimorfismo⁷³.

Outro estudo experimental confirmou seu papel funcional: em situações de deficiência de selênio, células com a variante C deste polimorfismo demonstraram menor viabilidade após estresse oxidativo, aumento dos níveis de EROs e menor atividade da GPX4, quando comparadas com células com a variante T⁷⁶. Clinicamente, já foram observadas associações deste polimorfismo com o aumento do risco para doença cardiovascular, câncer de próstata e câncer colo-retal^{56, 74}.

Neste sentido, pode-se entender que tanto a concentração de selênio quanto o polimorfismo têm importância na capacidade antioxidante da GPX4.

No estudo realizado por Catherine Méplan *et al.*⁵⁵, observou-se mais alguns dados interessantes: 1) indivíduos com o genótipo CC mantêm concentrações de GPX4 maiores que indivíduos com genótipo TT em situações

de deficiência de selênio; 2) o polimorfismo GPX4c718t influencia a posição da GPX4 na hierarquia das demais selenioproteínas; 3) há diferença por gênero no papel do polimorfismo GPX4c718t: mulheres com genótipo TT, em situação de deficiência de selênio, apresentaram menores concentrações proteicas da GPX4, quando comparadas às mulheres portadoras dos genótipos CC e CT.

Em estudo prévio de nosso laboratório, a presença do alelo T também mostrou papel protetor para a DRD na população masculina com DM1⁵⁷.

No sistema nervoso central, já foi demonstrada que há uma diminuição da atividade enzimática da GPX4 na Demência de Alzheimer, demonstrando um papel específico e primordial da função antioxidante no neurônio central⁴¹.

No sistema nervoso periférico, embora a concentração de GSH represente apenas 10% da concentração do sistema nervoso central⁷⁷, acredita-se que a base fisiopatológica para dano neural por estresse oxidativo seja semelhante àquela do sistema nervoso central. Já foi demonstrada, por exemplo, a neurodegeneração em situação de depleção de *GPX4 in vivo* e *ex vivo*⁴³. Além disso, camundongos *knock out* para o *GPX4* apresentaram atrofia muscular grave e morte após curto espaço de tempo, indicando que o *GPX4* é um gene fundamental para a sobrevivência de neurônios motores em animais adultos⁷⁸. Neste mesmo estudo, observou-se que não ocorreu nenhuma neurodegeneração nos neurônios cerebrais nestes camundongos *knock out* para a *GPX4*. Este dado nos mostra que mesmo dentro da população neuronal, a GPX4 têm papéis e importâncias diferentes – sendo vital para um subtipo e passível de substituição em outro.

O nosso estudo é o primeiro estudo clínico a sugerir a participação do *GPX4* na defesa antioxidante do sistema nervoso autonômico. Salientamos, no

entanto, que nossos resultados são contraditórios aos encontrados nos estudos funcionais realizados pelo grupo de Catherine Méplan⁵⁵, nos quais os indivíduos com o genótipo CC tinham concentrações de GPX4 maiores que indivíduos com genótipo TT (que, no nosso estudo, seriam os protegidos). Neste momento não temos uma justificativa para este achado. Uma hipótese que pode ser aventada é a de que o tecido nervoso periférico autonômico também apresente uma hierarquia de glutathione peroxidases e a GPX4 não seja a mais importante.

Os demais polimorfismos avaliados não apresentaram associação com a ND. Apesar da presença do alelo A do polimorfismo rs6610650 no gene *CYBB*⁵⁷, da presença do alelo T do polimorfismo -675T/A no gene *CYBA* e da presença do alelo T do polimorfismo rs17883901 no gene *GCLC*⁵⁹ terem se mostrado de risco para o desenvolvimento de DRD, nenhuma associação foi observada com a NP ou com a NAC. Estes achados reforçam o fato da fisiopatologia das microcomplicações ter aspectos diferentes entre si, o que justifica o fato de alguns pacientes apresentarem uma microcomplicação em detrimento da outra. Também reforça a necessidade da busca de marcadores laboratoriais particulares para cada complicação.

Finalmente, reforçamos a importância da busca de marcadores genéticos como fatores de risco ou de proteção ao desenvolvimento de complicações de DM de uma maneira também particular, visando-se realizar intervenções com foco nestes marcadores ou nos produtos que eles expressam.

Os dados relacionados ao *TXNIP* e ao *CYBB* não estão demonstrados, pois estes não se encontravam em EHW na nossa população.

6.2 Achados clínicos

A ND é uma complicação microvascular do DM bastante negligenciada do ponto de vista de diagnóstico e de tratamento. Acredita-se que seja a microcomplicação mais prevalente do DM⁵. Em nossa casuística, a NP esteve presente em 33,8% dos pacientes, enquanto que a DRD esteve presente em 29,2% e a RD, em 68,4%. Dos 117 pacientes com NP, 21 (17,9%) não apresentavam sintomas relacionados a esta condição, tendo sido diagnosticados com base na avaliação de sinais. Isto reforça a necessidade da realização de exame físico direcionado em todos pacientes com DM, independentemente da presença de sintomas.

Em relação à NAC clínica, também se observou uma prevalência elevada (31,5%). Embora não considerada clinicamente significativa, chama a atenção o diagnóstico da forma incipiente em 44 pacientes (12,7%). Ainda não é possível estabelecer o impacto clínico desta forma assintomática de NAC, apesar de já ser bem estabelecida a relação entre mortalidade cardiovascular e presença de NAC clínica em pacientes com DM⁶⁶. Possivelmente, assim como nas formas incipientes das demais complicações, o reconhecimento do diagnóstico de NAC incipiente nos leve a realizar um controle mais intensivo dos fatores de risco conhecidos para neuropatia, com o intuito de diminuir a sua evolução. Além disso, o reconhecimento da existência de uma forma incipiente nos leva a ter maior conhecimento sobre a evolução desta complicação e, possivelmente, diferenciar padrões de acometimentos diferentes, tendo em vista que atualmente os pacientes são classificados apenas com diagnóstico presente ou ausente da NAC, sem estratificação de gravidade do mesmo.

Para o presente estudo, consideramos apenas os pacientes com NAC clínica, tendo em vista os dados disponíveis de literatura.

Os nossos pacientes com NP apresentavam maior tempo de DM, com uma mediana de 23 anos. É descrito que a prevalência da ND, assim como das demais complicações, é tempo e glicemia dependente^{14, 79} (embora nossos pacientes tenham mediana recente de HbA1c semelhantes). Em pacientes com DM2, já observou-se a presença de ND mesmo naqueles pacientes com diagnóstico recente ou mesmo com pré-DM⁸⁰. Este dado pode, no entanto, refletir o tempo de exposição à hiperglicemia em estágios pré diabéticos, bem como a interferência de outros fatores de risco.

Em coorte de pacientes com DM1, a maior prevalência ocorre após os 10 anos de diagnóstico, sendo crescente no seguimento posterior. Contudo, já se observou a presença da ND assintomática em pacientes com hiperglicemia importante e diagnóstico por tempo menor que 10 anos^{81, 82}. Sendo assim, diferentemente das demais microcomplicações (RD e DRD), em que já é bem estabelecido na literatura o momento do início de seu rastreamento em DM1 (cinco anos de doença) ainda não é possível estabelecer o tempo de DM mais apropriado para o início do rastreamento desta complicação, embora também seja preconizada a mesma recomendação⁷⁹. O fato de o tempo de DM ser relativamente longo nos nossos pacientes deve-se ao tempo mínimo de 10 anos de doença utilizado como critério de inclusão. Este viés pode ser corrigido em estudo futuro, realizando-se avaliação de todos pacientes desde o diagnóstico.

Um dado interessante observado no presente estudo é o fato de pacientes com NP serem mais altos que os pacientes sem NP. Este dado já foi

sugerido no passado⁸³ e é concordante com a base fisiopatológica da ND, na qual a porção distal do nervo mais longo é mais precocemente acometida.

Em relação às comorbidades, tanto para a NP quanto para a NAC, os pacientes apresentavam maior prevalência de HAS e maiores concentrações de TG, mesmo que estes últimos ainda estejam dentro dos valores desejáveis para pacientes com DM (< 150 mg/dL). Este achado pode representar apenas uma variável de confusão, visto que a DRD, que sabidamente cursa com HAS e elevação das concentrações de TG, também foi mais prevalente nos pacientes com ND. No entanto, é possível que representem fatores de risco para o desenvolvimento da ND. Estudos prévios já demonstraram a possível relação da resistência à insulina (RI) em pacientes com DM1 e o desenvolvimento de complicações⁸⁴.

Além disso, pacientes com DM1, diferentemente dos pacientes com DM2, costumam apresentar valores de TG menores que a população geral⁸⁵. Sendo assim, valores um pouco mais elevados, mas ainda dentro do valor estabelecido como referência, podem representar uma RI nesta população, podendo representar um fator de risco adicional para o desenvolvimento de microcomplicações e levanta o questionamento se não deveríamos estabelecer metas de TG diferentes para a população com DM1. Um contraponto para esta hipótese de maior RI nestes pacientes é o fato de outras variáveis avaliadas que também poderiam refletir a RI, como dose de insulina por quilograma de peso, IMC e circunferência abdominal, não diferirem entre os grupos com e sem ND. Sendo assim, estes dados sugerem que a diferença nos valores de TG reflita mais a função renal que a RI.

O uso de estatinas é um ponto que ainda gera polêmica no desenvolvimento da ND. Enquanto que para o músculo a estatina é conhecidamente uma droga com potencial tóxico, para o nervo ainda não se tem esta resposta, com resultados ambíguos na literatura⁸⁶. Nossa casuística não ajudou a esclarecer esta questão, não havendo diferença no uso da estatina nos diferentes grupos de ND.

A maior prevalência da DRD e da RD em pacientes com ND é um dado esperado e confirmado em nossa casuística, visto que se acredita que o estresse oxidativo em vigência de hiperglicemia acometa todos esses tecidos-alvo. Um dado inédito encontrado em nosso estudo foi o OR crescente da NP em relação à gravidade de NAC. Não é possível estabelecer se a NP é um fator de risco adicional ao desenvolvimento de NAC, um marcador de susceptibilidade ao desenvolvimento desta ou apenas um marcador de exposição aos fatores de risco. De qualquer forma, tendo em vista o aumento de mortalidade cardiovascular de pacientes com NAC e tendo em vista a dificuldade do diagnóstico de NAC, estudos futuros seriam de grande interesse para confirmar esta correlação – e com isso possivelmente considerar o paciente com NP como sendo de alto risco cardiovascular. A associação de risco cardiovascular entre diferentes complicações já foi realizada em estudo prévio: Cazzaruso *et al.*⁸⁷ demonstraram que a presença de disfunção erétil em pacientes com DM2 tem valor preditivo positivo de 100% para alteração de cateterismo coronariano. Uma revisão da literatura mostrou a relação positiva para a presença de RD, DRD e NAC em pacientes DM, embora não para todos os graus das complicações⁵³.

Ainda esmiuçando as associações entre as complicações, tivemos a oportunidade de avaliar retrospectivamente a TFG_e em 257 pacientes da coorte do HC-FMUSP. Observou-se que os pacientes com NP apresentavam queda de *clearance* anual maior que os pacientes sem NP (-4,74 vs. -1,22 mL/min/ano, respectivamente, $P < 0,0001$), dado também observado nos pacientes com NAC quando comparados aos sem NAC (-3,74 vs -1,54 mL/min/ano, respectivamente, $P < 0,0001$), com uma mediana de seguimento de 10 anos.

Em estudo recente, comparou-se a evolução da TFG_e em pacientes normoalbuminúricos sem e com NAC e esta foi significativamente pior neste grupo⁸⁸. Diferentemente das demais associações, em que não é possível estabelecer causalidade ou efeito paralelo, aqui pode-se aventar uma causalidade da NAC na DRD, já que são pacientes A1 e com função renal normal. A relação de causa residiria no papel da deterioração da função renal quando exposta à maior atividade simpática (uma vez que o sistema nervoso parassimpático é acometido antes do que o simpático). Em nossa análise retrospectiva, infelizmente não foi possível avaliar o grau de albuminúria prévio devido a muitos dados faltantes, tampouco avaliar a presença inicial de NAC. Este dado será de grande interesse para um estudo prospectivo futuro.

Uma limitação do nosso estudo é o fato de ser um estudo transversal, não prospectivo. Outra limitação é que alguns dados coletados foram realizados por meio de questionário simples, como tabagismo e etilismo pregresso e atual, sem classificação mais detalhada. Isto pode interferir na avaliação destes hábitos em relação à interpretação de sua associação com a ND. Finalmente, seria importante a validação do achado da associação de NAC

com o SNP rs713041 no gene *GPX4* em outra população de pacientes com DM1, o que possivelmente esbarraria na dificuldade de encontrarmos outra população de pacientes com DM1 avaliada pelos mesmos testes utilizados no presente estudo.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O polimorfismo rs713941 no gene *GPX4* conferiu proteção contra a NAC na população de DM1 avaliada.

Existe associação de risco entre a presença de NP e a presença de NAC e os graus de albuminúria, retinopatia e NAC.

Existe associação de risco entre a presença de NAC clínica e a presença de NP e os graus de albuminúria e retinopatia.

As presenças de NP e de NAC estão associadas a maiores quedas anuais da TFGe.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A neuropatia diabética é uma área muito rica, de fisiopatologia fascinante e ainda incompreendida em muitos aspectos, principalmente na sua manifestação autonômica. O estudo da ciência básica aliada à clínica é de suma importância para que assim possamos diminuir o agravo causado por esta complicação aos pacientes.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

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

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo da associação entre polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas de sistemas pró e antioxidantes e neuropatia diabética 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: 23 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável:

Rubrica do pesquisador:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

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 descontrolado 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 nervos, que é chamada de neuropatia 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 punção na veia de seu braço para a extração do material genético (DNA), para que seja feito o estudo dos genes potencialmente envolvidos no risco de você desenvolver a neuropatia diabética. Este material genético será armazenado e poderá ser utilizado em novos projetos de pesquisa devidamente aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Caso seja novamente utilizado, o Senhor (a) será contatado para autorizar ou não o uso do seu material genético. Será realizado um questionário e um exame neurológico direcionado para avaliação da presença de neuropatia, que é um exame físico detalhado que deve ser feito em todos pacientes com diabetes, pelo menos uma vez por ano, para avaliar a presença da neuropatia. Caso o (a) Senhor (a) não apresente alterações no exame físico, será realizado um exame chamado de Análise Espectral, que é um exame capaz de detectar a neuropatia quando ela ainda está nas fases muito iniciais. Esse exame não causa nenhum desconforto ou dor – ele é muito parecido com um eletrocardiograma.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço, exame físico neurológico e Análise Espectral, que é um eletrocardiograma acoplado a um sistema de computador para análise das variações dos batimentos cardíacos.

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

O único desconforto que você sentirá será 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.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento de neuropatia diabética. Com isso, no futuro, é possível que possamos diagnosticar aqueles portadores de diabetes que têm maior risco de apresentar a neuropatia e talvez, usar melhores estratégias de prevenção nos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver esta complicação.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

Não há procedimentos alternativos.

7 – Garantia de acesso:

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: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – 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;

09 – 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 utilizar o material apenas para fim de pesquisa. No futuro, pode-se encontrar outras associações entre o papel genético e as complicações do diabetes.

Há necessidade de consulta-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 será utilizado com o meu material.

(...) 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 eu estou doando.

O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (~~CAPPesq~~).

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Estudo da associação entre polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas de sistemas pró e antioxidantes e neuropatia diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1."

Eu discuti com a Dra. Maria Lucia 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 / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador

Parecer do Comissão de Ética

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO EM GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE SISTEMAS PRÓ E ANTIOXIDANTES E NEUROPATIA DIABÉTICA EM PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Lucia Correa Gianella **Versão:** 1

Pesquisador Executante: Sharon Nina Admoni **CAAE:** 07513013.8.1001.0068

Co-autores: Daniele Pereira dos SantosMarcia NeryMarcia Silva QueirozMaria Beatriz

MonteiroMaria Candida ParisiRicardo V PerezThiago Patente

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8730

Número do Parecer: 235.357

Data da Relatoria: 03/04/13

Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo prospectivo e retrospectivo, onde será avaliada a frequência de polimorfismos na região promotora dos genes que codificam enzimas dos sistemas NADPH oxidase, GSH, TXN e GLRX e sua associação com a neuropatia sensitiva e neuropatia autonômica em pacientes diabéticos tipo 1. Será também avaliada a relação entre as diferentes complicações microvasculares da neuropatia, nefropatia e retinopatia. Para atingir os objetivos, a pesquisadora irá coletar amostras de sangue periférico para extração de DNA de 300 (ou 400?) pacientes portadores de diabetes tipo 1 acompanhados no Ambulatório de Diabetes do HC/FMUSP e do Ambulatório de Diabetes da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Paralelamente serão utilizadas amostras de DNA armazenadas de 141 indivíduos controle do Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25)-HCFMUSP. Os pacientes serão avaliados clinicamente para a presença de neuropatia, por meio de anamnese, questionários, exames laboratoriais e físicos direcionados pertinentes ao estudo proposto. O projeto tem como finalidade a obtenção de Doutorado da pesquisadora executante. Não conta com auxílio financeiro específico, porém a Disciplina deve possuir os recursos necessários para sua execução. Duração prevista de 36 meses.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a frequência de polimorfismos na região promotora dos genes que codificam enzimas dos sistemas NADPH oxidase, GSH, TXN e GLRX e sua associação com a neuropatia sensitiva e neuropatia autonômica em pacientes diabéticos tipo 1. Além disso, tem o objetivo de avaliar a relação entre as diferentes complicações microvasculares (neuropatia, nefropatia e retinopatia).

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Risco mínimo, desconforto da picada por agulha, eventual sangramento e formação de hematoma.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto apresenta relevância clínica. Atualmente, com exceção da hiperglicemia e da hipertensão arterial sistêmica, não existem fatores preditivos para o desenvolvimento de complicações microvasculares em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Assim, a pesquisa de marcadores genéticos pode contribuir para a identificação de pacientes de risco, com maior susceptibilidade para as complicações da doença, bem como a obtenção de maior conhecimento do desenvolvimento desses eventos; sugerir novas terapias preventivas e de tratamento, como bem colocado pela pesquisadora responsável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O documento referente à Instituição colaboradora do projeto, com fornecimento de amostras, não está apresentada de forma adequada, não tem a anuência da Instituição com a devida aprovação, somente uma Declaração não assinada da Colaboradora participante.

Recomendações: Seguir as normas regulatórias para utilização de amostras armazenadas no Biorrepositório, deve existir cópia do TCLE dos participantes do Estudo, com a autorização explícita de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Regularizar a apresentação da anuência da Instituição Colaboradora do Projeto (UNICAMP), Depto ou mesmo do Serviço do Hospital de onde serão selecionados os participantes do Estudo. Para não atrasar o início do desenvolvimento do Projeto, o parecer é favorável para a aprovação, porém fica o compromisso para a apresentação da documentação apropriada.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – 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.

Professora Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Em Endocrinologia

São Paulo, 03 de Abril de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Campinas, 04 de setembro de 2012

Carta de Anuência

Eu, Maria Cândida Ribeiro Parisi, RG: 18028328, declaro, para os devidos fins, que o “Estudo da associação entre polimorfismos de um único nucleotídeo em genes que codificam proteínas de sistemas pró e antioxidantes e neuropatia diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1” será realizado pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em associação com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dra. Maria Candida R. Parisi
CRM 69325

Maria Cândida Ribeiro Parisi

Gráficos de Análise Espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Figura Anexo 1 – Exemplo de gráfico de análise espectral de variabilidade de frequência cardíaca de paciente controle. Observa-se grande amplitude em todas as faixas de frequência

Figura Anexo 2 – Exemplo de gráfico de análise espectral de variabilidade de frequência cardíaca de paciente com neuropatia autonômica cardiovascular. Observa-se diminuição da amplitude de em todas as faixas de frequência.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes care*. 2017;40(Suppl 1):S11-S24.
2. Dabelea D, Mayer-Davis E, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R, Badaru A, Talton J, Crume T, Liese A, Merchant A, Lawrence J, Reynolds K, Dolan L, Liu L, Hamman R. Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Children and Adolescents From 2001 to 2009. *JAMA*. 2014;311(17):1778.
3. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1458-86.
4. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2017;40(1):136-54.
5. Vinik AI, Nevoret ML, Casellini C, Parson H. Diabetic neuropathy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(4):747-87.
6. Veves A, Malik RA. Diabetic Neuropathy: Clinical Management, Second Edition. 2008:1-520.
7. Rundles RW. Diabetic neuropathy. *Bull N Y Acad Med*. 1950;26(9):598-616.
8. Save-Soderbergh J, Angervall L, Fagerberg S. Microangiopathy in Young Diabetic Men. *Diabetologia*. 1966;2:331-9.
9. Sinnreich M, Taylor B, Dyck P. Diabetic Neuropathies. *The Neurologist*. 2005;11(2):63-79.
10. Thomas PK. Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes*. 1997;46 Suppl 2:S54-7.
11. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes A. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005;28(4):956-62.

12. Dyck PJ, Melton LJ, O'Brien PC, Service FJ. Approaches to improve epidemiological studies of diabetic neuropathy: insights from the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Diabetes*. 1997;46 Suppl 2:S5-8.
13. DCCT. 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.
14. Martin C, Albers J, Pop-Busui R. Neuropathy and Related Findings in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Care*. 2014;37(1):31-8.
15. Moreira RO, Castro AP, Papelbaum M, Appolinário JC, Ellinger VC, Coutinho WF, Zagury L. Tradução para o Português e Avaliação da Confiabilidade de Uma Escala para Diagnóstico da Polineuropatia Distal Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(6):944-50.
16. Dyck PJ, Kratz KM, Lehman KA, Karnes JL, Melton LJ, O'Brien PC, Litchy WJ, Windebank AJ, Smith BE, Low PA. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. *Neurology*. 1991;41(6):799-807.
17. Young RJ, Zhou YQ, Rodriguez E, Prescott RJ, Ewing DJ, Clarke BF. Variable relationship between peripheral somatic and autonomic neuropathy in patients with different syndromes of diabetic polyneuropathy. *Diabetes*. 1986;35(2):192-7.
18. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1553-79.
19. Politi C, Ciccacci C, D'amato C, Novelli G, Borgiani P, Spallone V. Recent advances in exploring the genetic susceptibility to diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;120(C):198-208.
20. Inanir A, Basol N, Karakus N, Yigit S. The importance of association between angiotensin-converting enzyme (ACE) Gene I/D polymorphism and diabetic peripheral neuropathy. *Gene*. 2013;530(2):253-6.
21. Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2013;19:1626-30.

22. Groener JB, Reismann P, Fleming T, Kalscheuer H, Lehnhoff D, Hamann A, Roser P, Bierhaus A, Nawroth PP, Rudofsky G. C332C genotype of glyoxalase 1 and its association with late diabetic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013;121(7):436-9.
23. Tavakkoly-Bazzaz J, Amoli M, Pravica V, Chandrasegaran R, Boulton A, Larijani B, Hutchinson I. VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep*. 2010;37(7):3625-30.
24. Basol N, Inanir A, Yigit S, Karakus N, Kaya S. High Association of IL-4 Gene Intron 3 VNTR Polymorphism with Diabetic Peripheral Neuropathy. *J Mol Neurosci*. 2013;51(2):437-41.
25. Tang T, Prior S, Li K, Ireland H, Bain S, Hurel S, Cooper J, Humphries S, Stephens J. Association between the rs1050450 glutathione peroxidase-1 gene variant and peripheral neuropathy in two independent samples of subjects with diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. . 2012;22(5):417-25.
26. Babizhayev M, Stokov I, Nosikov V, Savel'yeva E, Sitnikov V, Yegor EY, Lankin V. The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients. *Cell Biochem and Biophys*. 2014:1-19.
27. Vojtková J, Ďurdík P, Čiljaková M, Michnová Z, Turčan T, Babušíková E. The association between glutathione S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms and cardiovascular autonomic neuropathy in Slovak adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2013;27(1):44-8.
28. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
29. Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. A Predisposição Genética para o Desenvolvimento da Microangiopatia no DM1. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008:1-12.
30. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004;25(4):612-28.
31. Stratton I. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000;321(7258):405-12.

32. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B, Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2643-53.
33. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(15):1577-89.
34. Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin invest*. 2003;111(4):431-3.
35. Ziegler D, Buchholz S, Sohr C, Nourooz-Zadeh J, Roden M. Oxidative stress predicts progression of peripheral and cardiac autonomic nerve dysfunction over 6 years in diabetic patients. *Acta Diabetol*. 2015;52(1):65-72.
36. Shastri BS. SNPs and haplotypes: genetic markers for disease and drug response (review). *Int J Mol Med*. 2003;11(3):379-82.
37. 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.
38. Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;973:488-504.
39. Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 2002;51(10):1360-2.
40. Diaz-Hernandez JI, Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernandez E, Bolaños JP. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin RNA reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J Biol Chem*. 2005;280(47):38992-9001.
41. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3289-303.
42. Barrière DA, Rieusset J, Chanteranne D, Busserolles J, Chauvin MA, Chapuis L, Salles J, Dubray C, Morio B. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced

mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. *Pain*. 2012;153(3):553-61.

43. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth E, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm G, Schweizer U, Conrad M. Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metab*. 2008;8(3):237-48.

44. Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1368-82.

45. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):25-47.

46. Hamada Y, Miyata S, Nii-Kono T, Kitazawa R, Kitazawa S, Higo S, Fukunaga M, Ueyama S, Nakamura H, Yodoi J, Fukagawa M, Kasuga M. Overexpression of thioredoxin1 in transgenic mice suppresses development of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(6):1547-57.

47. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, Connelly KA, Zhang Y, Herzenberg AM, Christensen PK, Pollock CA, Qi W, Tan SM, Parving HH, Kelly DJ. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):730-41.

48. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusis AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2008;57(4):938-44.

49. Price S, Gardiner N, Duran-Jimenez B, Zeef L, Obrosova I, Tomlinson D. Thioredoxin interacting protein is increased in sensory neurons in experimental diabetes. *Brain Res*. 2006;1116(1):206-14.

50. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.

51. Cotter MA, Cameron NE. Effect of the NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin, on peripheral nerve perfusion and function in diabetic rats. *Life sciences*. 2003;73(14):1813-24.

52. Hoeldtke R, Bryner KD, Vandyke K. Oxidative stress and autonomic nerve function in early type 1 diabetes. *Clin Auton Res*. 2011;21(1):19-28.
53. Girach A, Vignati L. Diabetic microvascular complications--can the presence of one predict the development of another? *J Diabetes Complications*. 2006;20(4):228-37.
54. Ahlqvist E, Zuydam N, Groop LC, McCarthy MI. The genetics of diabetic complications. *Nature*. 2015:1-11.
55. 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.
56. Bermano G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat NA, Shiel RS, Arthur JR, Mathers JC, Daly AK, Broom J, Hesketh JE. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr*. 2007;2(2):225-32.
57. Monteiro M, Patente T, Mohammedi K, Queiroz M, Azevedo M, Canani L, Parisi M, Marre M, Velho G, Corrêa-Giannella M. 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.
58. 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.
59. 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(1):129.
60. Bekris L, Shephard C, Janer M, Graham J, McNeney B, Shin J, Zarghami M, Griffith W, Farin F, Kavanagh T, 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.

61. 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.

62. Soares-Souza G, Tarazona-Santos E, Chanock S. Characterization of a candidate locus for malaria susceptibility in human populations: a (TA) nmicrosatellite in the promoter region of the CYBB gene, the gp91 phoxsubunit of the NADPH oxidase. *Int J Immunogenet*. 2008;35(2):107-9.

63. Moreno MU, San José G, Fortuño A, Beloqui 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.

64. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J, Ckd EPI. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.

65. Boulton AJM. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Clin Diabetes*. 2005:1-7.

66. Vinik AI, T E. Diabetic autonomic neuropathy. *Handbook of Clinical Neurology*. 2013;117(Chapter 22):279-94.

67. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *BMJ*. 1982;285:916-8.

68. 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.

69. Ziegler D, Laux G, Dannehl K, Spuler M, Muhlen H, Mayer P, Gries FA. Assessment of Cardiovascular Autonomic Function: Age-related Normal Ranges and Reproducibility of Spectral Analysis, Vector Analysis, and Standard Tests of Heart Rate Variation and Blood Pressure Responses. *Diabetic Medicine*. 1992;9:166-75.

70. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation*. 2007;115(3):387-97.
71. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
72. RC T. A Language and Environment for Statistical Computing. 2013.
73. Villette S, Kyle J, Brown K, Pickard K, Milne J, Nicol F, Arthur JR, Hesketh JE. A Novel Single Nucleotide Polymorphism in the 3' Untranslated Region of Human Glutathione Peroxidase 4 Influences Lipoxygenase Metabolism. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29(2):174-8.
74. 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. *Hypert Res*. 2012;35(5):507-12.
75. Cardoso BR, Hare DJ, Bush AI, Roberts BR. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Mol Psychiatry*. 2016:1-8.
76. Gautrey H, Nicol F, Sneddon AA, Hall J, Hesketh J. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1810(6):284-91.
77. van Dam PS. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18(3):176-84.
78. Chen L, Hambright WS, Na R, Ran Q. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28097-106.
79. American Diabetes A. 9. Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes care*. 2015;38(Supplement 1):S58-S66.
80. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A. Neuropathic Pain in Diabetes, Prediabetes and Normal Glucose Tolerance: The MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Pain Medicine*. 2009;10(2):393-400.

81. Chessa M, Butera G, Lanza G, Bossone E, Delogu A, De Rosa G, Marietti G, Rosti L, Carminati M. Role of Heart Rate Variability in the Early Diagnosis of Diabetic Autonomic Neuropathy in Children. *Herz*. 2002;27(8):785-90.
82. Pritchard N, Edwards K, Russell AW, Perkins BA, Malik RA, Efron N. Corneal confocal microscopy predicts 4-year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2015;38(4):671-5.
83. Walters DP, Gatling W, Mullee MA, Hill RD. The prevalence, detection, and epidemiological correlates of peripheral vascular disease: a comparison of diabetic and non-diabetic subjects in an English community. *Diabetic medicine*. 1992;9(8):710-5.
84. Bjornstad P. Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights. *World J Diabetes*. 2015;6(1):8.
85. Bjornstad P, Maahs DM, Wadwa RP, Pyle L, Rewers M, Eckel RH, Snell-Bergeon JK. Plasma triglycerides predict incident albuminuria and progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes: The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study. *J Clin Lipidol*. 2014;8(6):576-83.
86. Argov Z. Statins and the neuromuscular system: a neurologist's perspective. *Eur J Neurol*. 2014;22(1):31-6.
87. Gazzaruso C, Giordanetti S, De Amici E, Bertone G, Falcone C, Geroldi D, Fratino P, Solerte SB, Garzaniti A. Relationship between erectile dysfunction and silent myocardial ischemia in apparently uncomplicated type 2 diabetic patients. *Circulation*. 2004;110(1):22-6.
88. Burenin AG, Urusov AE, Betin AV, Orlov AV, Nikitin MP, Ksenevich TI, Gorshkov BG, Zherdev AV, Dzantiev BB, Nikitin PI. Direct immunosensing by spectral correlation interferometry: assay characteristics versus antibody immobilization chemistry. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(14):3955-64.