

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AGREGAÇÃO FAMILIAR DE RETINOPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES
COM DIABETE MELITO TIPO 2

PAULA BLASCO GROSS

Porto Alegre, Novembro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AGREGAÇÃO FAMILIAR DE RETINOPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES
COM DIABETE MELITO TIPO 2

PAULA BLASCO GROSS

Orientadores: Profa. Dra. Mirela Jobim de Azevedo

Prof. Dr. Luís Henrique Canani

Co-orientador: Prof. Dr. Jacó Lavinsky

Porto Alegre, Novembro de 2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

SUMÁRIO

Agradecimentos	vi
Formato da Dissertação de Mestrado	ix
Lista de Abreviaturas	x
Listas de Quadros, Tabelas e Figura	xii
<u>Artigo 1: Aspectos genéticos da retinopatia diabética</u>	
Resumo/abstract	14
Introdução	16
Patogênese da RD	18
Curso clínico, classificação e fatores associados à retinopatia diabética	20
Fatores genéticos e retinopatia diabética	21
Estudos de famílias	21
Estudos do sistema HLA	22
Identificação de genes relacionados à retinopatia diabética	23
Aldose redutase	24
VEGF	24
PPAR-gama	24
ICAM-1	25
RAGE	26
GLUT-1	26
PC-1/ENPP1	26
$\alpha 2\beta$INTEGRIN	27
ECA	27
Considerações finais	27
Referências	29

Artigo 2: Familial aggregation of diabetic retinopathy in brazilian type 2 diabetic patients

Abstract	47
Introduction	49
Patients and methods	50
Patients	50
Clinical evaluation	51
Retinopathy grading	51
Laboratory methods	52
Statistical analysis	53
Results	53
Discussion	55
Acknowledgments	58
References	59

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Mirela Jobim de Azevedo, por me fornecer motivação permanente, compreensão e apoio fundamental nos momentos de maior dificuldade e na escolha de oportunidades para a minha vida acadêmica e profissional. Além disso, por ter participado ativamente em todos os momentos da realização desta pesquisa e, principalmente, pela disponibilidade e paciência infinitas, o que serviu de exemplo para a minha identidade médica e despertou minha vontade de ser pesquisadora.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Henrique Canani, pelo voto de confiança ao me orientar sem me conhecer previamente ao início deste trabalho, pelos ensinamentos e resolução de dúvidas nos momentos mais imprevistos, e pela honra deste mestrado representar uma extensão da área de pesquisa desenvolvida em seu doutorado, o que me foi de muito auxílio.

Ao Prof. Dr. Jacó Lavinsky, meu co-orientador, pelos ensinamentos durante a residência e pelos conselhos e apoio durante e após o término da mesma, bem como pela ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, por ser quem é e por ter me convidado para fazer parte de seu Grupo de Pesquisa em Nefropatia Diabética e Complicações Associadas e assim me dar oportunidade de aprender com ele e sua equipe. Além disso, agradeço pelos conselhos na tomada de decisões importantes para a minha carreira profissional e pelas revisões críticas deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Burttet, Carolina Meotti e Marcele Rizzatti pela dedicação, responsabilidade e competência para agendar e atender os pacientes, completar o banco de dados e digitalizar as fotografias, ajuda sem a qual este trabalho não teria sido factível.

À Dra. Maria Cristina Boelter, pela confiança na minha capacidade de trabalho e ajuda no início da minha vida profissional, além de ter me proporcionado continuidade ao seu trabalho de mestrado.

À Dra. Cristiane Bauermann Leitão, pela amizade e ajuda em vários momentos da graduação e pós-graduação, me inspirando força e coragem de seguir sempre em frente. Aos demais colegas da pós-graduação pelos momentos de agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Samuel Rymer, pelos ensinamentos durante a residência e por ter possibilitado acesso à coleta e organização dos dados na Zona 17.

Aos funcionários das Zonas 17 e 16, ao fotógrafo Clóvis e aos residentes de Oftalmologia do período de coleta de dados deste trabalho (2004-2005), pela ajuda e companheirismo em diversos momentos.

Às minhas amigas de faculdade Analupe Webber, Letícia Ribeiro, Tatiana Rech e Raquel Fraga, pelas experiências compartilhadas. À Ana Soledade Graeff Martins, amizade de infância que renasceu agora em minha estadia “paulista”.

Aos colegas do Departamento de Glaucoma da UNIFESP/Escola Paulista de Medicina – São Paulo, pelo apoio e valorização da minha pós-graduação, em especial o Dr. Luiz Alberto de Mello Jr. pelas preciosas dicas de análise estatística, e o Dr. Sérgio Teixeira e o Dr. Ivan Tavares, pela compreensão de minhas ausências até a defesa de minha tese.

Aos meus pais Dalva e Paulo, por terem me proporcionado uma vida de oportunidades possibilitando-me chegar onde cheguei. Obrigada também pelo amor, compreensão que não podem ser descritos em meras palavras, além do exemplo de como encarar objetivos com seriedade e responsabilidade e de sempre fazer tudo da maneira mais correta possível. Aos meus tios e primos, pelo incentivo e alegria

diante das minhas conquistas. Aos meus irmãos Stela e Alexandre, que de uma forma ou de outra sempre servem de baliza para a minha vida.

Aos pacientes, parte fundamental da minha formação médica.

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da UFRGS, sendo apresentada na forma de dois manuscritos sobre o tema da Dissertação:

1. Artigo de revisão geral do tema, que deverá ser submetido para publicação em periódico científico nacional;
2. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito, que deverá ser submetido para publicação em periódico científico de circulação internacional.

LISTA DE ABREVIATURAS

BMI	<i>Body mass index</i>
CI	<i>Confidence interval</i>
DM	Diabete Melito
DR	<i>Diabetic retinopathy</i>
ACE	<i>Angiotensin-1 Conversor Enzyme</i>
eNOS	Óxido nítrico-sintetase
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
GLUT-1	<i>Glucose Transporter-1</i>
GFAT	glutamina:frutose-6-fostato amidotransferase
HLA	<i>Human Leucocitary Antigen</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IRMA	Anormalidades microvasculares intrarretinianas
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
MHC	<i>Main histocompatibility complex</i>
NADPH	Fostato dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
ON	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
PAI-1	Fator inibidor da ativação do plasminogênio-1
PKC	Proteinoquinase-C
PPAR-gama	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
RAGE	<i>Receptor of advanced glycation end products</i>
RC	Razão de chance

RD	Retinopatía diabética
Teste A1C	Glicohemoglobina A1C
TGF-β	<i>Transforming growth factor- β</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WESDR	<i>Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy</i>

LISTAS DE QUADROS, TABELAS E FIGURA

Artigo 1

Quadro 1.	Classificação clínica da retinopatia diabética	42
Quadro 2.	Estudos de agregação familiar e retinopatia diabética.....	43
Quadro 3.	Polimorfismos genéticos e retinopatia diabética.....	44

Artigo 2

Table 1.	International clinical diabetic retinopathy disease severity scale.....	64
Table 2.	Clinical and laboratorial characteristics of type 2 diabetic siblings defined as probands or siblings.....	65
Table 3.	Clinical and laboratorial characteristics of type 2 diabetic siblings grouped according to the presence of Proliferative Diabetic Retinopathy in the probands.....	66
Figure 1.	Cumulative prevalence of proliferative diabetic retinopathy in the siblings according to the presence of PDR in the probands.....	67

Aspectos genéticos relacionados à Retinopatia Diabética

Diabetic Retinopathy: Genetic aspects

Paula Blasco Gross¹

Luís Henrique Canani²

Jorge Luiz Gross³

Jacó Lavinsky⁴

Mirela Jobim de Azevedo⁵

¹Médica Oftalmologista, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

²Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina, UFRGS; Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS; Médico Endocrinologista do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.

³Professor Titular do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina, UFRGS; Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS; Chefe do Serviço de Endocrinologia do HCPA, Porto Alegre, RS.

⁴Professor Titular do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina, UFRGS; Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS; Chefe do Setor de Retina do Serviço de Oftalmologia do HCPA, Porto Alegre, RS.

⁵Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina, UFRGS; Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia UFRGS; Médica Endocrinologista do Serviço de Endocrinologia do HCPA, Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência:

Mirela Jobim de Azevedo

Serviço de Endocrinologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Prédio 12 - 4º andar

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Fax: +55-51-3332-5188/3330-9100 E-mail: mirelaazevedo@terra.com.br

Artigo a ser enviado para publicação nos Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.

Resumo

A retinopatia diabética (RD) é a mais freqüente complicação crônica do diabetes melito (DM). Existe uma variação considerável na presença e gravidade da RD que não é totalmente explicada pelos principais fatores de risco conhecidos, como o tempo de duração de DM e controles glicêmico e pressórico inadequados. O objetivo deste manuscrito é revisar aspectos genéticos relacionados à RD. O papel dos fatores genéticos na RD é sugerido pela presença de diferentes prevalências de RD em diferentes etnias e pela ocorrência de agregação familiar de RD. A presença de RD em um familiar aumenta de forma significativa a chance de outro familiar também apresentar esta complicação. Finalmente, a identificação de possíveis genes associados à RD (genes candidatos), a maioria deles relacionados à sua patogênese, tem sido avaliada através de estudos de polimorfismos genéticos. Os principais polimorfismos associados ao risco para RD são os ligados aos genes da aldose redutase, VEGF, PPAR-gama e ICAM-1. A identificação dos genes associados à RD deverá proporcionar novas opções para prevenção e tratamento desta complicação em pacientes portadores de DM.

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) is the most frequent chronic complication of Diabetes Mellitus (DM). There is a great variation in the presence and severity of DR in patients with DM that is not fully explained by the main known risk factors, such as duration of DM and poor glycemic and blood pressure control. The aim of this manuscript is to review genetic aspects associated with DR. The role of genetic factors on DR is suggested by different prevalences of DR in different ethnic groups, and also by the occurrence of familial aggregation of this diabetic complication. The presence of DR in one family member increases the chance of other family member also having DR. Finally, several studies on genetic polymorphisms have been performed in order to

identify genes possibly related with DR (candidate genes). These genes are mostly connected to DR pathogenesis. The genetic polymorphisms of aldose reductase, VEGF, PPAR-gama and ICAM-1 are associated to increased risk of DR. The identification of the genes associated with DR will provide new prevention and treatment options of this complication in DM patients.

Descriptores: Retinopatía diabética; genética; polimorfismos genéticos.

Introdução

De acordo com dados recentes da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 150 milhões de pessoas são afetadas pelo Diabete Melito (DM), número este que pode duplicar até o ano 2025. Muito deste aumento ocorrerá nos países em desenvolvimento, especialmente devido ao crescimento populacional, envelhecimento, dietas inadequadas, obesidade e sedentarismo, além da redução dos valores de glicemia de jejum atualmente adotados para o diagnóstico do DM^(1, 2). Em estudo brasileiro do início da década de 90, a prevalência geral de DM foi de 7,6% na população urbana com idade igual ou superior a 30 anos, sendo que metade dos casos não se sabia portador de DM⁽²⁾. Dados mais recentes obtidos a partir de mais de 22 milhões de brasileiros testados entre os anos de 2000 e 2001 revelaram que cerca de 16% dos indivíduos acima de 40 anos apresentavam testes glicêmicos alterados, alertando para a possível duplicação da prevalência de DM no Brasil na última década⁽³⁾.

A retinopatia diabética (RD) é a mais freqüente entre as complicações crônicas relacionadas ao DM⁽⁴⁾, sendo a mais grave dentre as alterações oculares relacionadas a esta doença⁽⁵⁾. A história natural da RD é bem conhecida e demonstrada em diversos estudos⁽⁶⁻⁹⁾. A RD ocorre em quase todos os pacientes com DM tipo 1 e em mais do que 60% dos pacientes com DM tipo 2⁽¹⁰⁾. Existem poucos dados sobre a prevalência de RD no Brasil. A prevalência geral de RD em Ribeirão Preto, São Paulo, foi de 29%⁽¹¹⁾ para pacientes com DM tipo 2 e 29,9%⁽¹²⁾ para pacientes com DM tipo 1. Já na região sul do Brasil, aproximadamente 48% dos pacientes com DM tipo 2 apresentaram RD⁽¹³⁻¹⁶⁾, sendo que destes, cerca de 15% possuíam a forma proliferativa de RD^(13, 15).

O objetivo deste manuscrito é revisar aspectos genéticos da RD, desde a presença de agregação familiar até a identificação de possíveis genes relacionados direta ou indiretamente a esta complicação.

Patogênese da RD

A RD ocorre através de diferentes mecanismos que interagem entre si: fatores genéticos, bioquímicos e fatores de risco ambientais, tais como dieta, sedentarismo e fumo, entre outros⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. A hiperglicemia é considerada um dos principais fatores desencadeantes da RD, atuando através da modulação e alteração de fatores de crescimento e no metabolismo e sinalização (comunicação) entre as células retinianas. Esta alteração da sinalização metabólica entre os neurônios rompe a homeostase celular retiniana^(17,18). A identificação destes aspectos relacionados à patogênese da RD permite um melhor entendimento da seleção de possíveis genes relacionados à presença de RD (genes candidatos), como será discutido posteriormente neste manuscrito.

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para relacionar a hiperglicemia crônica às complicações microvasculares na RD, entre eles o acúmulo de poliols, formação de produtos da glicação avançada, estresse oxidativo, ativação da proteinoquinase C e aumento da via da hexosamina^(4,5,17,18,20,21).

Na via do poliols, a hiperglicemia intracelular modifica a atividade da enzima aldose redutase, desviando sua atividade para a transformação de glicose em sorbitol, cujo aumento intracelular pode causar dano osmótico às células vasculares⁽⁴⁾. Esta ativação da via dos polióis leva também a uma maior suscetibilidade celular ao estresse oxidativo⁽¹⁷⁾. Quando o sorbitol produzido é convertido em frutose, o fosfato dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NADPH) é consumido, e conseqüentemente sua concentração é reduzida. O NADPH é um co-fator importante na regeneração de antioxidantes intracelulares, como por exemplo, a glutatona⁽¹⁸⁾.

O dano endotelial secundário ao estresse oxidativo⁽²²⁾ ocorre também em função do acúmulo de produtos da glicação avançada dentro das células endoteliais retinianas. Estes produtos se ligam a receptores específicos como o RAGE (“Receptor of Advanced

Glycation End Products”⁽¹⁸⁾. Como resultado, ocorre liberação de radicais livres e disfunção vascular que podem danificar as células retinianas através da modificação de proteínas celulares (incluindo proteínas envolvidas na regulação de transcrição genética). Além disto, ocorre difusão dos precursores e dos produtos da glicação avançada para fora da célula, com posterior modificação da matriz extracelular adjacente (alterando as sinalizações e causando espessamento da membrana basal endotelial e oclusões capilares) e de proteínas circulantes no sangue, como, por exemplo, a albumina. A conseqüente produção de citocinas inflamatórias (interleucina-1, fator de necrose tumoral- β e fator de crescimento da insulina-1A) também pode gerar danos vasculares^(17, 18, 22). Outra substância que tem sua produção aumentada é a endotelina-1, que promove a vasoconstricção da microvasculatura, contribuindo desta forma para a oclusão capilar característica da RD⁽²²⁾.

A hiperglicemia intracelular aumenta a síntese de diacilglicerol, que por ser um co-fator da proteinoquinase C (PKC) causa um aumento da atividade desta proteína (PKC ativada). Normalmente, a PKC e suas isoformas representam alvos para segundos mensageiros lipídicos e atuam de várias maneiras sobre a expressão gênica intracelular. A PKC participa da regulação dos seguintes processos celulares: contratilidade e permeabilidade vasculares, angiogênese, crescimento celular, sinalização para a matriz extracelular, ação de citocinas e adesão leucocitária⁽²³⁾. A PKC ativada^(18, 23) gera um desequilíbrio nestes processos, ocasionando vasoconstricção (aumento de endotelina-1 e redução de óxido nítrico), aumento da permeabilidade vascular via o “Vascular Endothelial Growth Factor”(VEGF), aumento do estresse oxidativo celular, oclusão vascular através do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e fator inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1)⁽¹⁸⁾.

O aumento da via das hexosaminas representa também um mecanismo bioquímico pelo qual a hiperglicemia está relacionada à patogênese da RD. As hexosaminas são produtos da degradação da glicose, sendo a glucosamina um dos subtipos de hexosaminas. A hiperglicemia intracelular promove a metabolização da glicose via glicólise, através da glutamina:frutose-6-fostato amidotransferase (GFAT), gerando glucosamina dentro da célula. A glucosamina acumulada altera a transcrição genética protéica, aumentando a expressão de PAI-1 e TGF- β , dentre outras substâncias, levando a dano oclusivo vascular e isquemia retiniana⁽¹⁸⁾.

Curso clínico, classificação e fatores associados à RD

A RD afeta todas as células retinianas de forma progressiva e gradual, especialmente sua microvasculatura, levando à áreas de isquemia, aumento da permeabilidade vascular e conseqüente proliferação de vasos retinianos⁽²⁴⁻²⁶⁾. As complicações associadas à vasopermeabilidade aumentada e à neovascularização podem resultar em perda visual grave e permanente⁽²⁷⁾.

De acordo com achados à fundoscopia, a RD pode ser classificada de uma forma prática e simplificada para uso clínico⁽²⁸⁾. Esta categorização baseia-se em estudos clássicos onde a RD foi avaliada através de fotografias em campos padronizados^(29, 30) e classifica a RD em: 1- RD ausente; 2- RD não proliferativa leve; 3-RD não proliferativa moderada; 4- RD não proliferativa grave e 5- RD proliferativa (Quadro 1). O edema macular, caracterizado por espessamento retiniano a partir de vazamentos anormais da microvasculatura retiniana, pode ocorrer em qualquer estágio de RD⁽²⁶⁾. A gestação, a puberdade, o mau controle glicêmico, valores elevados de pressão arterial e a cirurgia intraocular, entre outros fatores, podem acelerar os estágios evolutivos da RD^(10, 19, 31).

Estudos clínicos têm demonstrado variação considerável no início e severidade da RD, a qual não é totalmente explicada pelos principais fatores de risco conhecidos,

como o tempo de duração de DM e controles glicêmico e pressórico inadequados^(31, 32). De fato, apesar de intervenções específicas em relação a estes fatores reduzirem a incidência e progressão de RD^(8, 33, 34), esta complicação ainda ocorre em uma parcela significativa de pacientes. Estas observações sugerem que fatores genéticos estejam relacionados ao aparecimento e desenvolvimento da RD⁽³⁵⁾. Outros aspectos que também sugerem a presença de um componente genético associado à RD são as variadas prevalências de RD em diferentes etnias^(36, 37), bem como presença mais freqüente de RD em determinadas famílias^(15, 32, 38, 39).

Fatores genéticos e RD

Alterações em determinado gene podem levar tanto a um aumento (fator de risco) quanto a uma redução (fator de proteção) na chance de o indivíduo apresentar uma doença ou determinado fenótipo. A avaliação de fatores genéticos relacionados ao DM e às suas complicações crônicas é uma tarefa complexa, uma vez que o DM é uma doença multifatorial e geneticamente heterogênea⁽⁴⁰⁾.

Estudos de famílias

A concordância para a presença de RD ocorreu em 35 de 37 gêmeos idênticos com DM tipo 2, e em 21 de 31 gêmeos com DM tipo 1, sugerindo um efeito genético mais intenso para RD nos pacientes com DM tipo 2⁽⁴¹⁾.

Ainda existem poucos estudos avaliando a presença de agregação familiar da RD em famílias (Quadro 2). Em um único estudo, realizado na região sul da Índia, a prevalência de qualquer grau de RD foi maior entre os irmãos de pacientes com RD do que entre irmãos de pacientes sem RD⁽³⁸⁾. Não houve agregação familiar para RD proliferativa, possivelmente devido ao pequeno número de pacientes presentes nesta categoria. Na amostra avaliada nos demais estudos, a agregação familiar ocorreu principalmente para formas graves de RD. Em famílias provenientes do Texas com

descendência mexicana⁽³⁹⁾ e em famílias de pacientes pertencentes ao “Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT)⁽³²⁾, o risco de desenvolver graus avançados de RD foi maior para pacientes cujas famílias apresentavam RD grave ou proliferativa do que para pacientes cujos familiares diabéticos apresentavam RD leve ou moderada. Nestes estudos, não foi observada agregação para a simples presença de qualquer grau de RD. No Brasil, a ocorrência de agregação familiar de RD foi recentemente confirmada em um estudo pioneiro realizado no Rio Grande do Sul⁽¹⁵⁾. Foi demonstrado que a presença de RD proliferativa em um irmão também portador de DM aumentou cerca de 16 vezes a chance do paciente com DM tipo 2 apresentar RD proliferativa, mesmo após ajustes para duração do DM, valores de teste A1C, presença de hipertensão arterial sistêmica e de nefropatia diabética. Embora neste mesmo estudo tenha sido também demonstrado haver agregação familiar para qualquer grau de RD, a mesma desapareceu quando os casos com RD proliferativa foram excluídos da análise. Isto sugere que os fatores genéticos estejam mais relacionados com a gravidade de RD do que apenas com sua presença.

Estudos do sistema de Antígeno Leucocitário Humano (HLA)

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC – “Major Histocompatibility Complex”) realiza a codificação das moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos ao sistema imune. Em seres humanos, o MHC é denominado sistema HLA (“Human Leukocyte Antigens”). Os genes do sistema HLA têm sido didaticamente agrupados em três classes: I, II e III, sendo as duas primeiras referentes aos genes envolvidos com a resposta imune. A região de classe I é composta pelos loci HLA-A, -B e -C, e a região de classe II é composta pelos loci HLA-DR, -DQ e -DP. Os genes da classe III não expressam moléculas de histocompatibilidade, mas participam da resposta imune codificando componentes do sistema complemento. Devido ao seu

grande polimorfismo, os genes do sistema HLA apresentam frequências de alelos variadas em diferentes populações^(42, 43).

A possível associação entre os genes do sistema HLA com a RD foi avaliada por alguns autores⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Um estudo com 103 adolescentes finlandeses com DM tipo 1 observou a presença de HLA-DR1 em 31% dos pacientes portadores de RD incipiente e em apenas 5% dos pacientes sem RD⁽⁴⁴⁾. No Japão, encontrou-se frequência significativamente aumentada da presença de HLA-B62, Cw4 e DQ4 em pacientes com DM tipo 1 portadores de RD proliferativa quando comparados aos pacientes sem RD⁽⁴⁵⁾. Já uma possível associação de RD com a presença do HLA-DR4 não foi confirmada. Em uma amostra de 428 participantes pacientes com DM tipo 1 do “Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy” (WESDR), os pacientes portadores de HLA-DR4 e negativos para a presença de DR3 apresentaram cinco vezes mais RD proliferativa do que os pacientes negativos para ambos os alelos⁽⁴⁶⁾. Entretanto, quando a mesma amostra de pacientes foi acompanhada longitudinalmente, a incidência e progressão de RD não foi associada com a presença de HLA-DR3 ou DR4⁽⁴⁷⁾.

Identificação de genes relacionados à RD

Estudos de rastreamento de genoma (“genome-wide scan studies”) para avaliação de componente genético da RD em pacientes com DM tipo 2 são poucos até o momento. Entretanto, recentemente, um estudo onde foi realizada pesquisa no genoma para RD e nefropatia diabética em índios Pima indicou associação de regiões dos cromossomos 3 e 9 para ambas complicações crônicas microvasculares, embora nenhuma região genômica específica tenha sido demarcada para a RD⁽⁴⁸⁾.

Outra forma utilizada para identificação de genes associados a uma doença é a análise de polimorfismos genéticos. Os mesmos são definidos como a presença em uma determinada população de dois ou mais alelos determinantes de um fenótipo, ocorrendo

em uma frequência maior do que 1%, portanto não são considerados apenas mutações⁽⁴⁹⁾. Os polimorfismos genéticos podem ser investigados através do estudo de genes candidatos, ou seja, genes cuja função ou localização dentro do genoma sugiram que os mesmos sejam responsáveis ou contribuintes de uma doença ou fenótipo⁽⁴⁹⁾. Ainda, estes genes podem não ter qualquer relação direta ou indireta com a doença que está sendo estudada e representar apenas um marcador da mesma devido à sua proximidade com o gene verdadeiramente relacionado à doença. Diferentes polimorfismos em diversos genes já foram associados à RD^(35, 40, 50). As principais variações genéticas serão descritas a seguir e os estudos estão resumidos no Quadro 3.

Gene da Aldose Redutase

O gene codificador da aldose redutase, a primeira e limitante enzima da via do poli-ol no metabolismo da glicose, é considerado um gene candidato para as complicações microvasculares nos pacientes portadores de DM, incluindo a RD⁽⁵¹⁻⁶²⁾. Os dois polimorfismos mais frequentemente estudados são o C-106T e o (CA)_n. Na maioria dos estudos foram demonstradas associações positivas com a RD para pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2 em variadas etnias.

Gene do “Vascular endothelial growth factor” (VEGF)

O VEGF é um dos principais mediadores da angiogênese, e também possui forte efeito no aumento da permeabilidade vascular⁽⁶³⁾, o que faz com que seu gene seja um candidato relacionado à presença de RD proliferativa e de edema macular diabético. De fato, estudos com diversas etnias confirmaram a associação positiva de polimorfismos do gene do VEGF com a presença de RD proliferativa⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾.

Gene do Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gama)

O PPAR-gama é um receptor nuclear que regula ou está associado à diferenciação adipocitária, ao metabolismo lipídico, à sensibilidade insulínica e a

algumas situações clínicas possivelmente mediadas pelo VEGF, como por exemplo, a RD. Esta substância é expressa por células do endotélio vascular, coróide e células retinianas⁽⁶⁸⁾. Outro mecanismo que pode explicar a influência do PPAR-gama na patogênese da RD incipiente é a via óxido nítrico (ON). Na microcirculação retiniana, há uma liberação basal de ON que mantém o fluxo sanguíneo retiniano. A troglitazona é um potente agonista do PPAR-gama. Um estudo que avaliou o efeito da troglitazona na liberação de ON demonstrou que esta medicação foi capaz de normalizar a liberação de ON inibida pela hiperglicemia⁽⁶⁹⁾.

Embora o polimorfismo Pro12Ala do PPAR-gamma2 tenha sido considerado um fator de proteção para nefropatia diabética⁽⁷⁰⁾, este polimorfismo não apresentou qualquer associação com RD^(71,72)(Quadro 3). Já o polimorfismo do gene co-ativador do PPAR-gama (PPARGC1) foi associado positivamente (fator de risco) com a RD⁽⁷²⁾.

Gene do “Intercellular adhesion molecule-1”(ICAM-1)

A adesão de leucócitos à vasculatura retiniana está associada à patogênese da RD, visto poder resultar em oclusão capilar e conseqüentemente, isquemia. O VEGF aumenta a expressão vascular retiniana de ICAM-1, promovendo leucostase retiniana em olhos de pacientes diabéticos⁽⁷³⁾.

No Japão, 181 pacientes com DM tipo 2 apresentaram freqüência do genótipo K469K e do alelo K do ICAM-1 de forma significativamente mais elevada em pacientes com RD do que em pacientes sem RD, conferindo um risco para RD de 3,5 vezes, independentemente de outros fatores de risco para RD⁽⁷⁴⁾. A associação positiva do mesmo polimorfismo K469K com a RD foi confirmada em outro estudo com pacientes chineses⁽⁷⁵⁾.

Gene do “Receptor of Advanced Glycation End Products” (RAGE)

Os produtos da glicação avançada se ligam a receptores específicos (RAGE), induzindo estresse celular oxidativo e disfunção vascular, participando da patogênese da RD⁽¹⁸⁾. Em pacientes japoneses, não houve associação de polimorfismos do RAGE (G1704T e G82S) e RD⁽⁷⁶⁾ e um estudo com 200 pacientes indianos com DM tipo 2 mostrou que o polimorfismo Gly82Ser é um fator de proteção para a presença da RD⁽⁷⁷⁾.

Com relação aos polimorfismos -429T/C e -374T/A do RAGE, foi demonstrado um aumento significativo do alelo C em indivíduos com RD, quando comparados aos indivíduos sem RD⁽⁷⁸⁾. Entretanto, tais resultados não foram confirmados outros autores⁽⁷⁹⁾.

Gene do “Glucose Transporter-1” (GLUT-1)

As alterações patológicas na microvasculatura retiniana característica da RD são resultado de exposição crônica à hiperglicemia. O GLUT-1 media a entrada de glicose nas células endoteliais retinianas e alterações na expressão do GLUT-1 na barreira hemoretiniana interna podem ter um impacto direto no desenvolvimento subsequente de RD^(18, 40). Dois estudos, um com caucasianos portadores de DM tipo 2 do Mediterrâneo⁽⁸⁰⁾ e outro com pacientes britânicos com DM tipo 1⁽⁸¹⁾, não encontraram associação entre polimorfismos do GLUT-1 e RD.

Gene do “Plasma-cell membrane differentiation antigene-1” (PC-1/ENPP1)

Polimorfismos do gene do PC-1 foram associados à obesidade^(82,83), resistência insulínica⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾, nefropatia diabética⁽⁸⁷⁾ e risco para DM tipo 2⁽⁸⁸⁾. Um estudo prospectivo de dez anos realizado com 30 pacientes com DM tipo 1 da região sul do Brasil encontrou um aumento no número de casos novos de RD em pacientes com o alelo Q do polimorfismo K121Q. Tal associação, entretanto, não se manteve após a inclusão de outros fatores de risco para RD⁽⁸⁹⁾. Um estudo transversal realizado com

pacientes dinamarqueses também não encontrou associação entre o mesmo polimorfismo e a RD⁽⁸¹⁾.

Gene do “ $\alpha 2\beta$ integrin”

As plaquetas estão provavelmente envolvidas na patogênese da RD. Em pacientes com DM, as plaquetas são hiperreativas a agentes agregadores tais como colágeno, trombina e difosfato de adenosina⁽⁹⁰⁾. Recentemente, variações genéticas no gene do “ $\alpha 2\beta$ integrin”, um receptor plaquetário para colágeno, foram associadas com a DR. Estudos realizados no Japão⁽⁹¹⁾ e na Eslovênia⁽⁹⁰⁾ encontraram um aumento significativo no risco para RD relacionada ao polimorfismo *Bg/II*, considerando-o um fator de risco independente para RD em pacientes com DM tipo 2.

Gene da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

A ECA catalisa a reação química que converte angiotensina I em angiotensina II, e inativa a bradicinina, peptídeos com papel chave na modulação do tônus vascular retiniano. Os níveis plasmáticos da ECA estão sob controle genético e até 50% deste controle se deve a um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) do gene da ECA⁽⁹²⁾. Na sua maioria, os estudos têm mostrado ausência de associação de polimorfismo deste gene com RD^(89,92-101)(Quadro 3), com exceção de Matsumoto et al, que encontrou associação positiva com a RD avançada⁽⁹⁶⁾.

Considerações finais

A RD é a complicação crônica mais frequentemente observada em pacientes com DM e é responsável por elevada morbidade nestes pacientes. As intervenções terapêuticas e de prevenção atualmente disponíveis ainda deixam a desejar. Não existe uma forma precisa de identificação do paciente em risco para o desenvolvimento ou progressão da RD e os tratamentos atualmente disponíveis não impedem a evolução da mesma na totalidade dos pacientes. As evidências atuais obtidas através de estudos de

famílias sugerem fortemente que ocorra agregação familiar de RD. Em relação ao sistema HLA, para alguns alelos já foi demonstrada associação com a RD, mas esta associação foi demonstrada apenas em grupos étnicos selecionados. Já os resultados obtidos a partir do estudo de genes candidatos, de uma maneira geral relacionados à patogênese da RD, são estimulantes no sentido de que podem vir a representar uma estratégia objetiva de identificação de pacientes em risco, bem como orientar pesquisas sobre novas medidas terapêuticas para a RD. A associação positiva de polimorfismos do gene da aldose redutase e do gene do VEGF com a RD foi observada na maioria das populações estudadas. Já o polimorfismo da RAGE parece, em algumas populações, conferir proteção em relação à RD.

O conhecimento dos fatores genéticos relacionados à RD pode tornar-se uma importante alternativa para o manejo desta complicação.

Referências

1. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998;21:518-24.
2. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15:1509-16.
3. Nucci LB, Toscano CM, Maia ALM, Fonseca CD, Britto MMB, Duncan BB, et al. A nationwide population screening program for diabetes in Brazil. *Pan Am J Public Health* 2004;16:320-27.
4. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27:2540-53.
5. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350:48-58.
6. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. *Ophthalmology* 1991;98:766-85.
7. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1217-28.
8. The Diabetes Control and Complications Trial. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1997;46:1829-39.

9. The Diabetic Retinopathy Study Research Group (DRS). Indications for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: Diabetic Retinopathy Study Report no. 14. *Int Ophthalmol Clin* 1987;27:239-53.
10. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2003;26:226-29.
11. Foss MC, Paccola GMGF, Souza NV, Iazigi N. Estudo analítico de uma amostra populacional de diabéticos tipo II da região de Ribeirão Preto (SP). *Rev Assoc Med Bras* 1989;35:179-83.
12. Souza EV, Souza MLV. Diabetic Retinopathy multidisciplinary program at the University of Ribeirão Preto, São Paulo - USP. *Arq Bras Oftalmol* 2002;67:433-36.
13. Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, Santos KG, et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com Diabetes Melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. *Rev Assoc Med Bras* 2004;50:263-67.
14. Santos KG, Tschiedel B, Schneider JR, Souto KEP, Roisenberg I. Prevalence of retinopathy in Caucasian type 2 diabetic patients from the South of Brazil and relationship with clinical and metabolic factors. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:221-25.
15. Gross PB, Canani LH, Lavinsky J, Meotti CD, Burttet LM, Rizzatti M, et al. Agregação familiar de retinopatia diabética em pacientes com diabete melito tipo 2 [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
16. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999;48:909-13.
17. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.

18. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-25.
19. Boelter MC, de Azevedo MJ, Gross JL, Lavinsky J. Fatores de Risco para Retinopatia Diabética. *Arq Bras Oftalmol* 2003;66:239-47.
20. Bosco A, Lerário AC, Soriano D, Santos RF, Massote P, Galvão D, et al. Retinopatia Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:217-27.
21. Radha V, Rema M, Mohan V. Genes and diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2002;50:5-11.
22. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-46.
23. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-66.
24. Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:886-97.
25. Correa ZM, Eagle Jr R. Aspectos patológicos da retinopatia diabética. *Arq Bras Oftalmol* 2005;68:410-14.
26. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. *Ophthalmology* 1991;98:786-806.
27. Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, 3rd, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1998;21:143-56.

28. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110:1677-82.
29. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. *Ophthalmology* 1991;98:823-33.
30. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 2001;44:156-63.
31. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 1994;101:1061-70.
32. The Diabetes Control and Complications Trial. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1997;46:1829-39.
33. The UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998;317:703-13.
34. The UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
35. Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, Hammes HP, Paschke R. Genetics of diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:275-94.
36. Harris MI, Klein R, Cowie CC, Rowland M, Byrd-Holt DD. Is the risk of diabetic retinopathy greater in non-Hispanic blacks and Mexican Americans than in

non-Hispanic whites with type 2 diabetes? A U.S. population study. *Diabetes Care* 1998;21:1230-35.

37. Harris EL, Sherman SH, Georgopoulos A. Black-white differences in risk of developing retinopathy among individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:779-83.

38. Rema M, Saravanan G, Deepa R, Mohan V. Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2002;19:910-16.

39. Hallman DM, Huber JC, Jr., Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care* 2005;28:1163-68.

40. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* 2003;17:305-11.

41. Leslie RD, Pyke DA. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes* 1982;31:19-21.

42. Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-09.

43. Alves C, Meyer I, Toralles MBP, Marback RM. Associação do sistema de histocompatibilidade humano com doenças oftalmológicas. *Arq Bras Oftalmol* 2006;69:273-78.

44. Falck AA, Knip JM, Ilonen JS, Laatikainen LT. Genetic markers in early diabetic retinopathy of adolescents with type I diabetes. *J Diabetes Complications* 1997;11:203-07.

45. Mimura T, Funatsu H, Uchigata Y, Kitano S, Noma H, Shimizu E, et al. Relationship between human leukocyte antigen status and proliferative diabetic

retinopathy in patients with younger-onset type 1 diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 2003;135:844-48.

46. Cruickshanks KJ, Vadheim CM, Moss SE, Roth MP, Riley WJ, Maclaren NK, et al. Genetic marker associations with proliferative retinopathy in persons diagnosed with diabetes before 30 yr of age. *Diabetes* 1992;41:879-85.

47. Wong TY, Cruickshank KJ, Klein R, Klein BE, Moss SE, Palta M, et al. HLA-DR3 and DR4 and their relation to the incidence and progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2002;109:275-81.

48. Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH, Knowler WC. Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. Pima Diabetes Genes Group. *Diabetes* 1998;47:821-30.

49. Haines JL, Pericak-Vance MA. Determining the genetic component of a disease. In: *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. New York: Wiley-Liss Inc.; 1998. p. 93-129.

50. Taverna MJ. Genetics of diabetic complications: retinopathy. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004;65:S17-25.

51. Olmos P, Bastias MJ, Vollrath V, Toro L, Trincado A, Salinas P, et al. C(-106)T polymorphism of the aldose reductase gene and the progression rate of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74:175-82.

52. Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. The -106CC genotype of the aldose reductase gene is associated with an increased risk of proliferative diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 2006;88:280-84.

53. Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, Souto K, Roisenberg I. Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;61:133-36.
54. Zghal-Mokni I, Arfa I, Elloumi-Zghal H, Abid A, Amrouche-Rached C, Kaabi B, et al. Association study between diabetic retinopathy and aldose reductase gene polymorphism in Tunisians. *J Fr Ophtalmol* 2005;28:386-90.
55. Petrovic MG, Peterlin B, Hawlina M, Petrovic D. Aldose reductase (AC)_n gene polymorphism and susceptibility to diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in Caucasians. *J Diabetes Complications* 2005;19:70-73.
56. Kumaramanickavel G, Sripriya S, Ramprasad VL, Upadyay NK, Paul PG, Sharma T. Z-2 aldose reductase allele and diabetic retinopathy in India. *Ophthalmic Genet* 2003;24:41-48.
57. Ichikawa F, Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, Yuan X, Nonaka K. Association of an (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5'-region of the aldose reductase gene with retinopathy but not with nephropathy or neuropathy in Japanese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999;16:744-48.
58. Ko BC, Lam KS, Wat NM, Chung SS. An (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early-onset diabetic retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes* 1995;44:727-32.
59. Sivenius K, Niskanen L, Voutilainen-Kaunisto R, Laakso M, Uusitupa M. Aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to microvascular complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004;21:1325-33.

60. Demaine A, Cross D, Millward A. Polymorphisms of the aldose reductase gene and susceptibility to retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4064-68.
61. Wang Y, Ng MC, Lee SC, So WY, Tong PC, Cockram CS, et al. Phenotypic heterogeneity and associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:2410-15.
62. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. An aldose reductase intragenic polymorphism associated with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;46:155-60.
63. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-87.
64. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2006;12:336-41.
65. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:679-85.
66. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1635-39.
67. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004;53:861-64.

68. Bonne C. PPAR gamma: a novel pharmacological target against retinal and choroidal neovascularization. *J Fr Ophtalmol* 2005;28:326-30.
69. Kim J, Oh YS, Shinn SH. Troglitazone reverses the inhibition of nitric oxide production by high glucose in cultured bovine retinal pericytes. *Exp Eye Res* 2005;81:65-70.
70. Caramori ML, Canani LH, Costa LA, Gross JL. The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:3010-13.
71. Stefanski A, Majkowska L, Ciechanowicz A, Frankow M, Safranow K, Parczewski M, et al. Lack of association between the Pro12Ala polymorphism in PPAR-gamma2 gene and body weight changes, insulin resistance and chronic diabetic complications in obese patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2006;37:736-43.
72. Petrovic MG, Kunej T, Peterlin B, Dovc P, Petrovic D. Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene might be a risk factor for diabetic retinopathy in Slovene population (Caucasians) with type 2 diabetes and the Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma gene is not. *Diabetes Metab Res Rev* 2005;21:470-74.
73. Lu M, Perez VL, Ma N, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK, et al. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1808-12.
74. Kamiuchi K, Hasegawa G, Obayashi H, Kitamura A, Ishii M, Yano M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2002;19:371-76.

75. Liu L, Yu Q, Wang H, Zhang SX, Huang C, Chen X. Association of intercellular adhesion molecule 1 polymorphisms with retinopathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2006;23:643-48.
76. Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Kogure A, Toda H, et al. Relation between polymorphisms G1704T and G82S of rage gene and diabetic retinopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Intern Med* 2005;44:417-21.
77. Kumaramanickavel G, Ramprasad VL, Sripriya S, Upadyay NK, Paul PG, Sharma T. Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. *J Diabetes Complications* 2002;16:391-94.
78. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE Gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1505-11.
79. JiXiong X, BiLin X, MingGong Y, ShuQin L. -429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:2696-97.
80. Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Broch M, Aguilar C, Llor C, et al. GLUT1 gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus: genetic susceptibility relationship with cardiovascular risk factors and microangiopathic complications in a Mediterranean population. *Diabetes Res Clin Pract* 1998;41:113-20.
81. Tarnow L, Grarup N, Hansen T, Parving HH, Pedersen O. Diabetic microvascular complications are not associated with two polymorphisms in the GLUT-1 and PC-1 genes regulating glucose metabolism in Caucasians type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1653-56.

82. Wan C, Zhang T, Wang B, Han Y, Zhang C, Zhang Y, et al. Obesity risk associated with the K121Q polymorphism of the glycoprotein PC-1 gene. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:703-08.
83. Matsuoka N, Patki A, Tiwari HK, Allison DB, Johnson SB, Gregersen PK, et al. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:233-37.
84. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M. The K121Q polymorphism of the PC-1 gene is associated with insulin resistance but not with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2003;26:464-67.
85. Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Fernandez-Perez C, Kubaszek A, Laakso M, Serrano-Rios M. K121Q PC-1 gene polymorphism is not associated with insulin resistance in a Spanish population. *Obes Res* 2003;11:603-05.
86. Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, et al. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 1999;48:1881-84.
87. Canani LH, Ng DP, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS. Polymorphism in ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene (ENPP1/PC-1) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1188-93.
88. Bochenski J, Placha G, Wanic K, Malecki M, Sieradzki J, Warram JH, et al. New polymorphism of ENPP1 (PC-1) is associated with increased risk of type 2 diabetes among obese individuals. *Diabetes* 2006;55:2626-30.
89. Azevedo MJ, Dalmaz CA, Caramori ML, Pecis M, Esteves JF, Maia AL, et al. ACE and PC-1 gene polymorphisms in normoalbuminuric Type 1 diabetic patients: a 10-year prospective study. *J Diabetes Complications* 2002;16:255-62.

90. Petrovic MG, Hawlina M, Peterlin B, Petrovic D. *Bg/II* gene polymorphism of the $\alpha 2\beta$ integrin gene is a risk factor for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *J Hum Genet* 2003;48:457-60.
91. Matsubara Y, Murata M, Maruyama T, Handa M, Yamagata N, Watanabe G, et al. Association between diabetic retinopathy and genetic variations in $\alpha 2\beta$ integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* 2000;95:1560-64.
92. Nagi DK, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism, and diabetic retinopathy in subjects with IDDM and NIDDM. *Diabet Med* 1995;12:997-1001.
93. Liao L, Lei MX, Chen HL, Guo LJ, Han XY. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and type 2 diabetic retinopathy. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004;29:410-13.
94. Agardh E, Gaur LK, Lernmark A, Agardh CD. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 subtypes or ACE gene polymorphisms do not seem to be risk markers for severe retinopathy in younger Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2004;18:32-36.
95. Globocnik-Petrovic M, Hawlina M, Peterlin B, Petrovic D. Insertion/deletion plasminogen activator inhibitor 1 and insertion/deletion angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Ophthalmologica* 2003;217:219-24.
96. Matsumoto A, Iwashima Y, Abiko A, Morikawa A, Sekiguchi M, Eto M, et al. Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and advanced diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:195-202.

97. Liao L, Lei M, Chen H, Han X, Fan C. Studies on ACE gene insertion/deletion polymorphism, serum ACE activity, and diabetic retinopathy in type II diabetic patients. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999;24:33-36.
98. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998;41:47-53.
99. Chistiakov DA, Demurov LM, Kondrat'ev I, Milen'kaia TM, Mamaeva GG, Balabolkin MI, et al. Polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene in diabetic retinopathy patients and type 2 diabetes mellitus patients with myocardial infarction. *Genetika* 1998;34:1699-703.
100. Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Llor C, Aguilar C, Broch M, et al. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lack of relationship with diabetic nephropathy and retinopathy in a Caucasian Mediterranean population. *Metabolism* 1997;46:976-80.
101. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, et al. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic nephropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes* 1995;44:489-94.

Quadro 1. Classificação Clínica da Retinopatia Diabética

Gravidade	Achados à oftalmoscopia
Ausência de retinopatia diabética aparente	Sem anormalidades
Retinopatia diabética não-proliferativa leve	Somente microaneurismas
Retinopatia diabética não-proliferativa moderada	Mais do que apenas microaneurismas mas menos do que retinopatia diabética não-proliferativa grave
Retinopatia diabética não-proliferativa grave	- Qualquer um dos seguintes itens: <ul style="list-style-type: none"> - Hemorragias intrarretinianas extensas (>20) em cada um dos 4 quadrantes - Dilatações venosas localizadas em 2 ou mais quadrantes - Anormalidades microvasculares intrarretinianas proeminentes em 1 quadrante ou mais - <u>Ausência</u> de retinopatia diabética proliferativa
Retinopatia diabética proliferativa	Um ou mais dos seguintes itens: <ul style="list-style-type: none"> - Neovascularização - Hemorragia vítrea/pré-retiniana

Quadro 2. Estudos de agregação familiar e retinopatia diabética

Autor	Famílias (n)	Indivíduos (n)	Tipo DM	População avaliada	Agregação para qualquer grau de retinopatia diabética	Agregação para retinopatia diabética grave ou proliferativa
Rema et al.	322	677	2	Sul da Índia	RC = 3,4 (1,6-7,3)	Sem associação
Hallman et al.	282	656	2	Texas, EUA – descendência mexicana	Sem associação	RC 1,7(1,0-2,9)
DCCT	217	458	1 e 2	29 centros nos EUA	Sem associação	RC = 3,1(1,2-7,8)
Gross et al.	127	279	2	Rio Grande do Sul, Brasil	RC* = 3,3(1,2-8,7)	RC = 15,9(2,8-90,1)

DM = Diabete Melito; RC = razão de chances; IC = intervalo de confiança; EUA = Estados Unidos da América.

* Ao se retirar os casos com retinopatia diabética proliferativa, a agregação familiar desaparece.

Quadro 3. Polimorfismos genéticos e retinopatia diabética

Gene	Polimorfismo	População	Tipo DM	N	Associação com retinopatia diabética	Autor
Aldose redutase (ALR2)	C(-106)T	Chilenos	2	53=DM 96=controles	Positiva - qualquer RD	Olmos et al. ⁽⁵¹⁾
		Brasileiros (sul do Brasil)	2	424=DM brancos 155=DM negros	Positiva - RD proliferativa em brancos	Santos et al. ⁽⁵²⁾
		Brasileiros (sul do Brasil)	2	99=com RD 111=sem RD	Sem associação	Santos et al. ⁽⁵³⁾
	(CA)n	Tunisianos	2	47=com RD 28=sem RD	Sem associação	Zghal-Mokni et al. ⁽⁵⁴⁾
		Eslovênios	2	124=com RD 81=sem RD	Positiva - qualquer RD	Petrovic et al. ⁽⁵⁵⁾
		Indianos	2	105=com RD 109=sem RD	Positiva - RD proliferativa e edema macular	Kumaramanickavel et al. ⁽⁵⁶⁾
		Japoneses	2	87=com DM 90=controles	Positiva - qualquer RD	Ichikawa et al. ⁽⁵⁷⁾
		Chineses	2	22=com RD não proliferativa significativa ou RD proliferativa 22=sem RD	Positiva - qualquer RD	Ko et al. ⁽⁵⁸⁾
	C(-106)T e (CA)n	Finlandeses	2	85=com DM 126=controles	Sem associação	Sivenius et al. ⁽⁵⁹⁾
		Britânicos	1	159=com RD 70=sem RD	Positiva - qualquer RD	Demaine et al. ⁽⁶⁰⁾
		Chineses	2	346=com RD 392=sem RD	Positiva - qualquer RD	Wang et al. ⁽⁶¹⁾
		BamHI e (CA)n	Australianos	1	164=com DM	Positiva - qualquer RD
	“Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF)	C(-7)T, T(-498)C, e C(-634)G	Indianos	2	120=com RD proliferativa 90=sem RD	Positiva - RD proliferativa
Japoneses			2	82=com RD proliferativa (47 com edema macular) 93=RDNP (16 com edema macular) 203=sem RD	Positiva - qualquer RD e edema macular	Awata et al. ⁽⁶⁵⁾
		Japoneses	2	150=com RD 118=sem RD	Positiva - qualquer RD	Awata et al. ⁽⁶⁶⁾
-460C		Britânicos caucasianos	1 e 2	69=com RD proliferativa 198=demais RD	Positiva - qualquer RD	Ray et al. ⁽⁶⁷⁾

Gene	Polimorfismo	População	Tipo DM	N	Associação com retinopatia diabética	Autor
“Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma” (PPAR-gamma)	Pro12Ala	Poloneses	2	216=com DM e obesos	Sem associação	Stefanski et al. ⁽⁷¹⁾
		Eslovênios	2	160=com RD 101=sem RD	Sem associação	Petrovic et al. ⁽⁷²⁾
PPAR-gamma coativador-1	Gly482Ser	Eslovênios	2	160=com RD 101=sem RD	Positiva - qualquer RD	Petrovic et al. ⁽⁷²⁾
Enzima conversora da angiotensina (ECA)	I/D	Brasileiros (sul do Brasil)	1	30=DM	Sem associação	Azevedo et al. ⁽⁸⁹⁾
		Britânicos	1 e 2	363=DM tipo 2 186=DM tipo 1 98=controles	Sem associação	Nagi et al. ⁽⁹²⁾
		Chineses	2	72=DM sem RD	Sem associação	Liao et al. ⁽⁹³⁾
		Suecos	1	24=com RD proliferativa 24=com RD leve ou sem RD	Sem associação	Agardh et al. ⁽⁹⁴⁾
		Eslovênios	2	124=com RD 80=sem RD	Sem associação	Globocnik-Petrovic et al. ⁽⁹⁵⁾
		Japoneses	2	60=RD avançada 60=RD graus mais leves 90=sem RD 100=controles	Positiva - para RD avançada	Matsumoto et al. ⁽⁹⁶⁾
		Chineses	2	68=com RD 40=sem RD 36=controles	Sem associação	Liao et al. ⁽⁹⁷⁾
		Metanálise	1 e 2	1008=com RD 1002=sem RD	Sem associação	Fujisawa et al. ⁽⁹⁸⁾
		Russos	1 e 2	DM tipo 1: 31=com RD 33=sem RD DM tipo 2: 37=com RD 178=sem RD	Sem associação	Chistiakov et al. ⁽⁹⁹⁾
		Mediterrâneos caucasianos	2	68=com RD 92=sem RD 90=controles	Sem associação	Gutierrez et al. ⁽¹⁰⁰⁾
		Dinamarqueses	1	155=RD proliferativa 67=sem RD	Sem associação	Tarnow et al. ⁽¹⁰¹⁾

DM=Diabete Melito;RD=retinopatia diabética; RDNP=retinopatia diabética não proliferativa.

**FAMILIAL AGGREGATION OF DIABETIC RETINOPATHY IN BRAZILIAN
TYPE 2 DIABETIC PATIENTS ***

*Running head: Familial aggregation of diabetic retinopathy

Paula B. Gross, M.D.¹

Luís H. Canani, M.D.²

Jacó Lavinsky, M.D.¹

Carolina D. Meotti²

Lucas M. Burtet²

Marcele Rizzatti²

Jorge L. Gross, M.D.²

Mirela J. de Azevedo, M.D.²

¹Ophthalmology Division, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Endocrine Division, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author

Mirela J. de Azevedo

Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Prédio 12, 4º andar, 90035-003, RS, Brazil.

E-mail: mirelaazevedo@terra.com.br.

Phone: +55 51 2101-8127. Fax: + 55 51 2101-8775

This article will be submitted to the periodic Ophthalmology.

Abstract

Objective: To ascertain the presence of familial clustering of diabetic retinopathy (DR) in a sample of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus (DM).

Design: Familial aggregation study.

Participants: Families with two or more type 2 DM siblings were identified at an outpatient clinic. The first sibling evaluated was considered a proband regardless of diabetes duration.

Methods: DR was evaluated using fundus photography of seven standard fields, and graded according to the International Clinical Diabetic Retinopathy Severity Scale: 1- no retinopathy; 2- early non-proliferative DR; 3- moderate non-proliferative DR; 4- severe non-proliferative DR or 5- proliferative DR. All patients underwent clinical and laboratory evaluations.

Main outcome measures: Familial aggregation of proliferative DR or any degree of DR.

Results: The overall prevalence of any degree of DR in 279 type 2 DM patients (127 families) was 44%, and of the proliferative stage 11.5%. After being divided into two groups according to the presence of proliferative DR or its absence in the probands, siblings did not differ regarding age, sex proportion, DM duration, blood pressure levels and the main metabolic control indexes. On multiple logistic regression analysis, the presence of proliferative DR in the proband was positively associated with the presence of DR in the sibling (OR 15.92; 95% CI 2.80-90.11; $P = 0.002$) adjusted for duration of diabetes, A1C test, systolic blood pressure and diabetic nephropathy. Familial aggregation of DR was also demonstrated for any degree of DR (OR 3.26; 95% CI 1.22-8.74; $P = 0.019$), but no familial clustering of DR was demonstrated when patients with proliferative DR were excluded from this analysis.

Conclusions: Familial aggregation of DR was confirmed in this sample of Brazilian type 2 diabetic patients, and this association was due to the presence of proliferative DR. These findings reinforce the presence of a genetic susceptibility to DR, especially in advanced stages.

Keywords: familial aggregation, diabetic retinopathy, type 2 diabetes mellitus

Diabetes Mellitus (DM) affects over 135 million people worldwide and diabetic retinopathy (DR) is the most common chronic microvascular diabetic complication¹. DR is the main cause of legal blindness among working-age individuals in the United States^{1, 2}, and it is also becoming an important cause of vision loss in developing countries³. An increasing frequency of proliferative DR was found at 15 years of diabetes duration in largely white patients given diagnosis of diabetes at age 30 years or older⁴.

The main known risk factors for DR are duration of DM⁴⁻⁸, poor glycemic control⁹⁻¹² and hypertension¹³⁻¹⁵, besides other factors such as microalbuminuria¹⁶⁻¹⁸. Even though tight control of hyperglycemia¹² or blood pressure levels¹⁹ can delay DR development and progression, some patients still develop it. On the other hand, a number of patients seem to be protected from this complication. In addition, recent clinical studies have revealed substantial variation in the prevalence, onset and severity of DR in different racial/ethnic groups with diabetes^{5, 20}. Furthermore, the presence of familial aggregation of other microvascular chronic diabetic complications, such as diabetic nephropathy²¹⁻²⁴, reinforces the possible role of genetic factors in DR²⁵⁻²⁹.

Studies to evaluate DR familial aggregation are scarce and evaluate only type 1 patients²⁵ or type 2 diabetic patients in special ethnic groups^{26, 27}. Therefore, the aim of this study was to analyze the presence of familial clustering of DR in a sample of Brazilian type 2 DM patients.

Patients and Methods

Patients

Information was collected from siblings using a family study approach. Patients from the outpatient Endocrine Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre were enrolled from August 2004 to December 2005. Families with two or more siblings with type 2 DM were identified ($n = 156$) among consecutively attending outpatients. Our unit provides assistance to 11% of the type 2 diabetic patients covered by the Public Health Care System of our city³⁰. The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients gave their written informed consent to participate.

Type 2 DM was defined as follows: age over 30 years at onset of DM, no previous episode of ketoacidosis or documented ketonuria, and treatment with insulin beginning only 5 years after diagnosis.

In each family, the first evaluated sibling with type 2 DM was considered the proband (index patient) regardless of DM duration. Other individuals with type 2 DM were designated siblings (nonprobands). Twenty-nine of the 156 families were excluded due to: siblings living outside the state ($n = 8$), refusal to participate ($n = 5$), and deceased at the time of the study ($n = 16$). The patients whose families were excluded from the study ($n = 29$) did not differ from the patients included ($n = 279$) regarding their DR status [no retinopathy (50.0% vs. 55.8%); non-proliferative DR (38.5% vs. 32.7%); proliferative DR (11.5% vs. 11.5%); $P = 0.265$], proportion of male sex (37.9% vs. 41.9%; $P = 0.677$), and A1C test values $\geq 7\%$ (72.7% vs. 61.0%; $P = 0.278$). However, the proportion of included patients with ≥ 15 years of duration of DM was lower than of the excluded patients (31.8% vs. 65.5%; $P = 0.016$).

Clinical evaluation

Probands (n = 127) and siblings (n = 152) underwent a standardized clinical evaluation consisting of a questionnaire which included questions about age, known diabetes, ethnicity (self-definition as white or non-white), and drug treatment, as well as a physical and laboratory evaluation. Smoking habit was considered positive if the patient was a current smoker and/or a former smoker (quit smoking for more than 6 months). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) / height² (m). Sitting blood pressure was measured to the nearest 2 mmHg after a 5-minute rest with a standard mercury sphygmomanometer. Hypertension was defined as blood pressure $\geq 140/90$ mmHg or use of antihypertensive drugs³¹. Cardiovascular events were diagnosed in the presence of myocardial infarction, revascularization procedures, congestive heart failure, sudden death or death following acute myocardial infarction. The diagnosis of diabetic nephropathy was established by the presence of micro- or macroalbuminuria and the absence of other possible causes of increased albuminuria, such as other renal disease and heart failure.

Retinopathy grading

Color fundus 45° stereoscopic photographs of seven standard fields were taken of each eye (Zeiss FF450 Plus IR retinal camera) through dilated pupils. Photographs were digitalized (HP Photosmart S20 – 900 ppp resolution) and compressed according to the Joint Photographic Experts Group (JPEG) algorithm to at least 120 KB³². Fundus examination was graded by a trained ophthalmologist (PBG) while taking the photographs, and this score was used to classify retinopathy status for the final data analysis. After the data collection was completed, fundus photographs were analysed again by the same ophthalmologist who was unaware of the patient's identity. In order to analyze the agreement of DR classification carried out by different ophthalmologists, a second

ophthalmologist (JL), also unaware of the patients' clinical data, scored the photographs. The retinopathy was scored according to the more severely affected eye using the International Clinical Diabetic Retinopathy Severity Scale³³ (Table 1). Patients with panphotocoagulation were classified as presenting proliferative DR. No patient was excluded as a result of unreadable fundoscopy in both eyes.

All patients were classified according the presence or absence of proliferative DR. In addition, siblings were divided into two according to the presence or absence of DR in their probands.

Laboratory methods

After 12-h fasting, a blood sample was collected to measure the A1C test (HPLC, reference range: 4.7-6.0%; Merck-Hitachi L-9100 glyated hemoglobin analyzer, Merck, Darmstadt, Germany), creatinine (Jaffé's reaction, autoanalyzer ADVIA1650, Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, US), triglycerides and total cholesterol (enzymatic colorimetric method, Merck Diagnostica, Darmstadt, Germany; Boehringer Mannheim, Buenos Aires, Argentina), and HDL (homogeneous direct method, autoanalyzer ADVIA1650). LDL was estimated by the Friedewald equation.

Albuminuria was measured in sterile urine samples, either in spot or in 24-h timed specimens (immunoturbidimetry – MicroAlb SeraPak® Bayer, Tarrytown, NY, USA on Cobas Mira Plus - Roche®). According to the type of urine sample, patients were classified as normoalbuminuric (urinary albumin <17 mg/l or <30 mg/24h), microalbuminuric (urinary albumin 17-174 mg/l or 30-299 mg/24h), macroalbuminuric (urinary albumin >174 mg/l or >300 mg/24h) or with end stage renal disease. The diagnosis of micro- or macroalbuminuria was confirmed in a second urine sample³⁴ in 64% of patients (63 out of 99 patients).

Statistical analysis

Unpaired Student *t*-test, Mann-Whitney U and chi-square tests were used to compare clinical and laboratory data between groups. The kappa statistic was used to assess the agreement between classifications of DR graded by the same ophthalmologist, and by different ophthalmologists on two separate occasions. $k = 0$ defines no agreement, and $k = 1$ defines total agreement. Multiple logistic regression models were used to evaluate factors associated with proliferative DR in the sibling (dependent variable). Goodness-of-fit tests for these regression models were applied: Hosmer and Lemeshow Test, to evaluate whether the estimates of the model fit the data at an acceptable level, and Nagelkerke R^2 to quantify to what extent the variance of the dependent variable is explained by the constructed regression model. Factors that could have influenced DR were included as independent variables. The A1C test was categorized as a dichotomous variable relying on a specific statement for diabetic patients³⁵. The cut-off value of 15 years of DM duration was based on WESDR⁴. Data were expressed as mean \pm standard deviation, median (range) or percentage of patients with the analyzed characteristics. *P* values of <0.05 (2-tailed) were considered significant. Data were analyzed using the SPSS statistical package 14.0.

Results

A total of 127 probands and 152 siblings were analyzed (279 patients). In 22 families (17.4%), more than one sibling with type 2 DM (2.14 ± 0.35 ; 2 to 3 siblings) were included. The overall prevalence of any degree of DR in the 279 patients was 44%, and of the proliferative DR, 11.5%. The agreement of DR classification by funduscopy while performing the retinographies and DR classification by digitalized photographs (PBG) was 93.3% ($k = 0.888$; $P < 0.001$). The agreement of DR classification carried out

by photographs performed by two ophthalmologists (PBG and JL) was 92.9% ($k = 0.876$; $P < 0.001$).

Clinical and laboratory characteristics of the probands and siblings were compared (Table 2). There was no difference regarding most evaluated features, including age, duration of DM, glycemic and blood pressure control indexes, and the presence of proliferative DR.

Table 3 depicts clinical and laboratory features of siblings according to the presence of proliferative DR in the probands. The prevalence of any degree of DR in siblings who had probands with proliferative DR ($n = 13/19$; 68.4%) was higher than in those whose probands did not have proliferative DR ($n = 48/133$; 36.1%) ($P < 0.007$). Also, the prevalence of proliferative DR was higher in the siblings who had probands with proliferative DR ($n = 7/19$; 36.8%) when compared to siblings who had probands without proliferative DR ($n = 8/133$; 6.0%) ($P < 0.0001$).

Figure 1 shows the cumulative prevalence of proliferative DR in the siblings according to the presence of proliferative DR in the probands. Although the duration of DM was not different between the two groups (Table 3), siblings of probands with proliferative DR seemed to have a marked increase in the frequency of proliferative DR with increased duration of DM.

A multiple logistic regression analysis was performed. The variables significantly associated with the presence of proliferative DR in the sibling (dependent variable) were: the presence of proliferative DR in the proband (OR 15.92; 95% CI 2.80-90.11; $P = 0.002$) and diabetic nephropathy in the sibling (OR 13.67; 95% CI 1.27-146.88; $P = 0.031$). This regression analysis was adjusted for other variables that may influence the presence of proliferative DR in the sibling: duration of diabetes ≥ 15 years (OR 6.38; 95% CI 1.15-35.42; $P = 0.034$), A1C test $\geq 7\%$ (OR 3.36; 95% CI 0.47-24.10;

$P = 0.228$), and presence of hypertension (OR 2.55; 95% CI 0.03-19.58; $P = 0.368$). According to the Hosmer and Lemeshow test, this constructed model was well fitted ($P = 0.997$), and almost 50% of the variance of the dependent variable (Nagelkerke $R^2 = 0.481$) was accounted for by this regression model. When the analysis was performed with only one sibling and proband pair randomly selected from each family, the presence of proliferative DR in the proband was still associated with the presence of proliferative DR in the sibling (OR = 14.68, 95% CI 2.60 – 82.85; $P = 0.002$).

Familial aggregation of DR was also demonstrated when the presence of any degree of DR in the sibling was the dependent variable. In this regression model, the presence of any degree of DR in the proband (OR 3.26; 95% CI 1.22-8.74; $P = 0.019$), and the following variables in the sibling, A1C $\geq 7\%$ (OR 11.03; 95% CI 3.58-34.02; $P < 0.001$), duration of diabetes ≥ 15 years (OR 5.90; 95% CI 2.04-17.09; $P = 0.001$), and diabetic nephropathy (OR 3.30; 95% CI 1.25-8.72; $P = 0.016$) were positively associated with the presence of proliferative DR in the sibling, adjusted for the presence of hypertension (OR 2.69; 95% CI 0.89-8.08; $P = 0.077$). However, familial aggregation was not demonstrated when patients with proliferative DR were excluded from the analysis (data not shown).

Discussion

In the present study, it was demonstrated that proliferative DR in siblings was significantly associated with the presence of proliferative DR in the probands adjusted for duration of diabetes, A1C test, and systolic blood pressure. This data highlights the fact that genetic predisposition is a major determinant for the presence of advanced stages of DR in patients with type 2 DM, especially proliferative DR. Furthermore, familial clustering seems to be the most important factor to influence the cumulative prevalence of proliferative DR (Figure 1). This observation could not be explained by

differences in traditional DR risk factors, since siblings with probands with and without proliferative DR had a similar duration of diabetes, blood pressure levels, glycemic control and diabetic nephropathy status.

Duration of DM is probably the strongest predictor for development and progression of DR^{4, 8}. Adopting a random selection of probands, independently of their duration of DM, and furthermore, adjusting all regression models for duration of DM and other known DR risk factors (A1C test and blood pressure levels) strengthens the results of the present study.

Other authors also have shown a familial aggregation of DR. In the Diabetes Control and Complications Trial a familial clustering of DR in relative of type 1 DM patients was demonstrated only in advanced forms of DR²⁵. In this multicenter study, first-degree relatives with type 1 and type 2 DM were evaluated. Although there was an overall increase in the risk of severe DR in first-degree relatives, severity of DR was not correlated between siblings.

Familial aggregation for DR was also demonstrated in other ethnic samples. In South-Indian type 2 diabetic patients, a 3.37 times increased chance of having any DR in the presence of a sibling with DR was observed²⁷ However this study failed to detect familial aggregation of more advanced forms of DR. Besides dealing with a different ethnic group, probands were selected for longer duration of DM or more severe DR stage.

A recent study on Mexican-American type 2 diabetic patients²⁶ also showed evidence of familial aggregation for more severe stages of DR, but not for the occurrence of any DR. The overall prevalence of DR (69.7%) was much higher than that observed in the present study. The authors associated this high prevalence mainly with the long duration of DM in their patients (9.0 ± 7 years). Ethnic aspects could

explain these differences since in our study patients had an even longer duration of DM (12.2 ± 9 years), but a lower prevalence of DR (44%).

The prevalence of any degree of DR in the present study was similar to that reported in some population-based studies³⁶, including a regional study³⁷ also performed in the southernmost state of Brazil. On the other hand, the prevalence of proliferative DR (11.5%) was somewhat higher than described by others (1.0 to 6.9%)³⁶. The long duration of DM observed in patients with proliferative DR (21 ± 9 years) could explain this increased prevalence.

One possible limitation of the present study could be that DR was not graded according to the ETDRS, the reference standard grading system. The International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale³³ is a user-friendly consensus grading scale for DR based on ETDRS³⁸ and WESDR³⁹ results. It is unlikely that the use of this classification misdirected our results, since in this cross-sectional study our aim was to identify patients affected by any degree of DR, and to differentiate those affected by proliferative DR. The DR grading system chosen is fully adequate to perform this simplified classification. Moreover, the accuracy of DR grading in the present study was sustained by scoring DR while the photographs were taken by the same ophthalmologist, and by a good agreement of grading between different readers. Finally the wide confidence intervals observed in the logistic regression models used to evaluate the role of familial aggregation of DR could be due to a relatively small sample of patients studied. However, the results of the chi-square goodness-of-fit tests confirmed that the logistic multiple regression analyses performed were reliable.

In conclusion, a familial aggregation of proliferative DR was demonstrated in this sample of type 2 DM patients from southern Brazil.

Acknowledgments: This study was supported by grants from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (CNPq, # 6610621996/1), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, # 0407-5). PBG was supported by a scholarship from Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). LHC was supported by a grant from CAPES (PRODOC. # 127/03-5).

References

1. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004; 27:2540-53.
2. Sanchez-Thorin JC. The epidemiology of diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38:11-18.
3. Radha V, Rema M, Mohan V. Genes and diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2002; 50:5-11.
4. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:527-32.
5. Wong TY, Klein R, Islam FMA, Cotch MF. Diabetic Retinopathy in a Multi-ethnic Cohort in the United States. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:446 – 55.
6. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998; 105:1801-15.
7. Chen MS, Kao CS, Chang CJ, et al. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy among noninsulin-dependent diabetic subjects. *Am J Ophthalmol* 1992; 114:723-30.
8. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:1217-28.
9. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med* 1994; 154:2169-78.

10. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 2001; 44:156-63.
11. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.
12. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-53.
13. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321:412-19.
14. Cignarelli M, De Cicco ML, Damato A, et al. High systolic blood pressure increases prevalence and severity of retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1992; 15:1002-08.
15. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, et al. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:1631-40.
16. Boelter MC, Gross JL, Canani LH, et al. Proliferative diabetic retinopathy is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:1033-39.
17. Cruickshanks KJ, Ritter LL, Klein R, Moss SE. The association of microalbuminuria with diabetic retinopathy. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology* 1993; 100: 862-67.

18. Savage S, Estacio RO, Jeffers B, Schrier RW. Urinary albumin excretion as a predictor of diabetic retinopathy, neuropathy, and cardiovascular disease in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19: 1243-48.
19. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998; 317:703-13.
20. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye* 2003; 17:305-11.
21. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48:909-13.
22. Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR, et al. The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am J Med* 1985; 78:785-94.
23. Vijay V, Snehalatha C, Shina K, et al. Familial aggregation of diabetic kidney disease in Type 2 diabetes in south India. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 43:167-71.
24. Nelson RG, Pettitt DJ, Knowler WC, Bennett PH. Prediabetic blood pressure and familial predisposition to renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1995; 9: 212-14.
25. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1997; 46:1829-39.
26. Hallman DM, Huber JC, Jr., Gonzalez VH, et al. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care* 2005; 28:1163-68.
27. Rema M, Saravanan G, Deepa R, Mohan V. Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2002; 19:910-16.

28. Hanis CL, Hallman D. Genetics of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2006; 6:155-61.
29. Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, et al. Genetics of diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114:275-94.
30. DATASUS - Ministério da Saúde. Available at: <http://www.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Accessed October 10, 2006.
31. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-72.
32. Conrath J, Erginay A, Giorgi R, et al. Evaluation of the effect of JPEG and JPEG2000 image compression on the detection of diabetic retinopathy. *Eye* 2006 Available at: <http://www.nature.com/eye/journal/vaop/ncurrent/abs/6702238a.html>. Accessed October 10, 2006.
33. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003; 110:1677-82.
34. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005; 28:164-76.
35. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2006 *Diabetes Care* 2006; 29: S4-42.
36. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:552-63.
37. Santos KG, Tschiedel B, Schneider JR, et al. Prevalence of retinopathy in Caucasian type 2 diabetic patients from the South of Brazil and relationship with clinical and metabolic factors. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:221-25.

38. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. *Ophthalmology* 1991; 98:766-85.
39. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. X. Four-year incidence and progression of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 years or more. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:244-49.

Table 1. International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale³³

Proposed Disease Severity Level	Findings observed at Dilated Ophthalmoscopy	Derivation from ETDRS Levels
No apparent Retinopathy	No abnormalities	Levels 10: DR absent
Mild Non-Proliferative Diabetic Retinopathy	Microaneurysms only	Level 20: Very mild NPDR
Moderate Non-proliferative Diabetic Retinopathy	More than just microaneurysms but less than Severe Non-proliferative Diabetic Retinopathy	Levels 35, 43 moderate NPDR less than 4:2:1 Level 47: moderate NPDR less than 4:2:1
Severe Non-Proliferative Diabetic Retinopathy	- Any of the following: - Extensive (>20) intraretinal hemorrhages in each of 4 quadrants - Definite venous beading in 2+ quadrants - Prominent IRMA in 1+ quadrant - <u>And no</u> signs of Proliferative Retinopathy	53A-E: severe to very severe NPDR, 4:2:1 rule
Proliferative Diabetic Retinopathy	One or more of the following: - Neovascularization - Vitreous/preretinal hemorrhage	Levels 61, 65, 71,75, 81,85: PDR, high-risk PDR, very severe or advanced PDR

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

DR: Diabetic Retinopathy; NPDR: Non-Proliferative Diabetic Retinopathy

PDR: Proliferative Diabetic Retinopathy

³³ Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003; 110:1677-82.

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of type 2 diabetic siblings defined as probands or siblings

	Probands	Siblings	<i>P</i>
	127	152	--
Age (years)	59.32 ± 9.04	59.05 ± 10.61	0.814
Males (%)	44.9	39.5	0.362
Whites (%)	75.6	77.0	0.787
DM duration (years)	13.1 ± 8.8	11.4 ± 8.6	0.103
Smokers (%)	54.3	56.6	0.707
Insulin use (%)	37.8	33.8	0.486
Cardiovascular events (%)	26.2	21.7	0.382
Hypertension (%)	80.3	70.4	0.057
Systolic BP (mmHg)	137.6 ± 26.0	139.6 ± 24.3	0.521
Diastolic BP (mmHg)	80.7 ± 12.5	82.4 ± 12.9	0.285
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 4.6	29.2 ± 5.5	0.964
Serum creatinine (mg/dl)	1.1 ± 0.9	1.2 ± 0.9	0.841
A1C test (%)	7.7 ± 1.7	8.1 ± 2.1	0.171
Total Cholesterol (mg/dl)	190.9 ± 42.8	198.4 ± 47.0	0.186
HDL Cholesterol (mg/dl)	48.5 ± 12.6	46.8 ± 12.2	0.283
LDL Cholesterol (mg/dl)	105.7 ± 38.1	115.5 ± 40.4	0.050
Triglycerides (mg/dl)	145 (27-1000)	157 (51-494)	0.385
Diabetic Nephropathy (%)	34.8 (40/115)	45.4 (59/130)	0.091
Any degree of DR (%)	48.8	40.1	0.146
Proliferative DR (%)	13.4	9.9	0.359

Data are % of patients with the characteristics, mean ± SD or median (range)

DR: diabetic retinopathy; BP: blood pressure; BMI: body-mass index; A1C test: glycated hemoglobin

Table 3. Clinical and laboratory characteristics of type 2 diabetic siblings grouped according to the presence of Proliferative Diabetic Retinopathy in the probands

Sibling characteristics	Proband without Proliferative DR	Proband with Proliferative DR	<i>P</i>
N	133	19	--
Age (years)	59.3 ± 10.8	57.2 ± 9.3	0.409
Males (%)	37.6	52.6	0.210
Whites (%)	78.9	63.2	0.126
DM duration (years)	11.1 ± 8.3	13.7 ± 10.1	0.213
Smokers (%)	58.6	42.1	0.174
Insulin use (%)	32.6	42.1	0.202
Cardiovascular events (%)	20.3	31.6	0.265
Hypertension (%)	69.2	78.9	0.383
Systolic BP (mmHg)	139.2 ± 23.2	142.6 ± 31.4	0.562
Diastolic BP (mmHg)	81.9 ± 12.2	85.3 ± 17.7	0.290
BMI (kg/m ²)	29.3 ± 5.6	28.0 ± 4.8	0.332
Serum creatinine (mg/dl)	1.2 ± 1.0	1.0 ± 0.3	0.468
A1C test (%)	8.0 ± 2.1	8.4 ± 1.8	0.436
Total Cholesterol (mg/dl)	197.6 ± 47.5	203.8 ± 44.7	0.605
HDL Cholesterol (mg/dl)	46.1 ± 12.3	51.5 ± 10.7	0.081
LDL Cholesterol (mg/dl)	113.8 ± 40.4	126.7 ± 39.6	0.209
Triglycerides (mg/dl)	161 (51-494)	119 (70-242)	0.011
Diabetic Nephropathy (%)	43.9 (50/114)	56.3 (9/16)	0.351
Any degree of DR (%)	36.1	68.4	<0.007
Proliferative DR (%)	6.0	36.8	<0.0001

Data are % of patients with the characteristics, mean ± SD or median (range)

DR: diabetic retinopathy; BP: blood pressure; BMI: body-mass index; A1C test: glycated hemoglobin

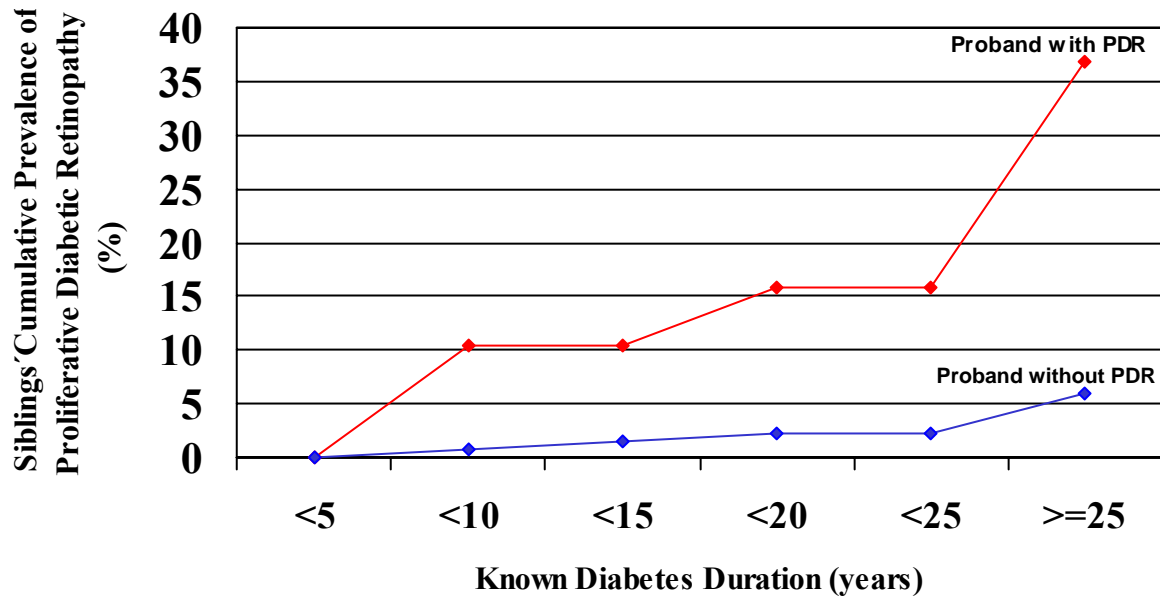


Figure 1. Cumulative prevalence of proliferative diabetic retinopathy (PDR) in the siblings according to the presence of PDR in the probands