

Factores genéticos de susceptibilidade para a retinopatia diabética em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2

Genetic susceptibility factors for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus

Fernanda Azancoth¹, Peter Pêgo^{1,2}, Manuel Bicho¹, Constança Coelho¹

¹ Laboratório de Genética, Centro de Cardiologia, Faculdade de Medicina de Lisboa.

² Serviço de Oftalmologia, Hospital Prof. Dr. Fernando da Fonseca, Amadora, Portugal.

Correspondência: Constança Coelho › Laboratório de Genética › Faculdade de Medicina de Lisboa › Edifício Egas Moniz, Piso 1C › Av. Prof. Egas Moniz › 1649-028 LISBOA › constancacoelho@fm.ul.pt

RESUMO

A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por uma elevada morbilidade e mortalidade em todo o Mundo, afectando significativamente a qualidade de vida, essencialmente devido às suas complicações. Dentre essas, a retinopatia diabética (RD) é considerada uma das mais graves, calculando-se que seja responsável por 4,8% dos indivíduos cegos em todo o mundo. Vários estudos sugerem uma componente genética como um dos principais factores para o aparecimento e desenvolvimento da RD, e algumas variantes genéticas têm sido associadas ao risco de ocorrência de RD em diferentes populações. Dos vários genes candidatos, o gene do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) é um dos mais estudados pois, por promover a angiogénese e a neo-vascularização, desempenha um papel fundamental nas complicações microvasculares da retina na RD. Outro importante gene candidato é o RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), activado pelos AGEs (*advanced glycation end products*), e, mais recentemente, os genes da paraoxonase, PON1 e PON2, associada ao controlo glicémico. No entanto, permanecem desconhecidos os mecanismos genéticos responsáveis por essa susceptibilidade. O objectivo deste artigo é rever a literatura existente sobre este assunto, por forma a tentar esclarecer a contribuição desses genes para o aparecimento e agravamento da RD.

PALAVRAS-CHAVE

Diabetes mellitus tipo 2; Retinopatia diabética; Predisposição genética; VEGF; RAGE; PON.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is responsible for a high morbidity and mortality worldwide, significantly affecting quality of life, mainly due to its complications. Among these, diabetic retinopathy (DR) is considered one of the most serious, estimated to be responsible for 4,8% of blind people around the world. Several studies suggest a genetic component as a major factor for the onset and progression of DR, and some genetic variants have been associated with the risk of occurrence of DR in different populations. Of the several candidates genes, VEGF (vascular endothelial factor) is one of the most studied since, due to promoting angiogenesis and neo-vascularization, plays a key role in the retinal microvascular complications of DR. Another important candidate gene is RAGE (receptor for advanced glycation end products), activated by AGEs (advanced glycation end

products) and, more recently, the paraoxonase genes, PON1 and PON2, and associated with glycemic control. However, the genetic mechanisms responsible for this susceptibility still remain unknown. The goal of this paper is to review the existing literature on this subject in order to try to clarify the contribution of these genes to the onset and progression of DR.

KEYWORDS

Diabetes mellitus type 2; Diabetic retinopathy; Genetic predisposition; VEGF; RAGE; PON.

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) é hoje considerada um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo¹. O número de pessoas afectadas com diabetes no mundo ocidental tem vindo a aumentar nos últimos anos, tendo sido de 135 milhões em 2005², 170 milhões em 2008 e 285 milhões em 2010³. De acordo com o estudo "The Global Prevalence of Diabetes", a Índia, a China e os Estados Unidos são os países com maior prevalência de DM⁴. Em Portugal estima-se que a prevalência total seja de 12,4% da população, sendo mais prevalente no sexo masculino (14,7%) e na faixa etária entre os 60 e os 79 anos, independentemente do género (27,1%)⁵. Com base nas alterações demográficas, prevê-se que em 2030 o total de pessoas afectadas seja de 366 milhões, sendo que os maiores aumentos relativos deverão ocorrer no Médio-Oriente, na África subsaariana, e na Índia⁶. Considera-se que 90% a 95% dos casos de DM seja de diabetes mellitus tipo 2 (DM2)^{2,7}.

A DM2 é uma das doenças que mais tem apresentado alterações epidemiológicas, verificando-se não só um aumento da incidência mas também uma diminuição da idade de diagnóstico⁸. É considerada uma doença crónica, multi-sistémica, que resulta de alterações no mecanismo de secreção e acção da insulina⁹, como consequência da resistência a essa hormona por parte dos tecidos periféricos e da sua secreção deficiente pelas células β do pâncreas². Os prin-

cipais factores de risco para a DM2 são a obesidade⁹ e o excesso de peso, agravados pelo estilo de vida sedentário, o consumo calórico excessivo, o abuso do álcool e o uso do tabaco¹⁰, todos factores de risco modificáveis e, portanto, passíveis de prevenção¹¹. No entanto, as diferenças observadas entre populações quanto ao grau de susceptibilidade para a DM2 levam a supor que factores genéticos tenham um papel importante na manifestação desta patologia. Estudos em gémeos monozigóticos mostram que a DM2 apresenta uma concordância entre 50-92%, maior do que a concordância de 37% encontrada em gémeos dizigóticos^{12,13}. No entanto, e apesar de serem vários os genes candidatos como eventuais responsáveis para o desenvolvimento da DM2, os genes definitivos não estão identificados^{14,15}.

A DM2 está associada a um conjunto de complicações macrovasculares e microvasculares, como enfarte agudo do miocárdio e doença arterial periférica, responsáveis pelo grande aumento de mortalidade e morbidade, e pela considerável diminuição da qualidade de vida destes pacientes^{2,16,17}.

Ao nível microvascular, as co-morbilidades como a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia diabéticas apresentam-se como as principais causas de cegueira, doença renal grave e amputação não traumática dos membros inferiores, respectivamente¹⁸. No que respeita à RD, estima-se que ocorra após cerca de 15 anos de diagnóstico da DM2¹⁹, sendo considerada a principal causa de cegueira no mundo ocidental, responsável por 4,8% dos indivíduos cegos em todo o mundo^{20,21}.

A duração da DM2, o controlo glicémico, a insulino-resistência e a hipertensão arterial têm sido apontados como os maiores factores de risco tanto para o aparecimento como para a progressão da RD^{20,22}.

A patogénese e os mecanismos exactos para o desenvolvimento da RD são complexos e ainda não totalmente conhecidos. Alguns dos factores que têm sido apontados como decisivos são a isquémia, as alterações na permeabilidade vascular e a libertação de factores de crescimento com consequente angiogénese e neovascularização, sendo que tanto a hiperglicémia como a insulino-resistência parecem desempenhar um papel importante nas complicações microvasculares. A hiperglicémia será responsável pela activação de várias vias bioquímicas a ela secundárias, que podem influenciar diversos factores vasoactivos provavelmente fundamentais no aparecimento de alterações funcionais e morfológicas na retina de pacientes com diabetes²³.

O objectivo deste artigo é rever os estudos que investigaram a associação entre os principais factores de risco e a sua contribuição para o aparecimento e desenvolvimento da RD, dando especial relevância aos de carácter genético.

MÉTODOS

Foi realizada uma procura sistemática da literatura, utilizando a base de dados electrónica PubMed. Os critérios de procura incluíram estudos publicados até Dezembro de 2010 e utilizaram as palavras-chave *Diabetes type 2, Diabetic retinopathy, Pathogenesis, Genetic predisposition, Polymorphism, Vascular Endothelial Growth Factor, Advanced Glycation End Products, Receptor of Advanced Glycation End Products, Paraoxonase, Treatment*. Foram seleccionados todos os artigos cujo acesso tenha sido na íntegra, excluindo abstracts e reports com dados inconclusivos. As publicações não

relacionadas foram descartadas dos resultados da procura.

FACTORES DE RISCO PARA A RETINOPATIA DIABÉTICA

O aumento da incidência e prevalência de quadros clínicos derivados de complicações microvasculares em indivíduos diabéticos é em grande parte influenciado pela hiperglicémia, característica desses pacientes, e vários são os estudos que apontam a hiperglicémia e os mecanismos a ela subsequentes como um dos principais ou mesmo o principal factor de risco para o aparecimento e desenvolvimento da RD^{2,23,24}. Também a duração da DM tem sido reportada como outro factor de risco *major* para o seu desencadeamento²⁵. No grupo de indivíduos com DM2, diagnosticados há menos de cinco anos, 24% apresentam RD, e esta incidência aumenta para 40% nos que não apresentam controlo glicémico. Ao fim de 20 anos de diagnóstico, estas incidências aumentam para 53% e 84%, respectivamente²⁶. Com o agravamento do quadro clínico, a perda visual afecta 5-10% desses indivíduos²⁷. Neste sentido, a incidência da RD vê o seu maior aumento com o aumento do tempo de diagnóstico. A RD proliferativa, que é a forma mais grave da doença, desenvolve-se em 2% dos doentes com o diagnóstico da doença até os cinco anos, sendo a sua prevalência de aproximadamente 25% após 25 anos²⁶.

Pode-se afirmar que o controlo glicémico é o principal factor de risco modificável para a RD^{24,25,28}. Segundo o estudo UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), que avaliou os factores de risco para a incidência e progressão da RD na DM2, existe uma forte associação entre a glicémia e as complicações vasculares. Os indivíduos com DM2 sujeitos a um controlo glicémico intensivo apresentaram uma diminuição significativa de 25% no risco de desenvolvimento de complicações microvasculares quando comparados com indivíduos sujeitos a tera-

pêuticas convencionais, a maioria devido a menos casos de fotocoagulação²⁹. Resultados semelhantes foram encontrados pelo grupo ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*), que verificou uma menor progressão da RD (7,3%) em indivíduos com controlo glicémico intensivo face a indivíduos com controlo glicémico convencional (10,4%)³⁰. Por outro lado, os dados destes dois estudos demonstraram a dificuldade em manter os níveis de glicémia adequados em indivíduos com DM2, principalmente por longos períodos. Por essa razão, a intervenção a nível de outros factores de risco, como a hipertensão, tem sido alvo de interesse, num esforço para diminuir a perda da visão devida à RD³¹. A hipótese de que o aumento da pressão sanguínea, através do seu efeito no aumento do fluxo sanguíneo, pode provocar lesões nas células endoteliais da retina em indivíduos diabéticos³¹ é sustentada por estudos clínicos em que se observou uma associação entre a hipertensão e a gravidade da RD^{32,33}. Sabe-se que indivíduos com DM2 possuem um risco 2,5 vezes superior de apresentar hipertensão do que indivíduos sem DM2, e que a hipertensão é mais prevalente nesses indivíduos do que naqueles que não apresentam a doença²⁸.

O grupo de estudo ACCORD³⁰ sublinha ainda a importância dos benefícios de um controlo glicémico adequado na redução da progressão da RD, bem como a aposta no tratamento rigoroso da dislipidémia, já que os níveis elevados de colesterol e triglicéridos parecem ter uma importância significativa como factores de risco adicionais para o desenvolvimento da RD e perda da visão³⁴.

Assim, e no que diz respeito aos factores de risco para a RD, existem fortes evidências de que a longa duração da DM, o deficiente controlo glicémico, a dislipidémia e a pressão arterial elevada são os mais relevantes factores de risco modificáveis responsáveis pelo aparecimento e progressão da RD²⁰.

PATOFISIOLOGIA DA RETINOPATIA DIABÉTICA

A RD resulta de alterações celulares e bioquímicas que à partida não são clinicamente evidentes³⁵. Inicia-se com o aparecimento de lesões microvasculares da retina, decorrentes de uma sucessão de acontecimentos que incluem microaneurismas, hemorragias, exsudados duros, manchas algodinosas e alterações microvasculares intraretinianas³⁶. A RD é uma doença que pode conduzir à cegueira por duas vias principais: angiogénese e neovascularização excessivas e desorganizadas, que conduzem a hemorragias intra-oculares e possível descolamento de retina com consequente grave perda visual, e lesão localizada na mácula com perda significativa da visão central^{24,37}. Historicamente a classificação da RD baseia-se em evidências oftalmoscópicas de gravidade crescente, que levam a uma classificação que abrange desde a ausência de retinopatia, a vários estadios de retinopatia não proliferativa, até retinopatia proliferativa avançada²⁵. Porém, esta classificação pode não reflectir a gravidade da doença em termos funcionais, uma vez que a presença de maculopatia diabética pode surgir em qualquer um dos estadios, com grave compromisso funcional da visão, mesmo em presença de poucos sinais oftalmoscópicos¹⁹. A RD é uma microangiopatia que afecta primariamente as arteríolas pré-capilares, os capilares e as vénulas pós-capilares da retina, sendo as alterações vasculares características quer de oclusão microvascular, quer de extravasamento vascular^{38,39}. A oclusão microvascular resulta de alterações capilares (perda de pericitos, espessamento da membrana basal, proliferação de células endoteliais) e de alterações hematológicas (formação de *rouleaux* de hemácias, aumento da adesividade e agregação plaquetárias). Esta oclusão microvascular conduz à não perfusão retiniana com consequente isquémia da mesma³⁷. Como resposta à isquémia retiniana, surgem anomalias

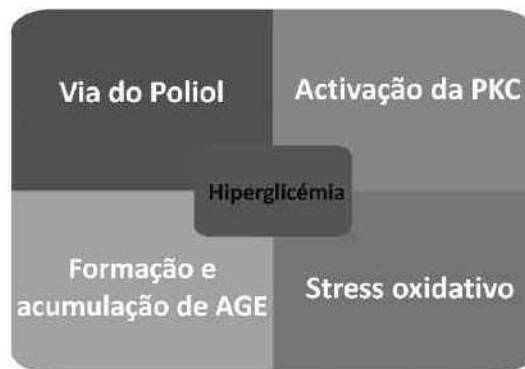
microvasculares intraretinianas (IRMA – *intraretinal microvascular abnormalities*) e neovascularização da retina e nervo óptico²⁶. Por sua vez, o extravasamento vascular deve-se a alterações da barreira hemato-retiniana interna, com extravasamento de componentes do plasma para a retina²⁴, sendo que o enfraquecimento localizado da parede vascular origina os microaneurismas visíveis na oftalmoscopia⁴⁰. As consequências deste extravasamento vascular serão o aparecimento de hemorragias retinianas e do edema retiniano que poderá ser localizado ou difuso⁴¹. De acordo com o aparecimento, localização e extensão de todas estas alterações, a RD será classificada em termos de gravidade³⁹.

Com a progressão da diabetes, a hiperglicémia provoca anomalias no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular, o que se vai reflectir na diminuição da actividade dos vasodilatadores tais como o óxido nítrico, aumento da actividade de vasoconstrictores como a angiotensina II e aumento de expressão e libertação de factores de permeabilidade vascular como o VEGF²². Este último é expresso pelas células endoteliais da retina, pelos pericitos e pelas células epiteliais da camada pigmentar em resposta à hipóxia, estimulando a angiogénese e a neovascularização e aumentando a permeabilidade capilar⁴⁰.

Várias alterações bioquímicas têm sido sugeridas para explicar como a hiperglicémia leva ao desenvolvimento da RD, embora nenhuma esteja cabalmente identificada como responsável: 1) a via do polioliol, 2) a activação da proteína cinase C (PKC), 3) a formação e acumulação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e 4) a sobrecarga oxidante resultante dos vários mecanismos têm sido implicadas no desenvolvimento da RD, pois representam vias cruciais para o desenvolvimento de anomalias na retina neural e nos capilares localizados no interior da retina^{2,28} – Figura 1. Estes mecanismos são na sua maioria dependentes do

excesso de glicose nas células da retina, resultando num aumento dos níveis de glicose intracelular²⁴.

FIGURA 1: As quatro possíveis vias pelas quais a hiperglicémia poderá conduzir ao aparecimento das comorbilidades na DM: o aumento do fluxo pela via do polioliol, a activação das isoformas da proteína cinase C (PKC), o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e a sobrecarga oxidativa.

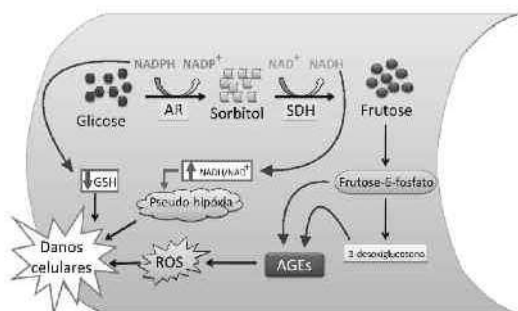


1. Via do polioliol

Embora os principais substratos da via do polioliol sejam os aldeídos, açúcares como a glicose e a galactose podem ser metabolizados pela aldose reductase⁴², o primeiro enzima desta via. A aldose reductase possui baixa afinidade para com a glicose nas concentrações normais encontradas em não-diabéticos, pelo que esta via contribui marginalmente para o metabolismo da glicose²². No entanto, na presença de elevados níveis de glicose intracelular, a metabolização desta pela via de polioliol torna-se importante⁴³. A aldose reductase reduz a glicose a sorbitol, usando o NADPH como co-factor, e o sorbitol formado é posteriormente metabolizado em frutose pelo sorbitol desidrogenase, utilizando NAD⁺ como co-factor⁴⁴. Os efeitos decorrentes desta sucessão de reacções são variados: o sorbitol é um álcool polihidroxilado e, conseqüentemente, uma molécula hidrofílica, que não se difunde facilmente através das membranas celulares, acumulando-se intracelularmente com possíveis conseqüências osmóticas⁴⁵; a frutose produzida pela via do polioliol pode ser fosforilada a frutose-3-fosfato, que origina 3-desoxiglucosona, ambos potenciais agentes

de glicação que contribuem para a formação de AGEs^{42,43}; o consumo de NADPH pela aldose reductase leva à diminuição da sua disponibilidade para o glutathione reductase², o que é crítico para a manutenção dos níveis intracelulares do glutathione (GSH), conduzindo, conseqüentemente, a uma diminuição da capacidade das células para responder à sobrecarga oxidante⁴⁵; por outro lado, a utilização do NAD⁺ pelo sorbitol desidrogenase leva ao aumento da razão NADH/NAD⁺, denominada de “pseudo-hipóxia”, e associada a uma multiplicidade de alterações metabólicas e de vias de sinalização que se sabe alteram as funções celulares⁴³. Desta forma, a activação da via do polioliol pode desencadear uma série de mecanismos que levam à lesão celular, contribuindo assim para o desenvolvimento da RD^{15,46} – Figura 2.

FIGURA 2: Resumo das reacções decorrentes da via do polioliol, que culminam em danos a nível celular e que podem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da RD. Abreviaturas: AR – aldose reductase; SDH – sorbitol desidrogenase; GSH – glutathione; AGEs – produtos finais de glicação avançada; ROS – espécies reactivas de oxigénio.



2. Activação da proteína cinase C

Uma das proteínas activadas pela glicose é a proteína cinase C (PKC)²², e a DM leva à activação nos vários tecidos alvo de isoformas específicas da PKC. Vários estudos indicam que a inibição da PKC previne várias anomalias vasculares em ratos diabéticos, e a expansão mesangial e disfunção glomerular em ratinhos db/db, sugerindo que as várias isoformas da PKC são importantes mediadoras de alterações bioquímicas e funcionais nos vasos de diabéticos⁴⁷. Sendo assim, a acti-

vação da PKC é outra das vias implicadas no desenvolvimento da RD, estando relacionada com o aumento da permeabilidade vascular, alteração do fluxo sanguíneo e estimulação da neovascularização⁴⁸.

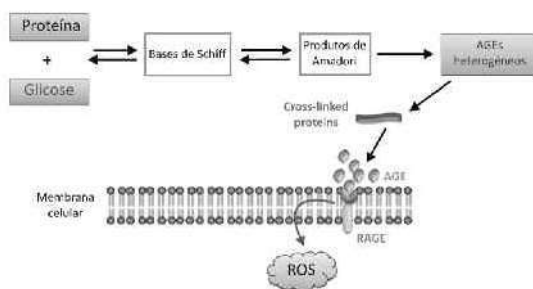
3. Formação e acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGE)

Os AGEs são moléculas complexas e heterogéneas, que danificam as células por pelo menos três mecanismos básicos: (1) as proteínas intracelulares modificadas pelos AGEs ficam funcionalmente alteradas; (2) os componentes da matriz extracelular modificados pelos AGEs interagem de forma anómala com outros componentes da matriz da célula e com integrinas; (3) as proteínas plasmáticas que sofrem alteração pelos AGEs activam o seu receptor (RAGE) nas células endoteliais, células mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reactivas de oxigénio²². O aumento dos AGEs é acompanhado pelo aumento do RAGE, e o sistema AGE-RAGE parece desempenhar um papel central no desenvolvimento e progressão de complicações micro e macrovasculares⁴⁹. A ocupação do RAGE pelos AGEs activa a sua cascata de sinalização e aumenta a sobrecarga oxidante e a resposta inflamatória em células da parede vascular, contribuindo assim para o desenvolvimento e progressão da RD^{50,51}.

A glicose, por vias não-enzimáticas, reage com aminoácidos e ácidos gordos para formar bases de Schiff e produtos de Amadori que, após uma complexa cascata de reacções, formam os produtos finais de glicação avançada (AGEs)^{2,52}. Fisiologicamente, a glicação avançada desempenha um importante papel na identificação de moléculas senescentes, que são clivadas e removidas⁵³. No entanto, nos distúrbios metabólicos, como é o caso da diabetes, há um aumento acentuado no número de factores que promovem a formação dos AGEs em vários órgãos e tecidos alvo, nomeadamente a retina^{53,54}. O impacto dos AGEs nas células da retina está

relacionado com o facto de a sua acumulação, ao longo do tempo, conduzir à formação de ligações cruzadas de várias proteínas e à geração de espécies reactivas de oxigénio²⁴, poderosos agentes oxidantes. A formação e acumulação dos AGEs tem ainda como alvo a membrana basal, limitando a capacidade de fixação dos pericitos e levando directamente à lesão tecidual⁵⁵ – Figura 3.

FIGURA 3: Formação dos AGEs na presença de hiperglicémia. O processo inicia-se com a conversão reversível das bases de Schiff, os re-arranjos dos produtos de Amadori e uma série de reacções complexas que culminam na formação de AGEs. A interacção entre o AGE e o RAGE conduz à geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), com o subsequente processo inflamatório, activação de macrófagos e plaquetas, e formação de trombos, que em conjunto desempenham um importante papel no desenvolvimento e progressão das complicações diabéticas.



De acordo com Adamis e Berman⁵⁶, alguns estudos têm sugerido que, para além destas vias metabólicas, alguns mecanismos imunológicos desempenham um papel importante na patogénese da RD, reflectindo-se, por exemplo, no edema. Estudos envolvendo tanto resultados pré-clínicos como clínicos suportam o conceito de que a RD é uma manifestação inflamatória de baixo grau, mas crónica, na qual um fluxo de efectores inflamatórios, citocinas e leucócitos, são responsáveis pela neovascularização induzida pela isquémia e pelas lesões da retina. No entanto, esta hipótese necessita de comprovação⁵⁷.

SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA PARA A RETINOPATIA DIABÉTICA

Embora o aumento recente da prevalência da DM seja em grande parte atribuído a factores de risco não-genéticos, os aspectos

ambientais certamente aceleram o aparecimento da doença na presença de predisposição genética¹² e, conseqüentemente, o mesmo também se verificará com a ocorrência das suas complicações, como a RD¹³.

Como já referido, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da RD aumenta com a duração da DM e que o controlo intensivo da glicémia pode atrasar o desenvolvimento da RD⁵⁸. No entanto, muitas vezes tal não se verifica. Existem casos em que indivíduos com bom controlo glicémico desenvolvem RD em idades precoces¹⁴, e, em contrapartida, aqueles que não desenvolvem complicações retinianas após uma longa duração da doença e na presença de hiperglicémia não controlada⁵⁹. Por outro lado, e de acordo com estudos realizados em indivíduos diabéticos, verifica-se uma substancial variabilidade nas diferentes fases da RD, que não é totalmente explicada pelos dois factores de risco referidos^{60,61}.

O facto de a prevalência da RD diferir conforme a etnia é apontado como outro argumento a favor da existência de uma susceptibilidade genética. O estudo Multi-Etnico de Aterosclerose (MESA) encontrou diferenças moderadas na prevalência da RD consoante a etnia: 37,4% em hispânicos, 36,7% em afro-americanos, 25,7% em sino-americanos e 24,8% em caucasianos⁶². Tem também sido sugerido que, independentemente do controlo glicémico e de factores de risco ambientais, indivíduos hispânicos com DM desenvolvem RD mais precocemente e a sua progressão é mais rápida, quando comparados com afro-americanos ou americanos-caucasianos⁶³.

De acordo com Arar et al.⁶³, e num estudo em que foi avaliada a hereditariedade da RD em descendentes americanos não nativos, demonstrou-se uma relação familiar significativa em membros de múltiplas famílias com DM e a gravidade da RD. Por outro lado, Hietala et al.²⁷, ao avaliar a hereditariedade da RD proliferativa em diabéticos tipo 1 finlandeses, estimaram o risco

familiar da RD em 168 dos 188 irmãos avaliados, mais uma vez sugerindo uma contribuição genética para o aparecimento e desenvolvimento da RD.

Em suma, sendo a patogénese da RD multifactorial, há fortes indícios que suportam a existência de factores de risco genéticos que podem desempenhar um papel importante nesta patologia²⁰.

GENES CANDIDATOS PARA A RETINOPATIA DIABÉTICA

Embora inúmeros genes e respectivos polimorfismos tenham sido implicados na patogénese da RD, poucos estudos têm identificado uma forte associação entre um só gene e a frequência ou gravidade desta. Dos vários genes candidatos a estar envolvidos na RD^{15,60}, este artigo centrar-se-á em quatro que têm sido alvo de particular interesse e que parecem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da RD – VEGF, RAGE, PON1 e PON2.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica com 45 KDa, cujo gene possui oito exões, e que tem sido apontado como um importante mediador associado à isquémia intra-ocular e neovascularização retiniana⁶⁴. As suas 4 isoformas, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E pertencem à família dos factores de crescimento angiogénicos, sendo os outros 2 membros conhecidos desta família o factor de crescimento placentário e o PDGF⁶⁵. Todos os genes da família do VEGF sofrem *splicing* alternativo, originando várias isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)⁶⁶, que diferem no tamanho da cadeia de aminoácidos, na actividade mitogénica, na afinidade de ligação aos receptores do VEGF e na afinidade de ligação à heparina³³. Dentre estas, a forma VEGF₁₆₅ é a mais abundante e corresponde a um polipéptido de 23kDa, constituindo um monómero do VEGF-A homodimérico humano, normalmente referido por VEGF⁶⁶.

O VEGF, inicialmente conhecido como factor de permeabilidade vascular, foi subsequentemente reconhecido como um factor angiogénico e como um mitogénio específico para células endoteliais vasculares⁶⁷. A actividade mitogénica do VEGF está demonstrada em células endoteliais linfáticas e vasculares, mas não em níveis significativos em outros tipos de células³⁵. Possui também características vasodilatadoras, promove a migração das células endoteliais e é um anti-apoptótico⁶⁰. Vários mecanismos têm sido implicados na regulação da expressão do VEGF, sendo a hipóxia um dos mais importantes^{28,68}. Em culturas de células retinianas, como células de Muller e outras células da glia, a expressão do VEGF é substancialmente aumentada pela hipóxia e por mediadores inflamatórios, devido à sobrecarga oxidante³⁵. De acordo com Aiello et al.⁴⁸, a expressão do VEGF nas células da retina está aumentada de 3 a 30 vezes devido à hipóxia, que promove a expressão de um conjunto de factores de crescimento que aumentam a expressão do gene do VEGF, conduzindo à neo-vascularização⁶⁹. A activação transcricional que regula o aumento do VEGF em resposta à hipóxia é mediada principalmente pelo factor induzido pela hipóxia-1 (HIF-1). O HIF-1 é uma proteína heterodimérica, que consiste em duas subunidades, o HIF-1 α e o HIF-1 β , e pensa-se que é um dos grandes responsáveis pela sobre-expressão do VEGF na isquémia da retina²⁸. Adicionalmente, a produção aumentada desta citocina pode resultar dos AGEs decorrentes da hiperglicémia⁷⁰, que induzem a expressão do VEGF através da sobrecarga oxidante e activação da PKC nas células endoteliais da coroideia⁶⁸.

O VEGF desempenha um papel central como mediador microvascular, estimulando a proliferação de vasos dos pericitos e no endotélio dos vasos retinianos, levando à apoptose celular⁶⁸, e induzindo alterações precoces na RD, tais como leucostasia, ruptura da barreira hemato-retiniana e edema

macular⁷¹. Na retina são várias as células que produzem VEGF, incluindo células do epitélio pigmentar, endoteliais, células de Mueller e outras células da glia⁷², verificando-se no entanto que em olhos de indivíduos saudáveis o VEGF está presente em níveis muito baixos nessas células, enquanto que em olhos de indivíduos diabéticos o VEGF está em maiores concentrações, sendo estas ainda maiores nos casos de RD proliferativa⁶⁸. Um número considerável de ensaios clínicos tem mostrado uma forte correlação entre o aumento da concentração intravascular do VEGF e o desenvolvimento da RD proliferativa^{71,73-75}. Dado o VEGF parecer desempenhar um papel importante na fisiopatologia da RD, é considerado um candidato plausível para esta patologia⁷⁵.

Várias variantes polimórficas do gene do VEGF têm sido investigadas como factores de susceptibilidade para a RD em várias populações, tendo-se vindo a verificar que, dependendo da população, esses podem ou não estar relacionados com a ocorrência e progressão da RD. Dois polimorfismos na região 5'-UTR no gene do VEGF parecem aumentar a sua actividade promotora basal, uma transversão G – C na posição 634 (634G/C) e uma transição C – T na posição 460 (460C/T)⁶⁸. O alelo C do polimorfismo 634G/C foi descrito como estando associado à ocorrência de RD em populações japonesas⁷⁶, indianas⁶⁴ e polacas⁶⁸. No entanto, um estudo realizado numa população de diabéticos com descendência europeia não observou associação do polimorfismo 634G/C com a ocorrência da RD, mas verificou uma maior frequência do genótipo CC em pacientes com RD proliferativa (RDP), sugerindo que a presença do alelo 634C seja um factor de risco independente para a RDP em DM2⁷⁷. O alelo C do polimorfismo 460C/T parece estar associado à ocorrência, progressão e proliferação da RD em populações caucasianas⁷⁰. No entanto, e dada a escassez de informação e ausência de relação causal, permanece fundamental

a continuação do estudo da influência destes e outros polimorfismos do VEGF na RD.

Receptor for advanced glycation end products (RAGE)

O RAGE pertence à super-família das imunoglobulinas de superfície celular, é composto por 332 aminoácidos e compreende três domínios extracelulares, um do tipo V e dois do tipo C⁵⁰ e um citoplasmático com 43 aminoácidos, fortemente carregado^{78,79}, essencial para a sinalização do RAGE⁸⁰. A estrutura determinante no receptor que medeia a ligação aos AGEs está contida no terminal N do domínio V⁷⁹. O RAGE é um receptor multifuncional, com vários ligandos para além do AGE, incluindo péptidos β -amilóides, amilóide A, s100 calgranulinas e anfoterina⁵³. Análises estruturais da interacção entre o RAGE e os seus ligandos mostram que o receptor reconhece estruturas tridimensionais, tais como folhas β e fibrilhas, e não seqüências específicas de aminoácidos⁷⁸.

Em condições fisiológicas normais o RAGE é expresso em níveis baixos pelas células endoteliais, monócitos, células musculares lisas e células epiteliais glomerulares⁴⁹. No entanto, foram identificados, tanto em modelos animais como em seres humanos diabéticos, níveis elevados de RAGE na retina, células mesangiais glomerulares e em vasos da aorta, concomitantemente com a acumulação de AGEs⁵⁴. Na DM a estimulação permanente do RAGE pelos elevados níveis circulantes de AGEs, aumenta a expressão do receptor e a activação das vias pró-inflamatória e pró-coagulante, levando à disfunção vascular^{54,81}.

O gene do RAGE localiza-se em 6p21.3 no locus MHC Classe III, é composto por 11 exões^{49,54}, e é considerado o maior complexo de histocompatibilidade de entre os genes da classe II e III⁷⁹. A sua transcrição, que pode ser constitutiva ou indutível⁵³, é controlada por uma série de factores, incluindo SP-1, AP-2, NF- κ B e NF-IL6 e depende do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento, sendo

constitutiva na fase de desenvolvimento embrionário e regulada na idade adulta⁷⁸.

Estão actualmente identificados aproximadamente 30 polimorfismos no gene do RAGE⁸², e tem sido proposto que alguns desses polimorfismos podem alterar as reacções que decorrem da ligação do RAGE com os AGEs, e assim influenciar o desenvolvimento de complicações diabéticas microvasculares⁸³, e conseqüentemente a RD.

Dos vários polimorfismos do RAGE com possíveis associações ao desenvolvimento da RD, os mais relevantes parecem ser o -374T/A e -429T/C. O alelo A do polimorfismo -374T/A pode ser um factor protector para complicações vasculares na DM2, especialmente em caucasianos⁴⁹, e o mesmo polimorfismo também foi associado à RD não proliferativa em populações indianas, com maior frequência do alelo T⁸⁴. Para além deste, os polimorfismos Gly82Ser e -429T/C podem aumentar o risco de ocorrência de RD em populações indianas⁸⁵ e caucasianas⁵⁴, respectivamente. Em populações caucasianas, o alelo C do polimorfismo -429T/C apresenta uma frequência aumentada em pacientes com RD⁵⁴. Contudo, um estudo realizado em indivíduos chineses, avaliando os polimorfismos -374T/A e -429T/C, não observou nenhuma associação com a RD⁸⁶.

Apesar de existirem vários estudos, em várias populações diferentes, de etnias diferentes, que apontam para polimorfismos no gene do RAGE como possivelmente envolvidos no desenvolvimento e/ou na progressão da RD, existe claramente ainda muita controvérsia, tornando-se necessário a realização de mais estudos que possam clarificar e identificar os génotipos de risco.

Genes da Paraoxonase sérica humana (PON1 e PON2)

A família multi-génica da PON é composta por três genes adjacentes: PON1, PON2 e PON3, localizados em 7q21.3-q22.1⁸⁷. Estes três genes possuem aproximadamente 60% a 70% de homologia na sequência de aminoá-

cidos e de nucleótidos, respectivamente⁸⁸. A PON1 e a PON3 são expressas principalmente no fígado e secretadas para a circulação sistémica em associação com as HDLs, enquanto a PON2 é expressa de forma ubíqua⁸⁷.

A proteína PON1 é composta por 355 aminoácidos e tem uma massa molecular de 43-45kDa⁸⁹. A PON1 foi inicialmente identificada pela sua capacidade de hidrolisar compostos organofosforados e ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos⁹⁰. Entretanto, o potencial interesse pela PON1 surgiu pelo efeito protector que exerce sobre as LDL e as HDL⁹¹. A associação da PON1 com as HDL permite a degradação de fosfolípidos oxidados das lipoproteínas e desempenha um papel importante no sistema antioxidante do organismo⁹². Porém, alterações de forma e tamanho das HDL podem influenciar fortemente a afinidade de ligação e estabilização com a PON1 e resultar na redução da capacidade antioxidante⁸⁸. A PON1 pode ainda desempenhar um importante papel na aterosclerose, evitando a deposição de lipoperóxidos e possíveis lesões na parede das artérias^{88,93}.

A PON2 é uma proteína com 39 kDa, associada à membrana celular, e amplamente expressa em células vasculares e em vários tecidos, incluindo o coração, rins, fígado, pulmão, placenta, intestino delgado, baço e estômago⁹⁴. A PON2 possui propriedades anti-inflamatórias e a mesma função antioxidante que a PON1, participando no metabolismo de lípidos e lipoproteínas^{93,95}. De acordo com Gupta et al.⁹⁶, as células que expressam PON2 em grandes quantidades oxidam as LDL em menor quantidade e apresentam uma sobrecarga oxidante consideravelmente menor, quando expostas a H₂O₂ ou fosfolípidos oxidados.

Da família da PON, a PON3 é a menos estudada, sendo escassa a informação disponível. Esta proteína é composta por 354 aminoácidos e tem uma massa molecular de 39,6 kDa⁹⁷. É considerada uma glicoproteína com propriedades multi-enzimáticas e actividade antioxidante, podendo também

participar na oxidação das LDLs⁹⁷.

Existem dois polimorfismos identificados na região codificante da PON1, M55L e Q192R, e dois também identificados na região codificante da PON2, G148A e C310S⁸⁸. Kao et al⁹⁸ investigaram os polimorfismos M55L e Q192R do gene da PON1 e a sua importância na RD, tendo encontrado uma forte associação entre o primeiro polimorfismo e o desenvolvimento da RD, concluindo que a Leucina 55 é um factor de risco para a ocorrência da patologia. Mackness et al. mostraram que o polimorfismo C310S da PON2 pode influenciar ambos os polimorfismos da PON1 e que a interacção entre ambos pode contribuir para o controlo glicémico em indivíduos com DM2 agravada pela RD⁹³.

Apesar dos escassos estudos sobre o papel das PONs e dos seus polimorfismos com o desenvolvimento e a progressão da RD, a associação das PONs com a ocorrência de doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares e DM2, tem sido largamente documentada^{90,99-110}.

TERAPÊUTICA

Actualmente existem várias opções terapêuticas para a RD: a fotocoagulação laser é classicamente o tratamento de primeira linha na RD não proliferativa grave, proliferativa e no EMD clinicamente significativo^{35,39}, tendo sido demonstrado no ETDRS que a fotocoagulação reduz o risco de perda de visão moderada, em particular em doentes com EMD. Os corticoesteróides, incluindo triancinolona intra-vítrea (IVT) ou implantes intra-vítreos de libertação lenta, têm crescido em popularidade para o tratamento da EMD, devido aos seus efeitos e propriedades angiostáticas e antipermeabilidade¹¹¹. Apesar de a fotocoagulação laser continuar a ser a primeira indicação terapêutica no EMD, novas opções estão a ser consideradas. Muitos estudos prospectivos de medicamen-

tos anti-VEGF no tratamento da RD foram recentemente publicados, e alguns estão ainda em curso. Três agentes farmacológicos anti-VEGF estão disponíveis comercialmente: Pegaptanib, Ranibizumab e Bevacizumab. No entanto, a segurança e a eficácia destes agentes para o tratamento da RD ainda não foi estabelecida, e como tal aguardam-se os resultados dos ensaios clínicos controlados⁶⁵.

CONCLUSÕES

A RD é uma das mais graves complicações microvasculares da DM, sendo a principal responsável por novos casos de cegueira entre os indivíduos adultos activos. Ao longo dos últimos anos tem-se vindo a verificar um acentuado aumento na sua incidência e prevalência, acompanhando o aumento da ocorrência da DM2. A prevenção ou o atraso do desenvolvimento da RD assenta essencialmente no intenso controlo glicémico, da pressão arterial e dos níveis de triglicéridos. No entanto, estes factores parecem não ser suficientes, pois uma grande parte dos indivíduos, após alguns anos de diagnóstico de DM2, apresenta a visão comprometida pela RD. Neste contexto, é lícito colocar a hipótese de que o aparecimento da doença é modificado por factores ambientais interagindo com uma susceptibilidade genética, ditando assim se a doença se irá desenvolver precoce ou tardiamente, e possivelmente influenciando a sua progressão e o seu prognóstico. Inúmeras linhas de investigação apontam para uma influência genética na susceptibilidade para a RD. Embora alguns polimorfismos estejam já identificados como possivelmente associados à RD, a falta de relação causal entre estes e a fisiopatologia da doença torna clara a necessidade de compreender como a genética influencia a patogénese da RD, não só para esclarecer os mecanismos envolvidos, como também para abrir caminho para a identificação de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

1. Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the 'metabolic memory', the new challenge of diabetes. *Diabet Med* 2007; 24(6):582-586.
2. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9(4):315-327.
3. Turnbull F, Neal B, Algert C et al. Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Arch Intern Med* 2005; 165(12):1410-1419.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-1053.
5. Observatório Nacional da Diabetes. Diabetes: Factos e Números 2011. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. 2012.
6. Freeman JS. The increasing epidemiology of diabetes and review of current treatment algorithms. *J Am Osteopath Assoc* 2010; 110(7 Suppl 7):eS2-eS6.
7. Meigs JB. Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. *Am J Manag Care* 2002; 8(11 Suppl):S283-S292.
8. Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of Reactive Oxygen Species by Lovastatin Downregulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Ameliorates Blood-Retinal Barrier Breakdown in db/db Mice: Role of NADPH Oxidase 4. *Diabetes* 2010; 59(6):1528-1538.
9. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2010; 10(4):306-315.
10. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001; 345(11):790-797.
11. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344(18):1343-1350.
12. Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1431-1439.
13. Hanis CL, Hallman D. Genetics of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2006; 6(2):155-161.
14. Uthra S, Raman R, Mukesh B, Kumari R, Sharma T, Kumaramanickavel G. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Int J Hum Genet* 2008; 8(1-2):155-159.
15. Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin* 2009; 49(2):35-52.
16. Giugliano D, Standl E, Vilsboll T et al. Is the current therapeutic armamentarium in diabetes enough to control the epidemic and its consequences? What are the current shortcomings? *Acta Diabetol* 2009; 46(3):173-181.
17. Heng BH, Sun Y, Cheah JT, Jong M. The Singapore National Healthcare Group Diabetes Registry--descriptive epidemiology of type 2 diabetes mellitus. *Ann Acad Med Singapore* 2010; 39(5):348-352.
18. Greenstein A, Tavakoli M, Mojaddidi M, Al Sunni A, Matfin G, Malik RA. Microvascular complications: evaluation and monitoring relevance to clinical practice, clinical trials, and drug development. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 2007; 7(4):166-171.
19. Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia* 2001; 44(7):791-804.
20. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes* 2009; 58(9):2137-2147.
21. Yang H, Huang Y, Chen X et al. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF-beta(2), elucidated by treatment with CTGFsiRNA. *Acta Ophthalmol* 2010; 88(6):652-659.
22. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414(6865):813-820.
23. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(1):21-26.
24. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)* 2002; 16(3):242-260.
25. Fong DS, Aiello L, Gardner TW et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl 1:S99-S102.

26. Nogueira V, Mouro P, Vila-Franca M et al. Retinopatia diabética – o papel da Medicina Geral e Familiar. *Rev Port Clin Geral* 2007; 23:595-603.
27. Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop PH. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes* 2008; 57(8):2176-2180.
28. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2(1):71-98.
29. 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(9131):837-853.
30. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2010; 363(3):233-244.
31. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102(4):520-526.
32. 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(2):156-163.
33. Zorena K, Mysliwska J, Mysliwiec M et al. Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2010; 24(11):755-762.
34. Gupta A, Gupta V, Thapar S, Bhansali A. Lipid-lowering drug atorvastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2004; 137(4):675-682.
35. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19(6):442-455.
36. Ng DP. Human genetics of diabetic retinopathy: current perspectives. *J Ophthalmol* 2010; 2010. pii: 172593. Epub 2010 Jul 13.
37. Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye (Lond)* 2004; 18(10):963-983.
38. Gerhardinger C, Dagher Z, Sebastiani P, Park YS, Lorenzi M. The transforming growth factor-beta pathway is a common target of drugs that prevent experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 2009; 58(7):1659-1667.
39. Weisbrod D, Schwartz C. A review of diabetic retinopathy. *Ophthalmology Rounds* 2009; 7(4).
40. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376(9735):124-136.
41. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 2006; 55(9):2401-2411.
42. Gleissner CA, Sanders JM, Nadler J, Ley K. Upregulation of aldose reductase during foam cell formation as possible link among diabetes, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(6):1137-1143.
43. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res* 2007; 2007:61038.
44. Reddy GB, Satyanarayana A, Balakrishna N et al. Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008; 14:593-601.
45. Ohmura C, Watada H, Azuma K et al. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes. *Endocr J* 2009; 56(1):149-156.
46. D'Souza DR, Salib MM, Bennett J et al. Hyperglycemia regulates RUNX2 activation and cellular wound healing through the aldose reductase polyol pathway. *J Biol Chem* 2009; 284(27):17947-17955.
47. Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A, Srivastava SK. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 2005; 54(3):818-829.
48. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113(12):1538-1544.
49. Lu W, Feng B. The -374A allele of the RAGE gene as a potential protective factor for vascular complications in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220(4):291-297.

50. Al Mesallamy HO, Hammad LN, El Mamoun TA, Khalil BM. Role of advanced glycation end product receptors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 2011; 25(3):168-174.
51. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of TAGE-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol* 2010; 2010:170393. Epub 2010 Jun 22.
52. Tuttle KR, Johnson EC, Cooney SK et al. Amino acids injure mesangial cells by advanced glycation end products, oxidative stress, and protein kinase C. *Kidney Int* 2005; 67(3):953-968.
53. Sourris KC, Forbes JM. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 2009; 10(1):42-50.
54. 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(6):1505-1511.
55. Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol* 2003; 75(1):95-108.
56. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* 2008; 30(2):65-84.
57. Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 2002; 86(4):363-365.
58. Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(5):75-83.
59. Esteves J, da Rosa CM, Kramer CK, Osowski LE, Milano S, Canani LH. Absence of diabetic retinopathy in a patient who has had diabetes mellitus for 69 years, and inadequate glycemic control: case presentation. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1(1):13.
60. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2003; 17(3):305-311.
61. Kangas-Kontio T, Vavuli S, Kakko SJ et al. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(10):1401-1406.
62. Wong TY, Klein R, Islam FM et al. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *Am J Ophthalmol* 2006; 141(3):446-455.
63. Arar NH, Freedman BI, Adler SG et al. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(9):3839-3845.
64. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2006; 12:336-341.
65. Nicholson BP, Schachat AP. A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248(7):915-930.
66. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol* 2009; 87(3):234-238.
67. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4):581-611.
68. Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(1):39-43.
69. Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, Adamis AP. Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2004; 165(2):457-469.
70. 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(3):861-864.
71. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M et al. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008; 14:1382-1387.
72. Al Kateb H, Mirea L, Xie X et al. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes* 2007; 56(8):2161-2168.
73. Kim HW, Ko GJ, Kang YS et al. Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascu-

- lar complications in type 2 diabetic patients. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14(7):681-688.
74. Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S, Pascale A. The PKCbeta/HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(8):1230-1237.
75. Zhao T, Zhao J. Association between the -634C/G polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 90(1):45-53.
76. Awata T, Kurihara S, Takata N 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(3):679-685.
77. Errera FI, Canani LH, Silva ME, Yeh E, Takahashi W, Santos KG et al. Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care* 2007; 30(2):275-279.
78. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)* 2005; 83(11):876-886.
79. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84(5):489-497.
80. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci* 2005; 97(3):305-311.
81. Lindholm E, Bakhtadze E, Cilio C, Agardh E, Groop L, Agardh CD. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. *PLoS One* 2008; 3(6):e2546.
82. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(8):621-637.
83. Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y et al. Relation between polymorphisms G1704T and G82S of rage gene and diabetic retinopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Intern Med* 2005; 44(5):417-421.
84. Ramprasad S, Radha V, Mathias RA, Majumder PP, Rao MR, Rema M. Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. *Eye (Lond)* 2007; 21(3):395-401.
85. Kumaramanickavel G, Ramprasad VL, Sripriya S, Upadhyay 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(6):391-394.
86. 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(9):2696-2697.
87. Ticozzi N, LeClerc AL, Keagle PJ et al. Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68(1):102-107.
88. Shin BS. Paraoxonase gene polymorphism in south-western Korean population. *J Korean Med Sci* 2009; 24(4):561-566.
89. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T et al. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998; 213(1-2):149-157.
90. Ginsberg G, Neafsey P, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): Population distribution of PON1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12(5-6):473-507.
91. Wang NN, Yuan L, Dai H, Han ZK, Zhao M. Effect of PON1 on dichlorvos toxicokinetics. *Emerg Med J* 2011; 28(4):313-315.
92. Marsillach J, Aragones G, Mackness B et al. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids Health Dis* 2010; 9:46.
93. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98(3):355-363.
94. Devarajan A, Bourquard N, Hama S et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(3):341-351.

95. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V et al. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006; 281(40):29491-29500.
96. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res* 2009; 130(4):361-368.
97. Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif* 2006; 46(1):92-99.
98. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(7):2589-2592.
99. Hashemi M, Kordi-Tamandani DM, Sharifi N et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in metabolic syndrome in Zahedan, southeast Iran. *Eur J Endocrinol* 2011; 164(2):219-222.
100. Lakshmy R, Ahmad D, Abraham RA et al. Paraoxonase gene Q192R & L55M polymorphisms in Indians with acute myocardial infarction & association with oxidized low density lipoprotein. *Indian J Med Res* 2010; 131:522-529.
101. Birjmohun RS, Vergeer M, Stroes ES et al. Both paraoxonase-1 genotype and activity do not predict the risk of future coronary artery disease; the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *PLoS One* 2009; 4(8):e6809.
102. Mukamal KJ, Pai JK, Jensen MK, Rimm EB. Paraoxonase 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction in women and men. *Circ J* 2009; 73(7):1302-1307.
103. Mendonca MI, Dos Reis RP, Freitas AI et al. Interaction of paraoxonase-192 polymorphism with low HDL-cholesterol in coronary artery disease risk. *Rev Port Cardiol* 2010; 29(4):571-580.
104. Mendonca MI, Dos Reis RP, Freitas AI et al. Human paraoxonase gene polymorphisms and coronary artery disease risk. *Rev Port Cardiol* 2008; 27(12):1539-1555.
105. Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z et al. Paraoxonase Arg 192 allele is an independent risk factor for three-vessel stenosis of coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 2011; Apr 5:[Epub ahead of print].
106. Abdin AA, Hassanien MA, Ibrahim EA, El Noeman S. Modulating effect of atorvastatin on paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic Egyptian patients with or without nephropathy. *J Diabetes Complications* 2010; 24(5):325-333.
107. Marchegiani F, Spazzafumo L, Provinciali M et al. Paraoxonase2 C311S polymorphism and low levels of HDL contribute to a higher mortality risk after acute myocardial infarction in elderly patients. *Mol Genet Metab* 2009; 98(3):314-318.
108. Ichikawa K, Konta T, Emi M et al. Genetic polymorphisms of paraoxonase-1 are associated with chronic kidney disease in Japanese women. *Kidney Int* 2009; 76(2):183-189.
109. Jalilian A, Javadi E, Akrami M et al. Association of cys 311 ser polymorphism of paraoxonase-2 gene with the risk of coronary artery disease. *Arch Iran Med* 2008; 11(5):544-549.
110. Irace C, Cortese C, Fiaschi E et al. The influence of PON1 192 polymorphism on endothelial function in diabetic subjects with or without hypertension. *Hypertens Res* 2008; 31(3):507-513.
111. Karim R, Tang B. Use of antivasular endothelial growth factor for diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:493-517.