

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA HEMOSTASIA COMO FATOR DE
RISCO PARA AS COMPLICAÇÕES MICRO E MACROVASCULARES
DO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Alexandre Rieger

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Lavínia Schüler-Faccini

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Canani

Porto Alegre, dezembro de 2009.

Este estudo foi realizado nos seguintes locais:

Laboratório de Biotecnologia e Genética da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC;

Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS;

Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA.

As seguintes fontes financiaram parcialmente o estudo:

Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), HCPA

Agradecimentos

São muitos os agradecimentos ao final de uma etapa de trabalho e por isso, certamente, não farei justiça a todas as pessoas que participaram de alguma forma desta jornada. Porém, alguns agradecimentos devem ser considerados muito especiais. Existem aquelas pessoas que marcam a nossa vida. Agradecê-las por isso é muito pouco, principalmente quando isso não pode ser mais feito pessoalmente. Por isso, quero fazer um agradecimento realmente muito especial a duas pessoas que participaram da minha vida e formação, e sem dúvida, contribuíram de modos diferentes para a realização deste trabalho.

Ao meu pai, Nelson Francisco Rieger, *in memoriam*, que com todas as suas limitações de saúde, sempre soube com muito amor e sacrifício privilegiar e incentivar a educação dos seus filhos no sentido mais amplo da palavra, e também;

Ao meu grande orientador, Israel Roisenberg, que embora não esteja podendo nos ouvir neste momento, me deixou grandes ensinamentos de vida. Ensinamentos estes que procuro passar a todas as pessoas com quem convivo, pois são muito mais que simples ciência. Felizmente, para mim, tive oportunidade de lhe dizer isso. Infelizmente, para nós, não podemos mais ouvi-lo.

Os demais agradecimentos são aqueles que podem ser registrados no papel, mas devem também ser demonstrados por gestos e manifestações pessoais. Assim, também quero agradecer:

A minha família, esposa Lisa e filhos Nicole e Bernardo, pela compreensão das horas não dedicadas a vocês;

A Professora Lavínia Schüller-Faccini com seu incrível bom humor e astral pela sua disposição e valiosa orientação;

Ao Doutor Luís Canani pela sua disposição na co-orientação deste trabalho, ensinamentos sobre diabetes e análise sempre direta e crítica das informações.

A minha amiga Eliane Bandinelli, sempre disposta em esclarecer as minhas dúvidas e, principalmente, ouvir as minhas queixas.

As minhas antigas alunas e colegas do laboratório de biotecnologia e genética da UNISC, Carol, Andressa e Laiza pela disposição em sempre cooperar.

A minha antiga aluna, Clara Forrer Charlier, agora colega de UNISC e sempre amiga, pela participação neste trabalho, sugestões e paciência em me ouvir.

Ao meu colega e amigo Daniel Prá por seu apoio e disposição em sempre contribuir nas discussões.

A Kátia e a Daisy pela paciência e ensinamentos neste tema.

As colegas do laboratório de hemostasia Ana, Daiane, Mari e principalmente, a Roberta pela disposição e apoio ao trabalho.

Ao Elmo, uma pessoa incrivelmente disposta sempre a resolver todas as aflições dos alunos da pós, e é claro, a Helen sua companheira de trabalho.

Aos meus colegas de UNISC que sempre me incentivaram a começar e principalmente, terminar este trabalho.

Aos meus antigos professores da Genética que muito contribuíram para a minha formação, e que a cada reencontro no departamento me incentivavam a terminar.

Aos meus alunos da UNISC, porque neles está a razão para buscar mais conhecimento.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	6
Resumo.....	8
Abstract.....	10
Capítulo 1: Introdução.....	12
1.1 Diabetes mellitus.....	13
1.2 Complicações micro e macrovasculares.....	18
1.3 Diabetes e o estado protrombótico	21
1.4 Polimorfismos da hemostasia.....	22
1.4.1 Fibrinogênio e o polimorfismo <i>FGB</i> rs1800790.....	25
1.4.2 A protrombina e o polimorfismo <i>F2</i> rs1799963.....	27
1.4.3 Fator V e o polimorfismo rs6025.....	27
1.4.4 Fator VII e o polimorfismo rs5742910.....	29
1.4.5 Fator XIII e o polimorfismo <i>F13A1</i> rs5985.....	30
1.4.6 PLAT (tPA) e o polimorfismo rs4646972.....	31
1.4.7 PAI-1 e o polimorfismo rs1799768.....	32
1.4.8 Integrina beta 3 e o polimorfismo <i>ITGB3</i> rs5918.....	33
1.4.9 Hiperhomocisteínemia e o polimorfismo da <i>MTHFR</i> rs1801133.....	34
Capítulo 2: Objetivos.....	36
Capítulo 3: Hemostatic gene polymorphisms and macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus.....	38
Capítulo 4: Hemostatic gene polymorphisms and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus.....	65
Capítulo 5: Discussão geral.....	96
Referências bibliográficas.....	103
Anexos.....	115

Lista de Abreviaturas

3'UTR:	3' Untranslate Region; Região 3' não traduzida
ACCORD:	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ADA:	American diabetes association
ADVANCE:	Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation
AHA:	American heart association
AR:	Adjusted Residue
AVC:	Acidente vascular cerebral
AVCI:	Acidente vascular cerebral isquêmico
CI:	Cardiopatia isquêmica
CVD:	Cardiovascular disease
DAP:	Doença arterial periférica
DCV:	Doença cardiovascular
DM:	Diabetes mellitus
DM1:	Diabetes mellitus tipo 1
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2
DMG:	Diabetes mellitus gestacional
DN:	Diabetic Nephropathy
DSN:	Distal Sensory Neuropathy
DR:	Diabetic Retinopathy
IHD:	Ischemic Heart Disease
IS:	Ischemic Stroke
MTHFR:	Metilenotetrahidrofolato redutase
ND:	Nefropatia diabética
NP:	Neuropatia periférica
NSD:	Neuropatia sensório distal
PAD:	Peripheral Arterial Disease
PAI-1:	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio
PLAT ou tPA:	Ativador tecidual do plasminogênio

PN:	Peripheral Neuropathy
PR:	Prevalence Ratio
RD:	Retinopatía diabética
T2DM:	Type 2 diabetes mellitus
UKPDS:	United kingdom prospective diabetes study
VADT:	Veterans affairs diabetes trial

Resumo

Introdução: O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa cerca de 90% dos tipos de diabetes e vem atingindo de forma cada vez mais intensa a população adulta e atualmente também jovens e até crianças. Uma dieta hipercalórica, aliada ao sedentarismo tem sido junto com a predisposição genética os principais desencadeantes das complicações crônicas associadas com o DM2. Infelizmente, são essas complicações que levam ao grande aumento da morbidade e mortalidade que pode chegar até 80% nesta doença, sendo que as principais são as de natureza micro e macrovascular. Complicações microvasculares compreendem a retinopatia diabética (RD), a nefropatia diabética (ND) e a neuropatia periférica (NP), enquanto que as complicações macrovasculares compreendem a doença cardiovascular (DCV), a doença arterial periférica (DAP) e o acidente vascular cerebral (AVC). Pacientes com DM2 em sua fase inicial já podem apresentar um quadro protrombótico que só tende a piorar com a progressão da doença. Esse quadro protrombótico é resultante principalmente do processo inflamatório e da disfunção endotelial. Polimorfismos genéticos relacionados com as diferentes fases da hemostasia podem contribuir para o aumento ou diminuição no risco de formação de trombos arteriais e venosos que podem afetar a micro e macrovasculatura destes indivíduos.

Objetivos: Investigar a influência de polimorfismos envolvidos com a hemostasia como fatores de risco para o desenvolvimento de complicações crônicas micro e macrovasculares em pacientes com DM2.

Metodologia: Foi realizado um estudo de caso controle aninhado em uma coorte de pacientes DM2 não relacionados provenientes de um estudo multicêntrico no sul do Brasil. Os pacientes DM2 foram divididos em 2 grupos de estudo. Para o grupo com complicação macrovascular estudou-se 404 pacientes DM2. Casos para a complicação macrovascular foram definidos como tendo cardiopatia isquêmica (CI), acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) ou DAP enquanto que controles foram definidos como pacientes com pelo menos 5 anos de DM2 e sem a respectiva complicação. Para o estudo das complicações microvasculares 393 pacientes com DM2 foram estudados. Os casos foram definidos como tendo RD, ND ou neuropatia sensorial distal (NSD). Controles para a complicação microvascular foram pacientes com pelo menos 10 anos de DM2 e sem a respectiva complicação. Os polimorfismos estudados foram testados em duplicata

utilizando-se a PCR seguida de RFLP quando necessário. Foram investigados nove polimorfismos assim distribuídos: Na fase da coagulação foram estudados cinco polimorfismos (*FGB* rs1800790, *F2* rs1799963, *FV* rs6025 *F7* rs5742910 e *F13A* rs5985); dois (*PLAT* rs4646972 e *PAI-1* rs1799768) na fase da fibrinólise e um (*ITGB3* rs5918) na fase plaquetária. O polimorfismo da *MTHFR* rs1801133 envolvido com a hiperhomocisteinemia é considerado um fator de risco para DCV e por isso foi incluído. Para a análise estatística foi utilizado o teste do χ^2 para a comparação das frequências genótípicas e alélicas. Os polimorfismos com diferença significativa foram testados na regressão de Poisson com variância robusta ajustado pelas variáveis de confusão. Para as complicações microvasculares também foi utilizado o teste do χ^2 com análise de resíduo ajustado.

Resultados: O polimorfismo do receptor plaquetário *ITGB3* rs5918 apresentou associação com os desfechos AVCI e DAP. Para o desfecho AVCI o genótipo 176TC mostrou associação significativa [(PR = 2.04(1.11-3.73); P = 0.021], enquanto que para a DAP a associação foi com o genótipo 176CC [PR = 1.90(1.29-2.81); P = 0.001]. Em relação às complicações microvasculares o único polimorfismo que mostrou associação foi o *PAI-1* rs1799768. Neste caso, o polimorfismo demonstrou ter uma associação inesperada para o alelo 4G como um fator de proteção quando comparamos pacientes com e sem ND [PR = 0.71(0.57-0.89); P = 0.003]. Porém, quando foi estratificado o grupo de pacientes com ND de acordo com a severidade, foi possível demonstrar usando a análise de resíduo ajustado do teste do χ^2 que havia uma diminuição significativa na frequência do alelo 4G somente no estágio mais avançado da doença renal (P = 0.009; AR = -2.95) o que sugere o seu envolvimento com uma maior taxa de mortalidade na ND. Também foi possível mostrar que o alelo de risco 4G está significativamente associado com a cardiopatia isquêmica nos indivíduos com ND (P = 0.03; AR = 2.5).

Conclusões: Os pacientes com DM2 portadores do alelo de risco 176C do polimorfismo *ITGB3* rs5918 apresentam um risco significativamente aumentado de desenvolver AVCI e DAP, enquanto que os portadores do alelo de risco 4G do polimorfismo *PAI-1* rs1799768 provavelmente apresentem maior risco de desenvolver ND. Além disso, os portadores do alelo 4G e que tem ND apresentaram um risco significativamente aumentado de desenvolverem CI.

Palavras Chaves: Diabetes mellitus tipo 2; hemostasia; fibrinólise; *ITGB3*; *PAI-1*

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) represents approximately 90% of the diabetes types, increasingly affecting the adult population and nowadays also occurring in young adults and children. Hypercaloric diets, sedentarism and genetic predisposition are the main triggering factors of chronic complications associated to T2DM. Unfortunately, these are the complications that lead to a considerable increase in morbidity and mortality, which may reach 80%, with the main complications being of micro- and macrovascular nature. The microvascular complications are diabetic retinopathy (DR), diabetic nephropathy (DN) and peripheral neuropathy (PN). The macrovascular complications include cardiovascular disease (CVD), peripheral arterial disease (PAD) and stroke. In the initial T2DM stage, patients may present a prothrombotic state that tends to worsen as the disease evolves. This prothrombotic state results mainly from the inflammatory process and from the endothelial dysfunction. Genetic polymorphisms related to the different stages of hemostasis may play a role in the increase or decrease of the risk of arterial and venous thrombus, which may affect the micro- and the macrovasculature of these individuals.

Objectives: To investigate the influence of the polymorphisms related to hemostasis as risk factors for the development of micro- and macrovascular complications in T2DM patients.

Methods: A nested case-control study was conducted with a cohort of unrelated T2DM patients from a multicenter study made in southern Brazil. T2DM patients were divided in two groups. The macrovascular complication group included 404 T2DM patients. Macrovascular complications were defined according to the presence of the following criteria: ischemic heart disease (IHD), ischemic stroke (IS) or PAD. The control group was formed by patients who had had T2DM for at least five years but without the respective complications. The microvascular complication group included 393 T2DM patients. Microvascular complications were defined based on the presence of the following criteria: DR, DN, or distal sensory neuropathy (DSN). The controls used in the investigation of the microvascular complications were patients who had T2DM for at least 10 years, without the respective complications. The polymorphisms investigated were analyzed by PCR with RFLP, when necessary. In total, nine polymorphisms were studied. Five polymorphisms

(*FGB* rs1800790, *F2* rs1799963, *FV* rs6025, *F7* rs5742910 and *F13A1* rs5985) were investigated for the coagulation stage, two (*PLAT* rs4646972 and *PAI-1* rs1799768) for the fibrinolysis stage, and one (*ITGB3* rs5918) for the platelet stage. The polymorphism *MTHFR* rs1801133, associated to hyperhomocysteinemia, which is considered a risk factor for IHD, was also investigated. The statistical analysis used the χ^2 test to compare genotypic and allelic frequencies. The polymorphisms presenting significant differences were tested using the Poisson regression with robust variance adjusted for the confounding variables. The χ^2 test with the analysis of adjusted residues was also used for microvascular complications.

Results: The polymorphism of the platelet receptor *ITGB3* rs5918 was associated with the outcomes IS and PAD. Considering IS, the genotype 176TC exhibited significant association [(PR = 2.04(1.11-3.73); P = 0.021], while considering PAD the association was with genotype 176CC [PR = 1.90(1.29-2.81); P = 0.001]. Regarding the microvascular complications, the only polymorphism that presented association was *PAI-1* rs1799768. In this case, the polymorphism demonstrated an unexpected association with allele 4G as a protection factor when patients with and without DN [PR = 0.71(0.57-0.89); P = 0.003]. However, when the group of patients with DN was stratified in terms of severity, it was possible to demonstrate a significant decrease in 4G allele frequency only in the more advanced stage of the renal disease, using the adjusted residue of the χ^2 test (P = 0.009; AR = -2.95), which suggests its involvement with a higher mortality rate in DN. It was also possible to show that the risk allele 4G is significantly associated with ischemic cardiopathy in individuals with DN (P = 0.03; AR = 2.5).

Conclusions: The T2DM patients carriers of the risk allele 176C of the polymorphism *ITGB3* rs5918 present a significantly increased risk of developing IS and PAD, while carriers of the risk allele 4G of the polymorphism *PAI-1* rs1799768 probably present higher risk of developing DN. Apart from this, this group of subjects also presented a significant risk of developing IHD.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, hemostasis; fibrinolysis; *ITGB3*; *PAI-1*.

Capítulo 1: Introdução

1. Introdução

1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A classificação atualmente recomendada apresenta quatro tipos principais: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes mellitus devido a outros casos específicos e diabetes mellitus gestacional (DMG). Entretanto, nem todos os pacientes podem ser claramente classificados em ou outro tipo. Alguns destes casos podem inclusive ter um diagnóstico inicial de um tipo de diabetes alterado para outro, pois à medida que o tempo passa, as manifestações clínicas ficam mais evidentes com a progressão da doença permitindo a sua melhor caracterização (American Diabetes Association 2009a).

A prevalência do diabetes foi estimada em 2,8% no ano de 2000 na população mundial considerando-se todas as faixas etárias. Para o ano de 2030 é projetado um aumento para no mínimo 4,4% da população mundial ou até mesmo um pouco superior considerando taxas variáveis de desenvolvimento e urbanização de alguns países e regiões do mundo, tornando assim, evidente o efeito epidêmico e crescente desta doença (Rathmann et al. 2004; Wild et al. 2004).

No Brasil, um estudo epidemiológico envolvendo diferentes centros de referência foi realizado em 1987 em nove capitais brasileiras. O DM apresentou uma prevalência de 7,6% na população com idade entre 30 e 69 anos. Os valores mais elevados foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, que representam as regiões mais industrializadas do país sendo que as capitais, São Paulo com 9,7% e Porto Alegre com 8,9% foram as cidades brasileiras com as maiores prevalências de DM2. No mesmo estudo foi demonstrado que a prevalência geral de DM aumenta bastante, passando para 17,4%, quando se considera uma faixa de 60 a 69 anos de idade (Malerbi et al. 1992).

O DM2 representa cerca de 85-90% dos casos de DM sendo caracterizado por uma combinação de defeitos que envolvem a ação e secreção da insulina. Ocorre tanto

resistência a ação da insulina nos tecidos alvos como uma resposta secretória inadequada pelas células β pancreáticas frente às variações da glicemia no paciente (American Diabetes Association 2009a; de Oliveira et al. 2009; DeFronzo 2004).

A história natural do DM2 inicia com um quadro de pré-diabetes que se caracteriza por uma tolerância normal a glicose a qual é conseguida pelo aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas além do usual. Essa hiperinsulinemia aumentada inicial é suficiente para garantir que a glicose recém assimilada no período absorptivo e ainda presente na circulação esplâncnica seja captada, principalmente pelo fígado para ser convertida e armazenada como glicogênio. Já, na circulação periférica a glicose excedente será captada pelo tecido adiposo e o músculo esquelético sensibilizados pela insulina. Desse modo, a glicemia ainda se mantém normal ou se encontra apenas ligeiramente alterada. À medida que a doença evolui, as células β provavelmente entram em exaustão por um mecanismo ainda não bem compreendido e assim diminuem a secreção de insulina ou até mesmo cessam a sua produção. Nesta situação a hiperglicemia passa a ser evidente caracterizando o estado de tolerância diminuída à glicose e o DM2 está instalado (DeFronzo 2004; Ryan 2009).

Tipicamente, o DM2 afeta indivíduos com mais de 40 anos, entretanto, nos últimos anos a epidemia da obesidade em nível mundial com a elevação significativa no consumo de calorias e aumento do sedentarismo também na população jovem tem provocado um aumento na incidência desta doença entre adultos jovens e até mesmo em adolescentes e crianças (Gaylor et al. 2004; Rosenbloom et al. 2008; Tfayli et al. 2009).

Vários fatores estão associados com o aumento da incidência e da prevalência do DM2 nas últimas décadas. Entre os principais, pode-se destacar o aumento da expectativa de vida da população, a ingestão de uma dieta hipercalórica com excesso de gordura saturada e a inatividade física que levam a obesidade, além de um grau progressivo de urbanização com as respectivas conseqüências sobre a mudança no estilo de vida, tais como o aumento do estresse e alteração dos hábitos culturais. Estes fatores, aliados a predisposição genética, podem ser desencadeantes do desenvolvimento do DM2 e conseqüentemente das suas complicações crônicas, especialmente as micro e

macrovasculares, as quais estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade nesta doença, a despeito dos avanços tecnológicos no diagnóstico e de um maior arsenal terapêutico para o seu tratamento (Bonadonna et al. 2006; de Oliveira et al. 2009; Diamond 2003; Nazimek-Siewniak et al. 2002; Venables et al. 2009; Wild et al. 2004).

Para caracterizar o quadro de pré-diabetes não é necessária a detecção isolada da hiperglicemia. É necessário somente que o teste oral de tolerância à glicose após 2 horas apresente valores entre 140 a 200 mg/dL e/ou a glicemia de jejum apresente valores entre 100 a 125 mg/dL. Assim, um paciente que apresente um ou ambos os resultados dentro destes limites de alteração é considerado como candidato para o desenvolvimento do DM2 e, por conseguinte, também para doenças cardiovasculares que estão usualmente presentes nesta doença (American Diabetes Association 2009b; Nathan et al. 2007)

A incidência e a prevalência do DM2 estão aumentando e, por isso, a identificação precoce do quadro de pré-diabetes passa a ser de grande importância no curso da doença, pois nesta fase 50 a 80% das ilhotas pancreáticas ainda tem função normal. Como o tempo de desenvolvimento e consolidação da doença e de suas complicações é longo, usualmente 10 a 12 anos, é possível reverter o quadro para a normalidade em alguns pacientes que se submetem a uma mudança no estilo de vida, principalmente quando combinam padrões alimentares saudáveis e exercícios aeróbicos moderados e contínuos que resultem em perda de tecido adiposo e melhor controle glicêmico (Curtis et al. 2005; Orozco et al. 2008; Short et al. 2003; Venables & Jeukendrup 2009).

Freqüentemente, diferentes fatores de risco, tais como obesidade visceral, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão, já estão presentes na fase pré-clínica do DM2. Estes fatores constituem um quadro conhecido como síndrome metabólica, que apesar de se mostrar muitas vezes assintomático, representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, particularmente para a doença coronariana (Alberti et al. 2005; Resnick et al. 2002).

Embora a causa da síndrome metabólica permaneça obscura, a resistência insulínica é um achado relevante nestes pacientes. Tem sido sugerido que ela possa desempenhar um

papel importante no seu desenvolvimento, embora pareça mais provável que vários fatores juntos sejam responsáveis por desenvolver esse fenótipo. Sendo assim, a síndrome metabólica pode ser referida como o agrupamento de um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular e também para o surgimento do DM2 (Alberti et al. 2005; Demacker 2007).

Um fator importante na síndrome metabólica e que favorece o desenvolvimento do DM2 nestes pacientes é a obesidade central. Cerca de 80% dos pacientes com diabetes apresentam sobrepeso principalmente devido ao aumento da gordura visceral intra-abdominal (Gerich 2003; Lazar 2005).

A obesidade central nestes pacientes caracteriza-se mais fortemente pelo aumento da circunferência abdominal do que pelo aumento do índice de massa corporal. A gordura intra-abdominal representa um importante risco no desenvolvimento da síndrome metabólica e da resistência insulínica favorecendo claramente o aparecimento do DM2 nestes indivíduos e das complicações cardiovasculares e metabólicas. Tem sido sugerido que a gordura intra-abdominal funcione como um órgão endócrino e que sua deposição excessiva proporciona um aumento na síntese e secreção de substâncias inflamatórias e pró-trombóticas, tais como adipocinas e o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1). Estas e outras substâncias seriam responsáveis por acelerar o processo de dislipidemia e a disfunção endotelial favorecendo o desenvolvimento do quadro atero-esclerótico nos pacientes com DM2 (Brown et al. 2009; Demacker 2007; Korner et al. 2009; Lazar 2005).

Sabe-se que a maior parte dos indivíduos, em especial aqueles com obesidade e suas complicações associadas ao desenvolvimento do DM2, apresentam baixa adesão às mudanças comportamentais que poderiam significar uma melhora no quadro da doença. Sendo assim, a prevenção também poderia ser feita utilizando-se fármacos que pudessem controlar o aparecimento e a instalação dos fatores de risco, diminuindo ou pelo menos retardando o início da doença (Curtis & Wilson 2005).

O usualmente prolongado tempo em desenvolver o DM2 está associado com o surgimento de uma hiperglicemia crônica que geralmente se desenvolve de forma gradual

não resultando em sintomas aparentes nos estágios iniciais. Assim, o paciente pode permanecer sem diagnóstico por vários anos. No entanto, à medida que evolui o quadro de pré-diabetes para DM2, a hiperglicemia crônica acaba provocando direta ou indiretamente danos em diversos órgãos, levando ao desenvolvimento de complicações vasculares crônicas e alterações hemostáticas que muitas vezes são detectadas antes do diagnóstico do DM2 (DeFronzo 2004; Spijkerman et al. 2004).

Dessa forma, estima-se que cerca de 30 a 50% dos pacientes com DM2 possam estar sem diagnóstico e somente quando ocorre o surgimento de complicações que necessitem de cuidados médicos é que se estabelece o diagnóstico correto (American Diabetes Association 2009b; de Oliveira et al. 2009; Ryden et al. 2007).

Recentemente, tem sido sugerido que a falta de uma boa estratégia para reconhecer a fase de pré-diabetes é o principal impedimento para evitar as complicações microvasculares e macrovasculares associadas com o desenvolvimento de DM2. Os autores ainda salientam que esse reconhecimento inicial do pré-diabetes permitiria o uso de terapias que poderiam diminuir a chance de desenvolver o DM2 e suas complicações (Phillips et al. 2009).

De modo geral, a falta de controle glicêmico associada com a presença de outros fatores de risco, acaba por promover alterações morfofuncionais de diferentes órgãos, especialmente, olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos à medida que o DM2 se desenvolve. Estas complicações se estabelecem de modo crônico e têm em comum a presença da doença vascular relacionada com a microvasculatura ou a macrovasculatura ou ainda, com ambas (American Diabetes Association 2009a; Fowler 2008; Orasanu et al. 2009).

1.2 Complicações micro e macrovasculares

As complicações vasculares são a principal causa do aumento da mortalidade e da morbidade em pacientes com DM2 representando cerca de 80% dos casos. Esse elevado percentual evidencia a necessidade de um diagnóstico preciso e de um acompanhamento terapêutico adequado destas complicações no intuito de minimizar as taxas de mortalidade e morbidade nestes pacientes. Sendo assim, é de grande importância o estudo dos fatores de risco clássicos: a hipertensão, obesidade, hiperglicemia, resistência insulínica, dislipidemia aliados a outros, tais como os de influência genética, origem étnica e urbanização entre outros (de Oliveira et al. 2009; Gerchman et al. 2008; Kramer et al. 2009; Rathmann & Giani 2004; Ryden et al. 2007).

Classicamente, as complicações vasculares no DM2 são separadas em dois grupos: complicações microvasculares e macrovasculares. As complicações microvasculares compreendem a retinopatia diabética (RD), a nefropatia diabética (ND) e a neuropatia periférica (NP). Subtipos de complicações microvasculares podem ser reconhecidos como, por exemplo, na NP onde podem ser reconhecidos pacientes portadores de neuropatia sensorial distal (NSD). Já as complicações macrovasculares compreendem a doença cardiovascular (DCV), a doença arterial periférica (DAP) e o acidente vascular cerebral (AVC). Também subtipos destas complicações podem ser reconhecidos, tais como os pacientes com cardiopatia isquêmica (CI) e acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) (Fowler 2008; Nazimek-Siewniak et al. 2002).

As complicações microvasculares estão associadas ao tempo de exposição à hiperglicemia que acaba por provocar lesões estruturais e funcionais do endotélio vascular. Estas alterações acabam por afetar a perfusão de órgãos notadamente dependentes da microvasculatura, tais como a retina, os rins e as terminações sensoriais periféricas. A mais comum alteração microvascular em pacientes diabéticos é o espessamento da membrana basal capilar e de arteríolas o que acaba por promover a hipertensão, hipóxia tecidual e reduzida cicatrização de ferimentos (Orasanu & Plutzky 2009).

Por outro lado, as complicações macrovasculares resultam de alterações estruturais na macrovasculatura, usualmente provocadas por disfunção do endotélio em resposta aos diferentes fatores de risco, o que acaba por levar ao espessamento da parede vascular e/ou a perda da sua elasticidade especialmente devido a alterações na matriz extracelular que sustenta o endotélio (Krentz et al. 2007; Rahman et al. 2007).

O controle glicêmico tem sido preconizado como uma forma de minimizar o avanço das complicações vasculares no diabetes. No Brasil, um estudo envolvendo 6701 pacientes diabéticos tipo 1 e 2 evidenciou que a maioria dos pacientes apresenta um controle glicêmico inadequado e segundo os autores essa seria uma causa importante para o aumento das complicações micro e macrovasculares e como consequência gera um elevado custo financeiro ao sistema de saúde. Sendo assim, eles propõem a necessidade de se fazer um controle agressivo sobre a glicemia nos pacientes, principalmente na fase inicial do desenvolvimento da doença (Mendes et al. 2009).

Diferentes grupos têm realizado estudos visando o controle glicêmico em pacientes diabéticos. Durante a realização do UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) um grupo de pacientes diabéticos foi submetido a um controle glicêmico intenso durante 10 anos. Os resultados do estudo sugeriram que o controle glicêmico intensivo reduz não só as complicações microvasculares, mas também reduz o risco de complicações macrovasculares em pacientes tipo 2 (Holman et al. 2008).

Outros grupos de pesquisadores também têm acompanhado pacientes diabéticos submetidos a um controle glicêmico intensivo. Assim, o ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes), o ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation) e o VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial) têm avaliado pacientes com rígido controle glicêmico e acompanhado o surgimento de complicações crônicas do diabetes, porém eles têm apresentado alguns resultados conflitantes. Assim, o ADVANCE (Patel et al. 2008) e o VADT (Duckworth et al. 2009) não mostraram nenhuma redução significativa no risco de doença cardiovascular, enquanto que os resultados do ACCORD (Gerstein et al. 2008) sugerem que o controle glicêmico intensivo que tem como alvo níveis baixos de HbA_{1c} (<6,0%), pode de fato ser muito perigoso para certos grupos de pacientes, especialmente os

que já têm DCV ou têm um tempo maior de diabetes, pois nestes grupos a taxa de mortalidade estava significativamente aumentada (Skyler et al. 2009).

Em vista desses resultados conflitantes, a American Diabetes Association (ADA) e a American Heart Association (AHA) continuam defendendo que o controle dos outros fatores de risco, tais como redução da hipertensão, controle da dislipidemia, uso de estatinas e aspirina, aliados a uma mudança para um estilo de vida saudável são as estratégias primárias para reduzir a DCV nos pacientes com DM1 e DM2 e não o controle glicêmico intensivo. Por outro lado, também enfatizam que um controle glicêmico adequado, ou seja, com níveis de HbA_{1c} próximos ou ligeiramente inferiores a 7,0% é desejado e está associado com a redução no desenvolvimento de complicações microvasculares e neuropatias tanto em pacientes com DM1 como DM2 (Skyler et al. 2009).

Estudos de meta-análise fornecem evidências que um controle glicêmico intenso pode ser benéfico para a DCV, particularmente, na diminuição do risco do infarto do miocárdio não fatal, mas não tem efeito na redução total da mortalidade em pacientes com DM2 (Kelly et al. 2009; Ray et al. 2009). Entretanto, outros fatores de risco, tais como hipertensão e dislipidemias, quando controlados de modo intenso se mostram mais efetivos em reduzir a incidência e a severidade das complicações macrovasculares (Preis et al. 2009).

Embora as complicações micro e macrovasculares envolvam leitos vasculares distintos, muitas vezes elas co-existem em um mesmo indivíduo (Alwakeel et al. 2009; Brown 2008; Krentz et al. 2007). Assim, tem sido proposto que exista compartilhamento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no seu desenvolvimento (Krentz et al. 2007). A disfunção endotelial pode resultar de diferentes mecanismos que incluem alterações fisiológicas desde a fase do pré-diabetes até o seu estabelecimento pleno. Assim, à medida que ocorre o surgimento de alterações hemostáticas relacionadas ao diabetes, o endotélio vascular, seja na microvasculatura ou na macrovasculatura, vai sofrendo alterações funcionais e estruturais. Desta forma a hiperinsulinemia inicial, a resistência insulínica, a hiperglicemia, a dislipidemia, a hipertensão, o aumento na produção de espécies reativas

de oxigênio, a inflamação mediada por citocinas são alguns dos fatores que aumentam a disfunção endotelial podendo ocorrer tanto na microvasculatura como na macrovasculatura (Krentz et al. 2007; Orasanu & Plutzky 2009) e desta forma estarem envolvidas em ambas as complicações.

1.3 Diabetes e o estado protrombótico

O estado protrombótico em DM e principalmente em pacientes com DM2 é uma condição bem conhecida, mas os mecanismos fisiopatológicos que o determinam não o são (Grant 2007).

De modo geral, a função hemostática pode ser afetada em diferentes fases. A fase de iniciação depende principalmente da expressão do fator tissular, especialmente na superfície das células do endotélio vascular de modo a poder ativar proteínas da fase fluida que se encarregarão de promover a ativação de outras proteínas plasmáticas e também da fase celular, especialmente na superfície das plaquetas o que promove o processo de amplificação e propagação do sistema hemostático até a formação do coágulo. Concomitantemente com a iniciação da hemostasia, o sistema de anticoagulação e de fibrinólise deve entrar em ação para garantir o balanço hemostático (Vine 2009).

A disfunção endotelial pode ser acompanhada por uma série de fatores envolvidos no processo inflamatório que acabam por evidenciar o desenvolvimento de um quadro protrombótico à medida que o DM2 se desenvolve principalmente associado com a obesidade e o processo de aterogênese (Ajjan et al. 2009; Goldberg 2009).

Evidências de alterações protrombóticas ocorrem ainda na fase de pré-diabetes relacionada com a hiperinsulinemia e podem ser marcadas, por exemplo, pelo aumento da secreção do fator Von Willebrand e do inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) e diminuição na secreção do ativador tecidual do plasminogênio (tPA) pelo endotélio vascular (Ajjan & Ariens 2009; Goldberg 2009). Estas alterações se tornam mais marcantes à medida que a disfunção endotelial evolui. Além disso, um estado de hipercoagulabilidade e de hipofibrinólise se desenvolve associado com o aumento da

adiposidade e do processo inflamatório vascular que normalmente acompanha o desenvolvimento do DM2 (Ajjan & Ariens 2009; Erem et al. 2005; Goldberg 2009; Stratmann et al. 2009).

Este estado protrombótico pode ser evidenciado pelo aumento das complicações micro e macrovasculares que acompanham o desenvolvimento da DM2 aumentando a morbidade e mortalidade desta condição (Cade 2008; Fowler 2008; Orasanu & Plutzky 2009) e pela medida antigênica ou de atividade das proteínas envolvidas na hemostasia e fibrinólise. Em pacientes com DM2, fibrinogênio, fator VII, fator XII, fator tissular, fator Von Willebrand e PAI-1 têm sua síntese aumentada (Erem et al. 2005; Grant 2007) evidenciando um aumento da coagulabilidade e uma diminuição da fibrinólise. Além disso, a capacidade de inibir a ativação das plaquetas também acontece com o aumento da disfunção endotelial (El Haouari et al. 2008; Schafer et al. 2008).

Como várias das proteínas que estão envolvidas nas diferentes fases da coagulação e da fibrinólise apresentam variantes genéticas que alteram o seu nível de expressão pode ser importante estudar polimorfismos específicos dentro de diferentes rotas e que assim, possam auxiliar a identificar riscos para os pacientes com DM2 em desenvolver complicações vasculares.

1.4 Polimorfismos da hemostasia

Polimorfismos que interferem com a função hemostática podem afetar o balanço da coagulação e da fibrinólise e assim aumentar o risco de eventos trombóticos ou hemorrágicos (Dahlback 2008). Individualmente, a maioria dos polimorfismos é, usualmente, responsável somente por um pequeno efeito, entretanto eles podem ter um efeito maior quando combinados num mesmo indivíduo e assim, dependendo da interação gene-gene e gene-ambiente resultar em um efeito maior sobre o fenótipo final (Auro et al. 2007; Szolnoki et al. 2003). Assim, polimorfismos envolvidos nas diferentes fases da hemostasia ou que interfiram com o risco de doença cardiovascular por alterar o estado de coagulabilidade e de hemostasia devem ser estudados.

Os polimorfismos do presente estudo são descritos a seguir e uma síntese dos mesmos encontra-se na tabela 1. Na fase da coagulação foram estudados, cinco polimorfismos sendo que três deles: *FGB* rs1800790, *F2* rs1799963 e *FV* rs6025 são usualmente apresentados como fatores de risco para o desenvolvimento de complicações trombóticas venosas e/ou arteriais, enquanto que os outros dois: *F7* rs5742910 e *F13A* rs5985 são considerados potencialmente protetores. Na fase da fibrinólise foram estudados os polimorfismos *PLAT* rs4646972 e *PAI-1* rs1799768, ambos considerados de risco para o desenvolvimento de trombos, pois supostamente estão envolvidos na diminuição da fibrinólise. Na fase plaquetária, foi estudado o polimorfismo *ITGB3* rs5918 envolvido com a ativação das plaquetas e desta forma também de risco trombótico. Embora o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 não esteja envolvido diretamente com a hemostasia, ele é considerado um importante fator de risco para doenças vasculares e por isso foi incluído no estudo.

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos estudados

Gene	Cromossomo	rs	Polimorfismo	Região Afetada	Nome
<i>FGB</i>	4q28	rs1800790	-445 A>G	promotor	Cadeia beta do fibrinogênio
<i>F2</i>	11p11-q12	rs1799963	20210 G>A	3'UTR	Trombina / fator II
<i>F5</i>	1q23-q25	rs6025	1691 G>A	R506Q	Fator V
<i>F7</i>	13q34	rs5742910	-323 del/ins(10bp)	promotor	Fator VII
<i>F13A1</i>	6p25-p24	rs5985	103 G>T	V34L	Fator XIII A1 (polipeptídeo A1 do fator XIII)
<i>PLAT</i>	8p12-q11.2	rs4646972	ins/del (311bp)	Intron 8	Ativador tecidual do plasminogênio
<i>PAI-1</i>	7q21.3-q22	rs1799768	-675 5G/4G	promotor	Inibidor-1 do ativador tecidual do plasminogênio
<i>ITGB3</i>	17q21.32	rs5918	176 T>C	P59L	Integrina beta III (glicoproteína IIIa, antígeno CD61)
<i>MTHFR</i>	1p36.3	rs1801133	677 C>T	V222A	Metilenotetrahydrofolato redutase

1.4.1 Fibrinogênio e o polimorfismo *FGB* rs1800790

O fibrinogênio é uma glicoproteína de 340 kDa sintetizada nos hepatócitos e secretada como um hexâmero composto de três pares de cadeias polipeptídicas (α , β e γ), que são codificadas por três genes dispostos *in tandem* no cromossomo 4q28, ocupando uma região de aproximadamente 50Kb (Iacoviello et al. 2001).

Os níveis plasmáticos de fibrinogênio variam de 2-4 g/L na circulação sanguínea e podem ser alterados por fatores genéticos e ambientais. Mulheres, especialmente usuárias de contraceptivos orais, apresentam níveis mais altos de fibrinogênio. Níveis elevados de fibrinogênio também podem refletir o estado inflamatório o qual está associado com o desenvolvimento da aterosclerose e conseqüentemente ser um fator de risco nas complicações macrovasculares (Voetsch et al. 2004).

O fibrinogênio é uma proteína plasmática crucial no processo de formação e evolução do trombo. Sua clivagem, provocada pela ação da enzima trombina, produz fragmentos de fibrina que são polimerizados formando o coágulo, estabilizado posteriormente com o auxílio do fator XIII. O fibrinogênio também participa da agregação plaquetária pela sua ligação ao receptor GPIIb-IIIa, além de ser um importante determinante na viscosidade do plasma (Ajjan & Ariens 2009; Voetsch & Loscalzo 2004).

Um grande número de estudos tem identificado uma associação positiva entre os níveis de fibrinogênio com doenças cardiovasculares tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com doenças vasculares pré-existentes, aumentando o risco para as doenças cardiovasculares (Ajjan & Ariens 2009; Voetsch & Loscalzo 2004), principalmente em fumantes com aterosclerose, provavelmente como efeito do processo inflamatório sistêmico o qual foi acompanhado pelo aumento da IL-6 na circulação (MacCallum 2005).

Em pacientes com DM2 o fibrinogênio circulante se encontra em níveis mais elevados provavelmente como resposta ao quadro inflamatório que se instala nestes indivíduos ainda na fase inicial da doença persistindo este aumento até os estágios mais

avançados (Wannamethee et al. 2004) e encontram-se significativamente aumentados em pacientes que desenvolveram ND (Erem et al. 2005).

Estima-se que fatores genéticos possam contribuir com até 50% da variabilidade total dos níveis de fibrinogênio. Vários polimorfismos já foram identificados nos genes que codificam os três pares de cadeias polipeptídicas, α , β e γ que formam o fibrinogênio. Mutações identificadas nestes genes foram associadas com vários fenótipos, incluindo afibrinogenemia, desfibrinogenemia, hipodisfibrinogenemia e tendência à trombose (Voetsch & Loscalzo 2004).

O polimorfismo *FGB* rs1800790 representa a substituição de uma guanina por uma adenina na posição -455 (-455G>A) na área promotora do gene. Esta mutação tem sido associada com o aumento da atividade transcricional do gene. Como consequência pode-se supor um aumento na síntese da cadeia beta do fibrinogênio podendo assim representar um desbalanço no sistema hemostático (Coulam et al. 2008; Liu et al. 2005; Renner et al. 2002).

Além de fatores genéticos, fatores tais como a inflamação e o fumo, também estão associados ao aumento na concentração do fibrinogênio circulante e conseqüentemente numa possível alteração do balanço hemostático (Ajjan & Ariens 2009).

Estudos envolvendo pacientes com DM2 encontraram associação deste polimorfismo com DCV, mas não com os níveis de fibrinogênio (Carter et al. 1996). Um estudo envolvendo pacientes chineses com DM2 encontrou resultados similares quanto ao risco de DCV e também demonstrou que nesta população o nível de fibrinogênio estava aumentado (Lam et al. 1999). Entretanto, existem estudos que não encontram qualquer associação entre o polimorfismo e complicações macrovasculares em pacientes com DM2 (Poglajen et al. 2004). Porém, alguns autores têm sugerido que o *FGB* rs1800790 possa estar sendo influenciado por outros polimorfismos em desequilíbrio de ligação que assim influenciariam os níveis de fibrinogênio e seriam os verdadeiros responsáveis pela variação de risco com as complicações vasculares diversas (Morozumi et al. 2009; Poglajen et al. 2004).

1.4.2 A protrombina e o *F2* rs1799963

A protrombina é também conhecida como Fator II da coagulação sanguínea. No plasma, circula como um zimogênio de 72 KDa da serino-protease trombina, que desempenha um papel central na hemostasia, promovendo a coagulação e desempenhando funções inter-relacionadas importantes no mecanismo de anticoagulação e fibrinólise.

O gene que codifica para a protrombina está localizado no cromossomo 11p11-q12 e consiste de 14 exons. O polimorfismo da protrombina *F2* rs1799963 é um dos mais bem conhecidos polimorfismos trombofílicos, sendo reconhecido por uma transição G>A na posição 20210 (20210G>A) que está na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene (Poort et al. 1996).

Esta mutação foi associada com uma forma mais estável do RNA mensageiro provavelmente envolvendo um mecanismo de poliadenilação mais eficiente no terminal 3', o que resulta numa tradução mais eficiente e conseqüentemente no aumento desta proteína no meio circulante (Danckwardt et al. 2004; Gehring et al. 2001).

A mutação 20210G>A tem sido classicamente associada com o aumento no risco de trombose venosa profunda (Dahlback 2008; Slavik et al. 2009). Entretanto, estudos com trombose arterial são diversos e assim como existem aqueles que encontram associação com trombose arterial e conseqüentemente com DCV, AVC e DAP, também existem vários estudos que não observaram este efeito (Grant et al. 1999; Lane et al. 2000; Sartori et al. 2009).

1.4.3 Fator V e o polimorfismo rs6025

O Fator V procoagulante é uma grande glicoproteína de cadeia única com aproximadamente 330 KDa sintetizado por hepatócitos e megacariócitos. Apresenta concentração plasmática média de cerca de 20nmol/L (7 µg/L), porém aproximadamente 20% de FV está armazenado nos grânulos α das plaquetas. Seu gene está localizado no cromossomo 1, na região 1q21-25 e contém 25 exons responsáveis por codificar uma

glicoproteína de cerca de 80 Kb (Camire et al. 2009; Camire et al. 1998a; Camire et al. 1998b).

O Fator V procoagulante é convertido em sua forma ativa, FVa através da proteólise pela trombina. Em sua forma ativa o Fator V é um heterodímero composto de uma cadeia leve e uma cadeia pesada que na presença de Ca^{++} estão ligadas de forma não covalente. O FVa atua como um co-fator para o Fator Xa e juntos, na presença de Ca^{++} e fosfolípidios, ativam a protrombina em trombina (Camire & Bos 2009; Slavik et al. 2009).

Uma transição de G para A na posição 1691 (1691G>A) do éxon 10 caracteriza o polimorfismo *F5* rs6025. A mutação resulta na síntese de uma variante da molécula do fator V conhecida como fator V Leiden e envolve a substituição do aminoácido arginina por glutamina na cadeia polipeptídica (R534Q) (Bertina et al. 1994). Esta mutação confere resistência parcial do FVa à proteína C ativada reduzindo a degradação do Fator Va e aumentando a coagulabilidade o que predispõe à formação de trombos (Dahlback 2008; Dahlback 1994).

O fator V Leiden está claramente associado com o desenvolvimento de trombose venosa profunda e tromboembolismo, entretanto a sua associação com trombose arterial, a despeito de um grande número de trabalhos já realizados, permanece a ser esclarecida. Usualmente, a associação positiva ocorre combinada com algum outro fator também predisponente, quer seja outro polimorfismo genético concomitante, por exemplo, junto com o polimorfismo da protrombina *F2* rs1799963 ou com fatores ambientais, como por exemplo, o uso de anticoncepcionais orais (Auro et al. 2007; Lane & Grant 2000; Szolnoki et al. 2003; Voetsch & Loscalzo 2004).

Em relação a complicações crônicas microvasculares, especialmente retinopatias e neuropatias, o fator V Leiden tem sido associado em alguns estudos como fator de risco (Marcucci et al. 2001; Nagy et al. 2008), mas em outros não (Sodi et al. 2008).

1.4.4 Fator VII e o polimorfismo rs5742910

O gene do fator VII está localizado no cromossomo 13q14 e é responsável por codificar uma serino protease vitamina K-dependente sintetizada principalmente no fígado como uma glicoproteína de cadeia única. Na circulação, o fator VII é convertido enzimaticamente pelo fator tissular em uma dupla cadeia que representa a forma ativada (FVIIa) (Bersano et al. 2008). De modo usual, o complexo FVIIa/fator tissular dá início ao processo hemostático ativando rapidamente os fatores IX e X e iniciando a geração de trombina e a subsequente formação do coágulo (Vine 2009). Quase todo o FVII circula no plasma na forma de um zimogênio, entretanto uma pequena fração, cerca de 1%, mas de efeito potencialmente significativo encontra-se como FVIIa e pode estar envolvido na fase de iniciação da hemostasia e assim, favorecer ou proteger quanto aos riscos de eventos trombóticos, conforme uma maior ou menor quantidade esteja disponível (Bersano et al. 2008; Erem et al. 2005).

O polimorfismo do fator VII conhecido como *F7* rs5742910 é caracterizado por uma inserção de 10 pb na posição -323 do gene. Este polimorfismo foi associado com uma redução de até 33% da atividade do promotor em análises *in vitro* (Pollak et al. 1996). Outros estudos também confirmam esta diminuição na taxa da transcrição deste gene, embora a magnitude da diminuição possa ser menor (Humphries et al. 1996; Sabater-Lleal et al. 2007). Devido a esta menor transcrição e ser o FVII o responsável pela fase de iniciação da coagulação, uma diminuição na sua síntese poderia representar um fator protetivo contra efeitos trombóticos (Bersano et al. 2008; Grant 2007), principalmente no caso de pacientes com DM2 que já apresentam um nível basal usualmente aumentado de fator VII, além de um estado de hipercoagulabilidade e de hipofibrinólise (Erem et al. 2005; Grant 2007; Nieswandt et al. 2009).

Em recente estudo, o alelo -323 Ins(10pb) do polimorfismo *F7* rs5742910 foi associado a um menor risco de AVC em pacientes com fibrilação atrial (Roldan et al. 2008), entretanto alguns autores tem sugerido que este polimorfismo está na verdade em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos que seriam os verdadeiros causadores

da alteração no nível de expressão do fator VII, embora os mesmos autores sugiram a necessidade de mais estudos (Sabater-Lleal et al. 2007).

1.4.5 Fator XIII e o polimorfismo *F13A1* rs5985

O fator XIII é uma protransglutaminase que ocorre na circulação sanguínea como um zimogênio de estrutura heterotetramérica formado por duas subunidades A e duas subunidades B (A₂B₂). A subunidade A é composta de 731 aminoácidos e contém o sítio ativo, enquanto que a subunidade B é formada por 661 aminoácidos e serve de transportador para a proteína. A subunidade A, na forma A₂ ocorre intracelularmente em plaquetas, monócitos e macrófagos, enquanto que a subunidade B é transcrita no fígado e em alguns outros tecidos. O gene da subunidade A localiza-se no cromossomo 6p25.3-p24.3, compreendendo cerca de 160 Kb com 15 exons, enquanto que o gene da subunidade B está localizado no cromossomo 1q31-q32.1 e contém 12 exons (Kobbervig et al. 2004).

A ativação do fator XIII em FXIIIa ocorre em duas etapas. Primeiramente a trombina cliva a subunidade A entre a Arg37 e a Gly38 liberando um peptídeo de 37 aminoácidos. A presença de fibrina acelera a ativação do fator XIII pela trombina. Num segundo momento, em presença de cálcio (Ca⁺⁺), o dímero A₂ se dissocia da subunidade B₂ e sofre uma alteração conformacional expondo os seus sítios ativos. O fator XIII ativado (FXIIIa) catalisa a formação de ligações covalentes entre os resíduos laterais gama (γ), γ -glutamina com γ -lisina de monômeros de fibrina, aumentando a resistência da fibrina à degradação pela plasmina (Kobbervig & Williams 2004).

Vários polimorfismos localizados principalmente na subunidade A já foram descritos nos genes do fator XIII e alguns deles foram associados com patologias hemorrágicas, enquanto que outros podem estar associados com eventos trombóticos (Vysokovsky et al. 2004).

O polimorfismo do fator XIII conhecido como *F13A1* rs5985 é do tipo funcional, sendo considerado o mais importante que envolve a cadeia A1. Ele é caracterizado por uma mutação que troca uma guanina por uma timina na posição 103 (103G>T) que acaba

resultando na substituição de uma valina por uma leucina na posição 34 (V34L) que está localizada a 3 aminoácidos de distância do sítio de clivagem pela trombina (Vysokovsky et al. 2004). Esta alteração na cadeia A1 interfere com a proteólise da fibrina e segundo alguns autores pode levar a uma condição de proteção para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Hancer et al. 2006; Kain et al. 2005) e trombose venosa (Le Gal et al. 2007), embora alguns autores não tenham encontrado nenhum efeito, ou até mesmo efeito deletério (Bersano et al. 2008) quanto ao risco cardiovascular principalmente quando as concentrações de fibrinogênio são alteradas (Muszbek et al. 2008).

1.4.6 PLAT (tPA) e o polimorfismo rs4646972

O ativador tissular do plasminogênio (tPA ou PLAT) é uma serino protease sintetizada nas células endoteliais. Sua função é converter o plasminogênio em plasmina, a principal enzima que dá início a fibrinólise. O gene *PLAT* que codifica o tPA está localizado no cromossomo 8p12-q11.2 e possui 14 éxons que distribuídos em mais de 30 Kb (Ladenvall et al. 2003). O polimorfismo *PLAT* rs4646972 envolve uma inserção/deleção de 311 pares de bases da família *Alu* no intron 8 (Ludwig et al. 1992). Este polimorfismo foi estudado como risco para diferentes complicações trombóticas. Alguns dos trabalhos reportam associação positiva da presença do alelo I (inserção) com o aumento no risco de infarto agudo do miocárdio e trombose arterial (Ridker et al. 1997; van der Bom et al. 1997) enquanto que outros autores não encontram esta associação (Ladenvall et al. 2003; Robinson et al. 2006).

Tem sido proposto que a taxa de liberação local pelo endotélio, mais que a concentração plasmática, determina o potencial trombogênico. A taxa líquida de liberação de tPA varia muito entre indivíduos da população em geral e deve ser pelo menos em parte determinada geneticamente, embora também seja dependente da condição do microambiente vascular e da interação com outros genes (Asselbergs et al. 2008; Voetsch & Loscalzo 2004). Como é improvável que o polimorfismo no intron seja responsável por alterar a taxa de expressão do tPA outras variações genéticas passaram a ser estudadas principalmente na região promotora do gene e a determinação de diferentes haplótipos tem

sido usada para explicar a variação na sua atividade e no risco de eventos trombóticos, embora os resultados não sejam consistentes (Ajjan & Ariens 2009; Ladenvall et al. 2003; Voetsch & Loscalzo 2004).

1.4.7 PAI-1 e o polimorfismo rs1799768

O inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) é o inibidor primário tanto do ativador tissular do plasminogênio (t-PA) como do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) e assim, limita o processo fibrinolítico por impedir a ativação do plasminogênio em plasmina (Mansfield et al. 1995; van Goor et al. 2005).

O gene do *PAI-1* também conhecido como *SERPINE-1* está localizado no cromossomo 7q21.3-q22 e apresenta diversos polimorfismos funcionais que podem potencialmente alterar o nível da proteína na circulação (van Goor et al. 2005).

O polimorfismo *PAI-1* rs1799768 é um dos mais bem estudados. Ele localiza-se na região promotora na posição -675. Consiste de uma inserção/deleção de uma guanina, resultando em alelos que tem 4 ou 5 guaninas em seqüência gerando o polimorfismo -675 4G/5G (Mansfield et al. 1995). Os indivíduos homozigotos 4G4G têm sido associados com um aumento da atividade do PAI-1 e conseqüentemente com uma diminuição da fibrinólise o que aumenta o risco de eventos trombóticos (Mansfield et al. 1995; van Goor et al. 2005).

Entretanto, a expressão do PAI-1 não é um processo simples, pois é sintetizado a partir de tecidos vasculares, incluindo o endotélio, e também pelo tecido hepático e adiposo. A origem do PAI-1 e os mecanismos que promovem a sua elevação, especialmente em indivíduos obesos não são totalmente compreendidos. O seu promotor é influenciado por diferentes elementos regulatórios, especialmente aqueles envolvidos com a obesidade central, a inflamação e a síndrome metabólica, características usualmente presentes no desenvolvimento de DM2 (Boronat et al. 2009; De Taeye et al. 2005; Perez-Martinez et al. 2008).

Os resultados de associação do polimorfismo *PAI-1* rs1799768 com complicações tromboticas quer sejam macrovasculares (arteriais ou venosas) ou microvasculares são bastante contraditórios, sendo que alguns apontam um efeito deletério, enquanto que outros ou não encontram efeito algum, ou até encontram um efeito protetor para os portadores do alelo 4G (Ajjan & Ariens 2009; Bersano et al. 2008). Estes efeitos contraditórios provavelmente ocorrem porque o nível de PAI-1 é fortemente influenciado por outros componentes (Boronat et al. 2009; De Taeye et al. 2005; Perez-Martinez et al. 2008). Além disso, também tem sido destacado o seu papel na remodelação da matriz extracelular do endotélio vascular (Brazionis et al. 2008; Brosius 2008; Rerolle et al. 2008) o que pode ser responsável principalmente por alterações que envolvem a microvasculatura de órgãos que necessitam grande perfusão.

Em pacientes com DM2 tem sido demonstrada uma elevação no nível basal de PAI-1 que pode ser decorrente da disfunção endotelial, obesidade ou inflamação, que são característicos nestes pacientes (Erem et al. 2005). Em relação ao polimorfismo *PAI-1* rs1799768, alguns estudos têm conseguido demonstrar um aumento no risco de DCV, embora apresentem um resultado contraditório para a retinopatia na mesma população (Brazionis et al. 2008). Por outro lado, existem outros que não fornecem evidências de associação do polimorfismo *PAI-1* rs1799768 com qualquer complicação micro ou macrovascular quando estudam pacientes com DM2, mas demonstram associação com o grupo de não diabéticos do genótipo 4G4G e DCV (Saely et al. 2008) sugerindo que o ambiente onde o polimorfismo atua pode estar influenciando na sua expressão.

1.4.8 Integrina beta 3 e o polimorfismo *ITGB3* rs5918

O gene *ITGB3* está localizado no cromossomo 17q21-23 e codifica para uma glicoproteína integral de membrana conhecida como integrina beta 3 (*ITGB3*), glicoproteína plaquetária IIIa (*GPIIIa*) ou antígeno CD61. Esta glicoproteína forma um complexo na membrana plaquetária com a glicoproteína plaquetária IIb (*GPIIb*) conhecida também como integrina alfa 2 (*ITGA2B*) ou ainda, antígeno CD41. O complexo formado por essas duas cadeias é expresso na membrana plaquetária como o receptor *GPIIb-GPIIIa* e tem função ligante para o FvW e principalmente para o fibrinogênio sendo essencial na

agregação e adesão plaquetárias no início do processo hemostático (Bajt et al. 1992; Calvete 1994; Calvete 1995; Naik et al. 1997).

O polimorfismo *ITGB3* rs5918 apresenta uma mutação de sentido trocado na posição 176 que envolve a substituição de uma timina por uma citosina (176T>C). A consequência desta alteração é a substituição de uma prolina por uma leucina na posição 59 (P59L) do propeptídeo da integrina beta 3. Assim, portadores do genótipo 176TT codificam os propeptídeos da integrina beta 3 do tipo 59P, os do genótipo 176TC codificam ambos tipos de peptídeos: 59P e 59L; enquanto que os do genótipo 176CC codificam somente o peptídeo do tipo 59L. Estudos envolvendo estas variantes indicam que os diferentes genótipos e seus respectivos peptídeos apresentam diferenças imunológicas o que sugere uma alteração estrutural e provavelmente funcional neste receptor (Stafford et al. 2008). Em uma recente revisão, foi proposto que os portadores do genótipo 176CC e que, portanto, só apresentam o peptídeo ITGB3 com leucina na posição 59, apresentam uma maior expressão e ativação do receptor de fibrinogênio GPIIb-IIIa, principalmente em presença de um ambiente vascular inflamatório. Nesta situação, as plaquetas se encontrariam previamente ativadas e na presença de um receptor com maior poder de agregação e adesão plaquetárias contribuiriam para um estado protrombótico nos portadores do alelo 176C (Vijayan et al. 2006).

Estudos envolvendo o alelo C do *ITGB* rs5918 como fator de risco para complicações macrovasculares tanto encontram associação positiva (Bersano et al. 2008; Oksala et al. 2007; Tschoepe et al. 2003) como também ausência de associação (Carter et al. 1998; Kozieradzka et al. 2007; Marz et al. 2004) ou até mesmo resultados que são marginais a significância (Knowles et al. 2007).

1.4.9 Hiperhomocisteinemia e o polimorfismo da *MTHFR* rs1801133

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) é codificada por um gene de mesmo nome (*MTHFR*) localizado no cromossomo 1p36.3 com aproximadamente 17 Kb incluindo 11 éxons (Gaughan et al. 2000; Goyette et al. 1998). Esta enzima está envolvida no metabolismo da homocisteína, sendo responsável por catalisar a conversão de 5,10-

metiletetrahidrofolato para 5-metilenotetrahidrofolato, o qual é o co-substrato para a remetilação da homocisteína em metionina. Uma falha neste mecanismo diminui a remetilação da homocisteína levando ao seu acúmulo na circulação, uma condição conhecida como hiperhomocisteinemia que está associada com um risco aumentado de doenças vasculares (Kang et al. 1991; Kang et al. 1988).

O polimorfismo *MTHFR* rs1801133 é responsável pela substituição de uma citosina por uma timina na posição 677 (677C>T) o que provoca na enzima a substituição do aminoácido alanina por uma valina na posição 222 (A222V). Essa alteração está envolvida com a termoestabilidade da enzima *MTHFR*. Assim, indivíduos com o genótipo 677CC e 677CT apresentam enzimas termoestáveis, enquanto que os indivíduos 677TT apresentam enzimas termolábeis e como consequência tendem a acumular homocisteína na circulação (Frosst et al. 1995). Entretanto, estudos posteriores mostraram que a disponibilidade de folato na alimentação bem como dos cofatores envolvidos, as vitaminas B6 e B12 podem alterar este quadro mesmo em presença da variante genética 677TT (Carmel et al. 2003; Voetsch & Loscalzo 2004).

Enquanto alguns estudos do polimorfismo *MTHFR* rs1801133 apresentam associação do alelo de risco 677T com DCV (Sun et al. 2005), DAP (Pollex et al. 2005) e com AVC (Hermans et al. 2006), outros não encontram associação com qualquer desfecho macrovascular (Rahimi et al. 2009), mesmo quando o genótipo 677TT é correlacionado positivamente com uma condição de hiperhomocisteinemia (Tavakkoly Bazzaz et al. 2009).

Em pacientes com DM2 brasileiros, a presença do genótipo 677TT do polimorfismo *MTHFR* rs1801133 não foi associado positivamente com o risco de desenvolver RD (Errera et al. 2006; Santos et al. 2003), embora tenha ocorrido o contrário quando um estudo semelhante foi realizado com DM2 em japoneses (Maeda et al. 2008). Em uma revisão, usando meta-análise, os autores salientam a existência de poucos trabalhos, mas sugerem que o genótipo 677TT possa, de fato, apresentar um risco para a RD (Zintzaras et al. 2005).

Capítulo 2: Objetivos

Capítulo 2: Objetivos

O DM e suas complicações crônicas representam uma questão de saúde pública de grande impacto ao nível mundial, devido aos elevados custos e à crescente prevalência. A principal causa de morbidade e mortalidade nesta doença está relacionada com as complicações crônicas do tipo micro e/ou macrovasculares. Vários fatores de risco são estudados e estão associados com o desenvolvimento das complicações crônicas, entretanto o estudo das variantes genéticas relacionadas com a hemostasia é raro. A identificação dos polimorfismos associados com as complicações poderá ser relevante no prognóstico da doença, uma vez que poderão servir para prever o risco das diferentes complicações micro e macrovasculares. Assim, os objetivos podem ser sumariados como segue:

Objetivo Geral

Investigar a associação entre alguns polimorfismos genéticos do sistema hemostático e o desenvolvimento de complicações crônicas microvasculares e macrovasculares em pacientes com DM2.

Objetivos específicos

- Investigar a influência dos polimorfismos *FGB* rs1800790; *F2* rs1799963; *F5* rs6025; *F7* rs5742910; *F13A1* rs5985; *PLAT* rs4646972; *PAI-1* rs1799768; *ITGB3* rs5918 e *MTHFR* rs1801133 no desenvolvimento das complicações microvasculares (RD, ND e NSD) em pacientes com DM2;
- Investigar a influência dos polimorfismos *FGB* rs1800790; *F2* rs1799963; *F5* rs6025; *F7* rs5742910; *F13A1* rs5985; *PLAT* rs4646972; *PAI-1* rs1799768; *ITGB3* rs5918 e *MTHFR* rs1801133 no desenvolvimento das complicações macrovasculares (CI, AVCI e DAP) em pacientes com DM2.

Capítulo 3: Artigo 1

Manuscrito a ser submetido

Hemostatic gene polymorphisms and macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus

Hemostatic gene polymorphisms and macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus

Alexandre Rieger¹, Eliane Bandinelli², Carolina Kretschmer Luft¹, Clara Forrer Charlier¹, Jorge Luiz Gross³, Lavínia Schuler-Faccini², Roberta Petry Gorziza², Luís Henrique Canani³,

¹Laboratório de Biotecnologia e Genética, Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS Brasil

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS Brasil

³Divisão de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS Brasil

Correspondence:

Profa. Lavínia Schuler-Faccini

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15031 - Agência Campus UFRGS

CEP 91501-970, Porto Alegre – RS

Fone: 55 51 2101-8008 / 55 51 3316-6727

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Abstract

Background and objective: Patients with type 2 diabetes mellitus present a prothrombotic picture and a risk of developing macrovascular complications between 2 and 3 times as high as that exhibited by non-diabetic patients. The present study assesses the effects of polymorphisms involved in hemostasis, such as the risk of developing macrovascular complications.

Methods: A case-control study was carried out in 404 unrelated T2DM patients of European descent participating in a multicenter study in southern Brazil. The outcomes investigated were ischemic heart disease (IHD), ischemic stroke (IS) and peripheral artery disease (PAD). The polymorphisms studied were *FGB* rs1800790, *F2* rs1799963, *F5* rs6025, *F7* rs5742910, *F13A1* rs5985, *PLAT* rs4646972, *PAI-1* rs1799768, *ITGB3* rs5918 and *MTHFR* rs1801133. Individuals were genotyped using the polymerase chain reaction (PCR) protocol. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among cases and controls were done using χ^2 tests. Whenever statistically significant association with outcome was found in univariate analysis, this variable was included in regression analysis. Poisson regression with robust variance adjusted for confounding variables was used to estimate prevalence ratio (PR) and confidence intervals (IC).

Results: Of the nine polymorphisms studied, only *ITGB3* rs5918 presented a significant association in the univariate analysis between the risk allele 176C and the outcomes IS ($P = 0.004$) and PAD ($P = 0.025$). The Poisson regression with robust variance adjusted for confounding variables confirmed the results of the association for IS only in the dominant model ($P = 0.022$), while for PAD a significant association occurred both for the dominant model ($P = 0.026$) as well as for the recessive model ($P = 0.002$).

Conclusion: The polymorphism *ITGB3* rs5918 is associated with a significant risk for T2DM patients to develop IS and PAD.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, macrovascular complication, hemostasis, *ITGB3*

Introduction

The central pathological mechanism in macrovascular disease is the process of atherosclerosis, which leads to narrowing of arterial walls throughout the body. This process results from chronic inflammation and injury to the arterial wall in the peripheral or coronary vascular system [1]. Endothelial dysfunction, inflammation and increased coagulation also play a crucial role in the atherothrombotic process [2]. T2DM patients have a high risk of developing atherothrombotic disorders that affect the coronary, cerebral and peripheral arterial trees. Diabetic patients with clinical atherosclerosis disease have a worse prognosis than matched patients without DM. For example, the risk of myocardial infarction (MI) is 3.5 times higher in T2DM patients than in other subjects without diabetes. Therefore, T2DM can be also known as a prothrombotic condition with hypercoagulable state and hypofibrinolytic [3, 4].

The hemostatic system consists of a fluid phase (coagulation and fibrinolysis), a cellular phase (predominantly platelets and endothelial cells with contributions from macrophage / monocytes and other cells) and a system of receptors and binding proteins that localize thrombus formation [3]. Environmental factors play a key role in the predisposition to atherothrombotic disease and also in hypercoagulability state in diabetic patients. However, both the predisposing genetic factors and environmental factors can unbalance hemostatic system and therefore increase the risk of macrovascular complications [2, 5-7].

Polymorphisms of several individual genes involved in the biochemical pathways of hemostasis have been associated with increased risk of thrombosis and clinical ischemic events [2]. Thus, polymorphisms with a clearly demonstrated risk of thrombophilia are the mutation of factor V Leiden (rs6025) or R506Q; the mutation in the position 20210G>A (rs1799963) of the prothrombin gene in the 3'-untranslated region and the mutation 677C>T (rs1801133) in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene [8, 9]. The polymorphism of *MTHFR* 677C>T has been studied in T2DM patients associated with PAD, stroke and CVD, but results are contradictory in many studies [10-14].

Several polymorphisms of the hemostatic system have become the target of the studies to different macroangiopathies. Gene polymorphisms of the coagulation system such as the transition -455G>A of the beta chain fibrinogen gene [*FGB* -455G>A

(rs1800790)]; factor VII [FVII -323del(10bp)ins (rs5742910)] and factor XIII [FXIII Val34Leu (rs5985)] result in quantitative and/or qualitative changes in the activity of the affected factors and might be genetic risk factors for CVD, PAD and stroke [15-21]. Polymorphisms in fibrinolytic genes and platelet receptor glycoprotein genes might also predispose subjects to increased clotting or impaired fibrinolysis [22]. Tissue plasminogen activator (tPA) is the main activator of the fibrinolytic system, while plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is the main inhibitor of the same system. While tPA catalyzes the conversion of plasminogen to the active enzyme plasmin which trigger the fibrinolytic process, PAI-1 inhibits activation of the key-enzyme plasmin and thus the subsequent fibrin degradation [23, 24]. Several studies about polymorphisms of the *tPA* gene [*PLAT* or *tPA* ins(311bp)del (rs4646972)] and *PAI-1* [*SERPINE1* or *PAI-1* -675 5G/4G (rs1799768)] have been performed aiming to investigate the association genetics variants and CVD, PAD, stroke and other vascular complications, but presented conflicting results [17, 19, 24-27]. The platelet glycoprotein IIb-IIIa complex is a receptor of the integrin family, which plays a role in platelet activation and binding to fibrinogen. The *ITGB3* gene encodes for glycoprotein IIIa (integrin beta 3) and has a polymorphism due to the nucleotide T to C substitution in position 176 [*ITGB3* 176T>C (rs5918)], which results in the amino acid substitution Pro59Leu that in turn determines a conformational change of the receptor [17, 28-30]. Studies about this polymorphism (*ITGB3* rs5918) revealed a weak association or borderline significance with stroke, PAD, CVD and macrovascular disease [17, 31-34].

Therefore, establishing the exact contribution of a genetic factor to the development of the macrovascular complication in T2DM is difficult due to the multifactorial nature of this condition and to the complex gene-gene and gene-environment interactions. This study evaluates the association of genetic polymorphisms involved in the hemostatic balance that may contribute to increased risk of macrovascular complication in patients with T2DM.

Materials and methods

Study population

A case-control study was carried out in 404 unrelated T2DM patients participating in a multicenter study that started recruiting regularly since 2002 in southern Brazil [35]. The project aimed to study risk factors for chronic complications of DM. The patient

sample consisted of white subjects, descendant mainly from Portugal, Spain, Italy and Germany. T2DM was diagnosed as the occurrence of diabetes after the age of 30 years with no use of insulin during the first year after diagnosis and no previous episodes of ketoacidosis [36].

Cases were defined in terms of the presence of the macrovascular complication and were stratified into three outcomes: ischemic heart disease (IHD) (n = 171), PAD (n= 127) and ischemic stroke (IS) (n= 63). Controls were defined as patients with known T2DM duration of at least 5 years after diagnosed and without PAD, IHD and IS.

All patients participating in this study gave their written informed consent. The study protocol was approved by the hospital ethics committee.

Classification for macrovascular complications

IHD was diagnosed as the presence of angina pectoris or possible myocardial infarction according to the World Health Organization (WHO) Cardiovascular Questionnaire [37] and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities [Minnesota Code: Q and QS patterns (1.1-2, 1.3); S-T junction (J) and segment depression (4.1-4); T-wave items (5.1-3) and complete left bundle branch block (7.1)] [38], and/or the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration. Patients presenting any change in the evaluation criteria above were considered to have IHD [39]. PAD was defined as clinical macroangiopathy (no pulses) present during a foot examination or a medical history of symptoms typical of intermittent claudication. IS was considered present if diagnosed according to medical records or if pathological findings were observable by computed tomography or magnetic resonance imaging.

Laboratorial Evaluation and other parameters

The ethnic group was defined based on self-classification and subjective classification (skin color, nose and lip shapes, hair texture, and information about family ancestry). A standard questionnaire was used to collect information about age, age at DM diagnosis, and drug treatment. T2DM patients underwent physical and laboratory evaluations. Patients were weighed without shoes and in light outdoor clothes, and had their height measured by standard procedures. Body mass index (BMI) was calculated as

weight (kg)/ height² (m²). Waist circumference was obtained at the mid-point between the last rib and the antero-superior iliac spine, parallel to the floor, with a nondistensible measuring tape. Blood pressure (BP) was measured twice after a 5-min rest in the sitting position using a mercury sphygmomanometer (Korotkoff phases I and V). The mean value of two measurements was used to calculate systolic and diastolic BP. Hypertension was defined as BP levels \geq 140/90 mm Hg, or if the patient was taking anti-hypertensive drugs.

A serum sample was collected after a 12-h fasting period for laboratory analyses. Glucose levels were determined using the glucose oxidase method; creatinine by the Jaffé reaction; glycated hemoglobin (GHb) by an ion-exchange HPLC procedure (Merck-Hitachi L-9100 GHb Analyser, Merck, Darmstadt, Germany; reference range: 4.7-6.0%), total plasma cholesterol and triglycerides by enzymatic methods, and albuminuria by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria, Bayer, Tarrytown, NY, USA; with mean intra- and interassay coefficients of variance of 4.5 and 7.6%, respectively).

Genotyping and nomenclature

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standardized salting-out procedure [40]. Nine hemostatic gene polymorphisms were evaluated as listed in Table 1.

Polymorphism genotyping was carried out by polymerase chain reaction (PCR). PCR was used to identify the polymorphisms rs4646972 [41] of the *PLAT* gene and rs5742910 [42] of factor VII. Amplicons thus obtained were visualized under UV light on agarose gels 2% and polyacrylamide gels 6%, respectively. The genotyping of the polymorphism rs1799768 [25] of the *PAI-1* gene was conducted according to the allele-specific PCR. The other polymorphisms rs1800790 [43] of the *FGB* gene; rs1799963 [44] of the *F2* gene; rs6025 [45] of the *F5*; rs5918 [30] of the *ITGB3* and rs 1801133 [46] of the *MTHFR* gene were also identified using PCR and specific enzyme digestion (PCR-RFLP) and visualization in polyacrylamide gel 6%. All reactions are performed in duplicate.

Statistical Analysis

Clinical and laboratorial continuous variables with normal distribution were compared between groups using the Student's t test, whereas variables with skewed distribution were compared using the Mann-Whitney U-test. Non-continuous variables were evaluated by the χ^2 test. Data are presented as mean \pm standard deviation or

percentage. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Allelic frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were assessed using χ^2 tests. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among cases and controls were evaluated using χ^2 tests. Recessive and dominant models to risk allele also were evaluated for polymorphisms using χ^2 tests.

Whenever statistically significance association with outcome was found in univariate analysis, this variable was included Poisson regression with robust variances, which was used to assess the genotype, allelic frequency and genotype combination of risk with the outcomes. The potentially confounding variables were also included in the regression model. Prevalence ratio (PR) was used to estimate confidence intervals because the Poisson regression with robust variances narrows confidence intervals and estimates the control of error overestimation in the binomial data when a study is performed about frequent diseases (>10%) [47-49].

Results

The main clinical features of T2DM patients stratified according to the presence or absence of outcome (IHD, PAD, IS) are shown in Table 2. HDL level of IHD patients (47.5%) were significantly lower as compared to control patients. Nevertheless, T2DM duration increased in those patients, as well as serum creatinine levels. In IS patients (18.6%), age, waist circumference, serum creatinine, systolic BP and hypertension presented increased levels. In PAD (38.7%), patients presented a significant increase in T2DM duration, serum creatinine and triglycerides. On the other hand, GHb level and BMI exhibited low values.

Table 3 shows the distribution of allele frequencies and of the genotypes of the polymorphisms studied. All polymorphisms satisfied the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) in the control samples, in which T2DM patients were considered with no macrovascular condition (data not shown). For the outcome IHD, no polymorphism presented significant difference of allele or genotype frequencies between cases and controls. However, for the outcomes IS and PAD, polymorphism rs5918 of the *ITGB3* gene presented increased allele C (considered a risk allele) frequencies in cases as compared to control patients. This led to significant differences in the frequency of the risk

allele (IS, $P = 0.004$; PAD, $P = 0.025$) and in the distribution of genotypes (IS, $P = 0.019$; PAD, $P = 0.037$). All polymorphisms were tested using the univariate statistic in both the dominant and the recessive models, considering the risk allele. Only the rs5918 polymorphism of the *ITGB3* gene presented significant differences (data not shown).

Table 4 shows the results of the Poisson Regression analyses with robust variance adjusted for the confounding variables, which was used to estimate the PR of patients with the outcomes IS and PAD in relation to the rs5918 polymorphism of the *ITGB3* gene. When the PR of the heterozygous genotype TC and of the homozygous genotype CC are compared against the reference homozygous genotype TT, it was observed that only for IS the TC heterozygous genotypes are increased in number [PR = 2.04 (1.11-3.73)], while for PAD it is the CC homozygous genotypes that exhibited significant increase in occurrence [PR = 1.90 (1.29-2.81)]. The allele C of the *ITGB3* rs5918 polymorphism was tested for the dominant model (TC + CC vs. TT) and recessive (CC vs. CT + TT) model in the two outcomes where significant association was observed. For the outcome IS, a significant PR [PR = 1.97 (1.10-3.52)] was observed only in the dominant model, while as regards the outcome PAD, PR was significant both in the dominant [PR = 1.41 (1.04-1.91)] and recessive [PR = 1.80 (1.24-2.61)] models.

Discussion

Hemostasis polymorphisms are extensively studied as risk factors for CVD, stroke and thrombosis [9]. As T2DM involves a prothrombotic stage, it is important to evaluate the influence of these polymorphisms in this disease [3]. The present study assessed 9 polymorphisms involved in different hemostasis and fibrinolysis stages, and the respective relationships with the outcomes IHD, IS, and PAD. Of the polymorphisms studied, only *ITGB3* rs5918 presented an association with outcomes IS and PAD.

Polymorphisms without association to macrovascular complication in the present study

The classical thrombophilic polymorphisms, FV Leiden (FV rs6025), prothrombin 20210G>A (*F2* rs1799963) and *MTHFR* 677C>T (*MTHFR* rs1801133) were not associated to any of the outcomes studied. Similar results have been reported in other studies on coronary arterial disease [13, 14]. The polymorphisms FV rs6025 and *F2*

rs1799963 exhibited functional biochemical changes that increase the risks of venous thrombosis [9, 18], though studies on arterial thrombosis have presented conflicting results, possibly due to the fact that small samples were used regarding low-frequency polymorphisms or because the final phenotypic effect caused by the polymorphism is small in complex outcomes [6, 18, 22]. On the other hand, meta-analysis studies have suggested the association between these polymorphisms and CVD [20] and stroke, though these studies did not investigate T2DM patients exclusively.

While some studies addressing the *MTHFR* rs1801133 polymorphism associate the risk allele 677T to CVD [50], PAD [10] and stroke [12], other authors did not find any relationship with any macrovascular outcome [13] — similarly to the present study — even though the genotype 677TT has been demonstrated to correlate positively with a picture of hyperhomocysteinemia [51].

The fibrinogen polymorphism *FGB* rs1800790 is associated to a modest increase in the fibrinogen levels [52-54], although other factors, like inflammation and diabetes, may also contribute to this increase [2]. Studies with T2DM patients have reported the association of this polymorphism with CVD, though not with fibrinogen levels [55]. A study with Chinese T2DM patients revealed similar results as to CVD risk, demonstrating as well that fibrinogen levels were increased in the population screened [56]. Thus, it seems likely that fibrinogen levels may be influenced by other polymorphisms, which are not in a condition of linkage equilibrium [57, 58]. Concerning polymorphism *FGB* rs1800790, the results of the present study are similar to those observed with Caucasian T2DM patients in Slovenia. In that study, the authors likewise failed to report an association between the polymorphism and macrovascular complications [58].

The factor VII (*F7* rs5742910) and factor XIII (*F13A1* rs5985) polymorphisms have been studied as protection factors against macrovascular complications. The *F7* rs5742910 polymorphism is associated to a decrease in the transcription of FVII [42, 59] and consequently to a slower coagulation onset [60]. The 103T allele of polymorphism *F13A1* rs5985 is responsible for an increased lytic activity on the clot, and has been imputed as a protective factor against CVD ([2, 61]. In diabetic patients with no control treatment, lytic activity on clots is low, probably due to changes that involve fibrinogen glycation [62, 63]. Thus, a less active coagulation onset phase and more efficient lytic activity on the clot should be expected to lead to a lower risk of macrovascular

complications in T2DM. Nevertheless, the results of the present study do not back such expectation, probably because of the presence of other variables that could play a more determining role in the progression of macrovascular complications. Also, it is possible to hypothesize that the actual effect of these polymorphisms is marginal, when one looks at the whole set of the different reasons behind macrovascular complications [2, 22].

In the fibrinolytic system, the polymorphisms of *tPA* (*PLAT* rs464972) and of the *PAI-1* (*PAI-1* rs799768) genes were evaluated. No association with macrovascular conditions was observed for *PLAT* rs464972. Among the possible causes for this is that *PLAT* rs464972 is an intronic polymorphism and probably it is not functional, although pioneer studies have correlated it to the risk of myocardial infarction [64] and arterial coronary disease [25]. Yet, other authors have not observed similar findings [65]. Apart from this, this polymorphism is in linkage imbalance with other polymorphisms in the promoter [23], which may explain the variation observed in tPA blood levels in different cohort studies, although environment factors and the interaction with other genes may also be present [66]. On the other hand, *PAI-1* rs1799768 is a promoter area polymorphism, whose 4G allele has been associated to the increase in antigen PAI-1 levels in the blood flow of IS patients [67], in spite of the contradictory results observed in non-diabetic patients [27] and also in T2DM patients [68]. PAI-1 expression is not a simple process, since its promoter is influenced by different regulatory elements, especially those involved in central obesity, inflammation and metabolic syndrome, characteristics usually present in the T2DM progression [69-71]. Some studies have demonstrated the increase in CVD risk in T2DM patients, though results concerning retinopathy were conflicting in the same population [72]. In the present study, it was not possible to associate the *PAI-1* rs1799768 polymorphism to any of the outcomes investigated. This may be due to the interference of the diabetes background in PAI-1 expression, as already observed in a study with Caucasian patients, where the association between the genotype 4G4G and CVD was observed only in the non-diabetic subjects [73].

ITGB3 rs5918 polymorphism associated with IS and PAD

The *ITGB3* rs5918 polymorphism codifies for the glycoprotein IIIa of the platelet receptor GPIIb-IIIa for fibrinogen, involved mainly in the platelet adhesion stage. Changes in platelet aggregation and adhesion may be associated to the increased risk of vascular

complications [29, 74]. In the present study, the allele C presented a significant association to the outcomes IS ($P = 0.004$) and PAD ($P = 0.025$), though not to IHD. This polymorphism has been studied as a risk factor for microvascular [75] and macrovascular complications in different populations [17, 32, 33, 76] as well as in T2DM patients [31, 77-79].

Studies with T2DM patients have not demonstrated any association between the risk allele for macrovascular disease, especially CVD [31], coronary disease [79] and acute myocardial infarction [77]. These findings agree with the results of the present study, where no association between this polymorphism and IHD was observed ($P = 0.654$). Only one study with T2DM patients has reported a significant association between the risk allele and diabetic patients, in comparison to a healthy control population. This suggests that the allele is present at high frequencies in diabetic patients, due to the changes in metabolic and vascular conditions [78]. Another possible explanation for the absence of association of the allele with IHD may lie in the fact that several T2DM patients may suffer from other cardiovascular complications linked to the inflammatory and atherosclerotic picture, which contribute significantly to the progression of these complications and point to the multifactorial nature of these conditions [80].

The interpretation of the results of the association of allele C of the *ITGB3* rs5918 polymorphism with IS and PAD observed in the present study requires a different approach, since studies about outcomes in TDM2 patients have not been published. A meta-analysis of the studies of the genetic association with PAD has not identified any role played by *ITGB3* rs5918 in non-diabetic individuals [34]. However, other studies with non-diabetic individuals point to the borderline association with acute myocardial infarction [32] and stroke [17].

Since the *ITGB3* rs5918 polymorphism represents a missense 176T>C mutation that leads to the replacement of a proline molecule by a leucine molecule in the position 59 of the beta 3 integrin propeptide, it is possible to hypothesize over the occurrence of a functional defect in the platelet aggregation and adhesion function. Therefore, the genotype 176TT codifies for the beta 3 integrin propeptides 59PP, the genotype 176TC codifies for 59PL and the genotype 176CC codifies for 59LL. Studies about these variants indicate that the different genotypes and the respective peptides present immunologic differences that suggest a structural change and probably a functional change as well in this receptor [28].

In a recent review paper it was proposed that carriers of the 176CC genotype (59PP) present a higher activation of the fibrinogen receptor GPIIb-IIIa, which intensifies the prothrombotic state carriers of the allele 176C.

In our results, we observed an association between the allele 176C with PAD, both in the dominant ($P = 0.026$) and in the recessive ($P = 0.002$) models. When PR of CC homozygotes [PR = 1.90 (1.29-2.81)] and TC heterozygotes [PR = 1.25 (0.87-1.78)] are compared to reference homozygotes, a difference in magnitude is observed, which may indicate an additive effect of each copy of the allele 176C in T2DM patients, concerning this outcome. This indication agrees with what has been proposed in the physiological model that studied platelet activity involving the GPIIb-IIIa receptor, and that observed that activity in 59PL heterozygotes laid between the values observed in homozygotes 59PP and 59LL [29].

It is interesting to note that for IS, the risk allele was associated to the outcome only in heterozygotes. The lack of an association with 176CC homozygotes may be explained in the light of the fact that the present study investigated only T2DM patients. In this case, the information concerning the T2DM patients with hemorrhagic stroke is lost, a study group whose mortality rates are significantly higher in T2DM as compared to non-diabetic individuals [81, 82]. Apart from this, the currently available data indicate that IS in T2DM patients may not be appropriately diagnosed [81].

In diabetic patients, platelets present hyperactivation and hyperaggregation, and are thus involved in the development of vascular complications. Several factors contribute to this situation, such as atherosclerosis, changes in vascular endothelium and prothrombotic state [74, 83]. The cell-based model of hemostasis with three overlapping phases (initiation, amplification and propagation) plays a physiological role [84]. In this model, the platelet phase plays an important part in the vascular endothelium concerning the interaction with procoagulant, fibrinolytic and inflammatory soluble factors or in the cell phase. Therefore, abnormalities in structure and/or expression of proteins of the platelet surface may shift the hemostatic balance. In turn, this would increase the intensity of thrombotic effects, especially in scenarios with backgrounds that favor the prothrombotic and inflammatory state, as observed in T2DM patients. The inflammatory state also influences the platelet vascular endothelium actions, as well as other proteins involved in the coagulation and fibrinolytic phases [85]. This may alter the expression and/or the

conformation of platelet receptors, such as GPIIIa, which may become active and thus favor the linkage of fibrinogen to the vascular endothelium through other receptors, mediating the formation of the thrombus [29].

The importance of changed backgrounds lies in the resistance to antiplatelet agents (aspirin and clopidogrel) in T2DM patients. This increases the risk of ischemic events [86], which leads to the need to find new therapeutic targets, such as inhibitors of the receptor GPIIb-IIIa [87, 88]. Therefore, cell phase polymorphisms, such as *ITGB3* rs5918 should be considered risk factors not only in terms of outcome, but also concerning therapies, since variants in the GPIIb-IIIa receptor expressed in the platelet surface may alter the response to treatment. Apart from this, even in the situation that this polymorphism may play only a small role in a healthy individual, it is plausible to suppose that it may reflect a more serious defect in individuals whose background has been altered, as T2DM patients.

Conclusions

Hemostatic polymorphisms may not exert an intense influence on macrovascular complications, since several genetic variants depend on gene-gene and gene-environment interactions. Therefore, the individual effect of most hemostatic polymorphisms is modest, though the combined effect may be important as regards the end outcome. On the other hand, even a polymorphism with a marginal effect, such *ITGB3* rs5918, may present increased effect in a changed background, as in T2DM patients. The data obtained in the present study suggest that carriers of the risk allele 176C are at a higher risk of developing IS and PAD than T2DM patients without this allele.

Competing Interests/financial disclosure: Nothing to declare.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Israel Roisenberg, PhD for laying the grounds for the present work. This study was partially supported by Projeto de Núcleos de Excelência do Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

1. Fowler, M.J., *Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes*. Clinical Diabetes, 2008. **26** (2): p. 77-82.
2. Ajjan, R.A. and R.A. Ariens, *Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state*. Blood Rev, 2009. **23**(2): p. 67-78.
3. Grant, P.J., *Diabetes mellitus as a prothrombotic condition*. J Intern Med, 2007. **262**(2): p. 157-72.
4. Erem, C., et al., *Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications*. Med Princ Pract, 2005. **14**(1): p. 22-30.
5. Air, E.L. and B.M. Kissela, *Diabetes, the metabolic syndrome, and ischemic stroke: epidemiology and possible mechanisms*. Diabetes Care, 2007. **30**(12): p. 3131-40.
6. Martinelli, N., et al., *Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1523.
7. Faber, D.R., P.G. de Groot, and F.L. Visseren, *Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis*. Obes Rev, 2009. **10**(5): p. 554-63.
8. Slavik, L., et al., *Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2009. **153**(1): p. 19-25.
9. Lane, D.A. and P.J. Grant, *Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1517-32.
10. Pollex, R.L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2005. **4**: p. 17.
11. Ndrepepa, G., et al., *Circulating homocysteine levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008. **18**(1): p. 66-73.

12. Hermans, M.P., J.L. Gala, and M. Buysschaert, *The MTHFR CT polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes*. *Diabet Med*, 2006. **23**(5): p. 529-36.
13. Rahimi, Z., et al., *Factor V G1691A, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T are not associated with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus in western Iran*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009. **20**(4): p. 252-6.
14. Wakim-Ghorayeb, S.F., et al., *Factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single-nucleotide polymorphisms in type 2 diabetes mellitus*. *Am J Hematol*, 2005. **80**(1): p. 84-6.
15. Grant, P.J. and S.E. Humphries, *Genetic determinants of arterial thrombosis*. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 1999. **12**(3): p. 505-32.
16. Voetsch, B. and J. Loscalzo, *Genetic determinants of arterial thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(2): p. 216-29.
17. Bersano, A., et al., *Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke*. *Hum Mutat*, 2008. **29**(6): p. 776-95.
18. Dahlback, B., *Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders*. *Blood*, 2008. **112**(1): p. 19-27.
19. Smith, N.L., et al., *Variation in 24 hemostatic genes and associations with non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(1): p. 45-53.
20. Ye, Z., et al., *Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls*. *Lancet*, 2006. **367**(9511): p. 651-8.
21. Barakat, K. and G.A. Hitman, *Genetic susceptibility to macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001. **15**(3): p. 359-70.
22. Auro, K., et al., *Combined effects of thrombosis pathway gene variants predict cardiovascular events*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(7): p. e120.
23. Ladenvall, P., et al., *Genetic variation at the human tissue-type plasminogen activator (tPA) locus: haplotypes and analysis of association to plasma levels of tPA*. *Eur J Hum Genet*, 2003. **11**(8): p. 603-10.

24. Robinson, S.D., et al., *Tissue plasminogen activator genetic polymorphisms do not influence tissue plasminogen activator release in patients with coronary heart disease*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(10): p. 2262-9.
25. Mansfield, M.W., M.H. Stickland, and P.J. Grant, *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes*. *Thromb Haemost*, 1995. **74**(4): p. 1032-4.
26. Tsantes, A.E., et al., *The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk*. *Thromb Res*, 2008. **122**(6): p. 736-42.
27. Jood, K., et al., *Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke*. *Stroke*, 2005. **36**(10): p. 2077-81.
28. Stafford, P., et al., *Immunologic and structural analysis of eight novel domain-deletion beta3 integrin peptides designed for detection of HPA-1 antibodies*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(2): p. 366-75.
29. Vijayan, K.V. and P.F. Bray, *Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(5): p. 505-13.
30. Weiss, E.J., et al., *A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(17): p. 1090-4.
31. Carter, A.M., M.W. Mansfield, and P.J. Grant, *Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus*. *Diabet Med*, 1998. **15**(4): p. 315-9.
32. Knowles, J.W., et al., *Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction*. *Am Heart J*, 2007. **154**(6): p. 1052-8.
33. Oksala, N.K., et al., *Smoking and the platelet fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa PlA1/A2 polymorphism interact in the risk of lacunar stroke and midterm survival*. *Stroke*, 2007. **38**(1): p. 50-5.
34. Zintzaras, E. and N. Zdoukopoulos, *A field synopsis and meta-analysis of genetic association studies in peripheral arterial disease: The CUMAGAS-PAD database*. *Am J Epidemiol*, 2009. **170**(1): p. 1-11.

35. Kramer, C.K., et al., *Risk factors for micro and macrovascular disease in black and white patients with type 2 diabetes mellitus*. Rev Assoc Med Bras, 2009. **55**(3): p. 308-14.
36. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2009. **32 Suppl 1**: p. S62-7.
37. Rose, G.A., et al., *Cardiovascular Survey Methods*, World Health Organization, Geneva. 1982.
38. Beck, M.O., et al., *Asymptomatic coronary artery disease is associated with cardiac autonomic neuropathy and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 1999. **22**(10): p. 1745-7.
39. dos Santos, K.G., et al., *The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes*. Mol Genet Metab, 2005. **85**(2): p. 149-56.
40. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
41. Ludwig, M., et al., *Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event*. Hum Genet, 1992. **88**(4): p. 388-92.
42. Humphries, S., et al., *Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant*. Thromb Haemost, 1996. **75**(4): p. 567-72.
43. Thomas, A.E., et al., *The association of combined alpha and beta fibrinogen genotype on plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers*. J Med Genet, 1995. **32**(8): p. 585-9.
44. Poort, S.R., et al., *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3698-703.
45. Bertina, R.M., et al., *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 64-7.
46. Frosst, P., et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 111-3.

47. Wolkewitz, M., T. Bruckner, and M. Schumacher, *Accurate variance estimation for prevalence ratios*. *Methods Inf Med*, 2007. **46**(5): p. 567-71.
48. Behrens, T., et al., *Different methods to calculate effect estimates in cross-sectional studies. A comparison between prevalence odds ratio and prevalence ratio*. *Methods Inf Med*, 2004. **43**(5): p. 505-9.
49. Barros, A.J. and V.N. Hirakata, *Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio*. *BMC Med Res Methodol*, 2003. **3**: p. 21.
50. Sun, J., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients*. *Mol Cell Endocrinol*, 2005. **229**(1-2): p. 95-101.
51. Tavakkoly Bazzaz, J., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in diabetes and obesity*. *Mol Biol Rep*, 2009.
52. Coulam, C.B., et al., *Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis*. *Am J Reprod Immunol*, 2008. **60**(5): p. 426-31.
53. Renner, W., et al., *G-455A polymorphism of the fibrinogen beta gene and deep vein thrombosis*. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32**(10): p. 755-8.
54. Liu, Y., et al., *Beta-fibrinogen haplotypes and the risk for cardiovascular disease in a dialysis cohort*. *Am J Kidney Dis*, 2005. **46**(1): p. 78-85.
55. Carter, A.M., et al., *Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(11): p. 1265-8.
56. Lam, K.S., et al., *Beta-fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes*. *Diabetologia*, 1999. **42**(10): p. 1250-3.
57. Morozumi, T., A. Sharma, and E. De Nardin, *The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the beta-fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms*. *Immunol Invest*, 2009. **38**(3-4): p. 311-23.
58. Poglajen, G., J. Kirbis, and A. Milutinovic, *The -455G/A polymorphism of the beta fibrinogen gene and the Bgl II polymorphism of the alpha2beta1 integrin gene and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes*. *Folia Biol (Praha)*, 2004. **50**(6): p. 203-4.

59. Sabater-Lleal, M., et al., *Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene promoter*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. 262-8.
60. Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers, *Integrins in platelet activation*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7 Suppl 1**: p. 206-9.
61. Gemmati, D., et al., *Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients*. *Mol Med*, 2007. **13**(1-2): p. 112-20.
62. Dunn, E.J., et al., *Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2006. **49**(5): p. 1071-80.
63. Pieters, M., et al., *Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes - a purified fibrinogen model*. *Thromb Haemost*, 2008. **99**(4): p. 691-700.
64. van der Bom, J.G., et al., *Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction. The Rotterdam Study*. *Circulation*, 1997. **95**(12): p. 2623-7.
65. Ridker, P.M., et al., *Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(9): p. 1687-90.
66. Asselbergs, F.W., et al., *Genetic architecture of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1*. *Semin Thromb Hemost*, 2008. **34**(6): p. 562-8.
67. van Goor, M.L., et al., *The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(1): p. 92-6.
68. Zietz, B., et al., *Allelic frequency of the PAI-1 4G/5G promoter polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and lack of association with PAI-1 plasma levels*. *Endocr Res*, 2004. **30**(3): p. 443-53.
69. Perez-Martinez, P., et al., *The -675 4G/5G polymorphism at the Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) gene modulates plasma Plasminogen Activator Inhibitor 1 concentrations in response to dietary fat consumption*. *Br J Nutr*, 2008. **99**(4): p. 699-702.
70. De Taeye, B., L.H. Smith, and D.E. Vaughan, *Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2005. **5**(2): p. 149-54.

71. Boronat, M., et al., *Use of confirmatory factor analysis for the identification of new components of the metabolic syndrome: the role of plasminogen activator inhibitor-1 and Haemoglobin A1c*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(4): p. 271-6.
72. Brazionis, L., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(4): p. 786-91.
73. Saely, C.H., et al., *Type 2 diabetes significantly modulates the cardiovascular risk conferred by the PAI-1 -675 4G/5G polymorphism in angiographed coronary patients*. *Clin Chim Acta*, 2008. **396**(1-2): p. 18-22.
74. Vinik, A. and M. Flemmer, *Diabetes and macrovascular disease*. *J Diabetes Complications*, 2002. **16**(3): p. 235-45.
75. Tsai, D.H., et al., *Platelet collagen receptor alpha2beta1 integrin and glycoprotein IIIa PI(A1/A2) polymorphisms are not associated with nephropathy in type 2 diabetes*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **38**(6): p. 1185-90.
76. Ridker, P.M., et al., *PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis*. *Lancet*, 1997. **349**(9049): p. 385-8.
77. Koziarzka, A., et al., *The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa gene*. *Acta Diabetol*, 2007. **44**(1): p. 30-3.
78. Tschoepe, D., et al., *Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with Type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2003. **46**(7): p. 984-9.
79. Marz, W., et al., *The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with the risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study*. *Diabetologia*, 2004. **47**(11): p. 1969-73.
80. Jax, T.W., et al., *Hemostatic risk factors in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes - a two year follow-up of 243 patients*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. **8**: p. 48.
81. Hatzitolios, A.I., et al., *Diabetes mellitus and cerebrovascular disease: which are the actual data?* *J Diabetes Complications*, 2009. **23**(4): p. 283-96.
82. Mukherjee, D., *Peripheral and cerebrovascular atherosclerotic disease in diabetes mellitus*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009. **23**(3): p. 335-45.

83. El Haouari, M. and J.A. Rosado, *Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **41**(1): p. 119-23.
84. Vine, A.K., *Recent advances in haemostasis and thrombosis*. Retina, 2009. **29**(1): p. 1-7.
85. Schafer, A. and J. Bauersachs, *Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis*. Curr Vasc Pharmacol, 2008. **6**(1): p. 52-60.
86. Angiolillo, D.J. and S. Suryadevara, *Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(3): p. 375-88.
87. Stoll, G., C. Kleinschnitz, and B. Nieswandt, *Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment*. Blood, 2008. **112**(9): p. 3555-62.
88. Seitz, R.J. and M. Siebler, *Platelet GPIIb/IIIa receptor antagonists in human ischemic brain disease*. Curr Vasc Pharmacol, 2008. **6**(1): p. 29-36.

Table 1. Polymorphisms evaluated in present study

Gene	rs	Allelic variation	Localization	Usual name
<i>FGB</i>	rs1800790	-445 G>A	promoter	β chain fibrinogen
<i>F2</i>	rs1799963	20210 G>A	3'UTR	Prothrombin
<i>F5</i>	rs6025	1691 G>A	R506Q	Factor V leiden
<i>F7</i>	rs5742910	-323 del/ins(10bp)	promoter	Factor VII
<i>F13A1</i>	rs5985	103G>T	V35L	Factor XIII
<i>PLAT</i>	rs4646972	Ins/del 311bp	Intron 8	tPA or PLAT
<i>PAI-1</i>	rs1799768	-675 5G/4G	promoter	PAI-1 or SERPINE1
<i>ITGB3</i>	rs5918	176T>C	L59P	GPIIIa
<i>MTHFR</i>	rs1801133	677C>T	A222V	MTHFR

Table 2. Clinical characteristics of type 2 diabetes patients according to macrovascular complications

	IHD			IS			PAD		
	(n = 366)		P	(n = 360)		P	(n =331)		P
	Controls	Cases		Controls	Cases		Controls	Cases	
Patients (%)	52.5	47.5		81.4	18.6		61.3	38.7	
Gender (% male)	47.4	55.2	0.17	50.2	47.8	0.83	47.3	51.6	0.52
Age (Years)	61.1±8.9	61.8±9.2	0.49	61.1±9.0	63.5±9.0	0.09	61.3±8.9	61.8±8.6	0.57
T2DM duration (years)	14.1±8.4	16.8±8.4	0.00	15.6±8.4	16.2±10.2	0.92	14.9±7.9	17.5±9.2	0.01
Fasting Glucose (mg/dL)	169.2±68.0	166.0±72.0	0.55	171.6±70.8	160.8±71.3	0.25	173.3±65.9	170.9±80.0	0.24
GHb (%)	6.7±1.8	6.6±1.7	0.73	6.7±1.7	6.8±1.7	0.50	6.9±1.8	6.3±1.6	0.01
BMI (Kg/m²)	28.3±4.8	27.8±4.6	0.44	28.3±5.2	28.1±4.5	0.87	28.5±4.6	27.3±4.5	0.02
Waist Circumference (cm)	97.5±11.7	98.6±10.9	0.44	97.9±11.7	100.8±10.6	0.05	98.9±10.7	95.8±13.0	0.13
Serum Creatinine (µmol/L)	1.6±1.9	2.0±2.3	0.01	1.6±1.9	2.4±2.7	0.00	1.4±1.7	2.3±2.5	0.00
Total Cholesterol (mmol/L)	203.7±43.7	212.4±47.5	0.13	207.3±45.7	209.7±45.2	0.86	204.6±45.8	210.6±45.1	0.21
HDL Cholesterol (mmol/L)	45.4±11.2	42.8±13.0	0.02	44.9±12.0	44.1±12.2	0.50	45.6±12.1	44.4±12.5	0.31
LDL Cholesterol (mmol/L)	127.4±39.8	134.0±43.9	0.19	128.6±41.0	129.6±45.5	0.87	124.8±41.6	131.9±41.5	0.17
Triglycerides (mmol/L)	176.1±103.2	191.6±123.2	0.21	180.6±112.0	181.7±106.5	0.76	168.7±98.8	193.8±124.5	0.07
Systolic BP (mmHg)	143.9±22.7	145.6±22.9	0.56	142.9±21.4	151.4±24.8	0.01	144.4±21.5	145.6±25.1	0.78
Diastolic BP (mmHg)	86.4±14.8	85.2±11.8	0.83	84.8±13.5	85.7±11.6	0.42	85.9±14.0	84.1±13.0	0.18
Hypertension (%)	75.5	78.4	0.62	74.4	90.5	0.04	74.2	79.2	0.39

Data are mean ± s.d., unless otherwise indicated.

Abbreviations: BP, Blood Pressure; BMI, Body Mass Index; IHD, Ischemic Heart Disease; IS, Ischemic Stroke; PAD, Peripheral Artery Disease

Table 3. Minor allelic frequency and genotype of the polymorphisms according to macrovascular complication

		IHD (n = 366)			IS (n = 360)			PAD (n = 331)		
		Controls	Cases	P	Controls	Cases	P	Controls	Cases	P
Patients (%)		52.5	47.5		81.4	18.6		61.3	38.7	
<i>FGB</i> rs1800790										
-445G>A	A	0.18	0.18	0.928	0.18	0.17	0.981	0.18	0.18	0.900
	GG	0.66	0.65		0.65	0.66		0.65	0.65	
	GA	0.31	0.33		0.32	0.34		0.33	0.35	
	AA	0.03	0.02	0.741	0.02	0.00	0.728	0.02	0.00	0.375
<i>F2</i> rs1799963										
20210G>A	A	0.02	0.03	0.484	0.02	0.04	0.344	0.03	0.02	0.725
	GG	0.96	0.94		0.96	0.92		0.95	0.96	
	GA	0.04	0.06		0.04	0.08		0.05	0.04	
	AA	0.00	0.00	0.478	0.00	0.00	0.338	0.00	0.00	0.722
<i>F5</i> rs6025										
1691G>A	A	0.02	0.03	0.943	0.02	0.02	0.945	0.02	0.03	0.699
	GG	0.97	0.96		0.96	0.97		0.96	0.96	
	GA	0.02	0.03		0.03	0.03		0.04	0.02	
	AA	0.01	0.01	0.899	0.01	0.00	0.808	0.00	0.02	0.151
<i>F7</i> rs5742910										
-323 del/ins (10bp)	I	0.14	0.16	0.425	0.14	0.15	0.960	0.13	0.14	0.957
	DD	0.74	0.69		0.74	0.68		0.75	0.74	
	DI	0.24	0.29		0.24	0.32		0.23	0.24	
	II	0.02	0.02	0.637	0.02	0.00	0.581	0.02	0.02	0.982
<i>F13A1</i> rs5985										
103G>T	T	0.20	0.25	0.148	0.22	0.26	0.457	0.24	0.22	0.673
	GG	0.64	0.57		0.61	0.52		0.59	0.58	
	GT	0.32	0.36		0.34	0.43		0.33	0.40	
	TT	0.04	0.07	0.296	0.05	0.05	0.481	0.08	0.02	0.104
<i>PLAT</i> rs4646972										
Ins/del(311 bp)	I	0.50	0.52	0.685	0.47	0.56	0.080	0.52	0.49	0.618
	II	0.29	0.32		0.33	0.21		0.32	0.27	
	DI	0.43	0.40		0.41	0.46		0.39	0.44	
	DD	0.29	0.32	0.797	0.26	0.33	0.194	0.29	0.29	0.556
<i>PAI-1</i> rs1799768										
-675 5G/4G	4G	0.43	0.43	0.890	0.44	0.44	0.953	0.44	0.44	0.996
	5G5G	0.31	0.32		0.31	0.24		0.30	0.31	
	5G4G	0.53	0.50		0.51	0.64		0.53	0.50	
	4G4G	0.16	0.19	0.805	0.18	0.12	0.312	0.17	0.19	0.825

Table 3. continued

<i>ITGB3</i> rs5918										
176T>C	C	0.17	0.16	0.654	0.15	0.27	0.004	0.15	0.22	0.025
	TT	0.72	0.74		0.74	0.56		0.73	0.65	
	TC	0.22	0.20		0.21	0.34		0.24	0.25	
	CC	0.06	0.06	0.876	0.05	0.10	0.019	0.03	0.10	0.037
<i>MTHFR</i> rs1801133										
677C>T	T	0.30	0.30	0.944	0.31	0.31	0.962	0.28	0.31	0.463
	CC	0.46	0.49		0.46	0.45		0.49	0.47	
	CT	0.48	0.43		0.46	0.47		0.45	0.43	
	TT	0.06	0.08	0.639	0.08	0.08	0.986	0.06	0.10	0.395

Abbreviations: IHD, Ischemic Heart Disease; IS, Ischemic Stroke; PAD, Peripheral Artery Disease.

Genotype and allele frequencies were compared using the χ^2 test.

Table 4. Poisson regression with robust variances adjusted using *ITGB3* rs5918 for the association with IS and PAD

<i>ITGB3</i> rs5918	IS*		PAD**	
176T>C	PR (CI 95%)	P	PR (CI 95%)	P
TT	1		1	
TC	2.04 (1.11-3.73)	0.021	1.25 (0.87-1.78)	0.225
CC	1.71 (0.57-5.17)	0.340	1.90 (1.29-2.81)	0.001
TT	1		1	
TC + CC	1.97 (1.10-3.52)	0.022	1.41 (1.04-1.91)	0.026
TT + TC	1		1	
CC	1.34 (0.46-3.93)	0.591	1.80 (1.24-2.61)	0.002

Abbreviations: IS, Ischemic Stroke; PAD, Peripheral Artery Disease.

* Poisson regression with robust variances adjusting for waist circumference, serum creatinine, systolic BP.

** Poisson regression with robust variances adjusting for confounding variables: T2DM duration, GHb, BMI, serum creatinine, triglycerides.

Capítulo 4: Artigo 2

Manuscrito a ser submetido

Hemostatic gene polymorphisms and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus

Hemostatic gene polymorphisms and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus

Alexandre Rieger¹, Eliane Bandinelli², Carolina Kretschmer Luft¹, Clara Forrer Charlier¹, Jorge Luiz Gross³, Lavínia Schuler-Faccini², Roberta Petry Gorziza², Luís Henrique Canani³,

¹Laboratório de Biotecnologia e Genética, Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS Brasil

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS Brasil

³Divisão de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS Brasil

Correspondence:

Prof^a. Lavínia Schüler-Faccini

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15031 - Agência Campus UFRGS

CEP 91501-970, Porto Alegre – RS

Phone: + 55 51 2101-8008 / + 55 51 3316-6727

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Abstract

Background and objective: Microvascular complications represent an important cause of morbidity and mortality in type 2 diabetes mellitus (T2DM). The endothelial dysfunction of microvasculature may affect the hemostatic system which in turn could play a role in the progression of microvascular complications. The present study evaluates the polymorphisms of hemostatic system: *FGB* rs1800790, *F2* rs1799963, *F5* rs6025, *F7* rs5742910, *F13A1* rs5985, *PLAT* rs4646972, *PAI-1* rs1799768, *ITGB3* rs5918 e *MTHFR* rs1801133 and the risk of developing microvascular complications.

Methods: A case control study was carried out in 393 unrelated T2DM patients of European descent participating in a multicenter study in southern Brazil. The outcomes investigated were diabetic nephropathy (DN), diabetic retinopathy (DR), and distal sensory neuropathy (DSN). Individuals were genotyped using the polymerase chain reaction (PCR) protocol. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among cases and controls were evaluated using χ^2 tests. Whenever statistically significance association with outcome was found in univariate analysis, this variable was included in regression analysis. Poisson regression with robust variance adjusted for confounding variables was used to estimate prevalence ratio (PR) and confidence intervals (IC). The χ^2 test with adjusted residues was used to verify the association between alleles, genotypes and genotypic combinations and the outcomes wich are distributed according to clinical severity.

Results: Of the polymorphisms studied, only *PAI-1* rs1799768 presented significant association with DN in the univariate analysis. Poisson regression with robust variance adjusted for the confounding variables confirmed the association ($P = 0.003$). Yet, the risk allele seem to have a protective effect. Sample stratification in terms of disease severity revealed that the risk allele 4G frequency significantly decreased in sever DN cases ($P = 0.009$; $AR = -2.95$), which was probably associated with a higher mortality in this group. Whenever, end-stage DN patients who carried at least one risk allele 4G were at a higher risk of developing ischemic heart disease ($P = 0.042$; $AR = 2.50$) than patients without the allele.

Conclusion: The polymorphism *PAI-1* rs1799768 may be involved in the progression of DN to its end stage and therefore might represent an important factor concerning mortality rates of the disease. DN patients at an advanced stage of the disease, carriers of at least one risk allele 4G, are at a higher risk of developing ischemic heart disease than patients without the allele.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, microvascular complication, hemostasis, *PAI-1*.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the main cause of morbidity and mortality in the economically active adult population. This represents a heavy burden to the health and economic systems [1, 2]. T2DM is strongly related to the development of micro- and macrovascular complications [3-5].

The microvascular complications of T2DM have been traditionally described as diabetic retinopathy (DR), nephropathy (DN) and distal neuropathy sensory (DSN) [6]. The main risk factors to the development of these complications are the poor glycemia control, the duration of diabetes, hypertension, dyslipidemia and smoking [7-11].

Although some T2DM patients undergo an intense control of risk factors, especially glycemic control, they still develop microvascular complications, while other patients who do not keep such strict control over these parameters do not demonstrate these conditions. In fact, the genetic predisposition for microvascular complications in T2DM has been demonstrated in several studies on familial aggregation [12-15] and ethnicity [8, 14, 16].

DN is the main cause of blindness in the adult population, and may occur in as many as 21% of patients, when T2DM is diagnosed [17, 18]. The lack of effective glycemia control, side by side with the time diabetes has been in progress, may elevate prevalence to values near 80% in patients who have had the disease for over 15 years [19]. The progression of DR varies, between a mild form, known as non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR), and the severe form, proliferative diabetic retinopathy (PDR), especially frequent when risk factors are not mitigated during the progression of the disease [9]. Different genetic polymorphisms have been studied with the aim of identifying the susceptibility to the progression of this complication [12, 17, 19, 20].

In turn, DSN is the most prevalent neuropathy [21], and may be present in 30 to 50% of T2DM patients, depending on the time the disease has been evolving [5, 8, 22, 23]. The onset of the complication may vary, though in general it is more precocious in men [24]. The nature of the neuropathy is not accurate, neither are the respective causal mechanisms, but its importance is underlined in the light of the fact that 80% of the amputations of lower limbs take place subsequently to a lesion or ulceration in T2DM patients who usually present (DSN) [6].

DN significantly adds to morbidity and premature mortality in T2DM patients [25-27] and is the most frequent cause behind the progression of end-stage renal disease (ESRD) in the adult population [28]. A significant increase in the prevalence of ESRD in individuals diagnosed with T2DM has been observed in the past 20 years, and no sign of stabilization in values is at sight [29]. DN is associated to different complications, both microvascular and macrovascular [5, 29-31]. The most common cause of mortality in DN patients is the cardiovascular complication [7]. Apart from being the vascular condition most frequently associated to DN, it has also been shown that it is linked to the progression of renal disease, and its prevalence is significantly increased in patients that developed ESRD [14, 32]. The genetic model on which DN is based has not been fully clear, though apparently some genetic elements of considerable importance may play a role in the different stages of the disease. In such an heterogeneous disease as DN, finding some link between the increased risk of developing the disease and the kind of lesion leads to the indication that there is a strong genetic predisposition involved in this relationship [13, 14].

The onset of microvascular complications may be observed even before the glycemic change, as early as in the insulin resistance stage, which is a clear indication of the complexity that surrounds its etiology [33-35]. The most common change in microvasculature is the thickening of the basal endothelium membrane in the capillary and arteriollary beds, which is associated to the onset of hypertension, changes in permeability, tissue hypoxia and decrease in cicatrization capacity [4].

Endothelial dysfunction is associated to the inflammatory processes that occur in T2DM, specially in obese individuals, and that exarcebate the hypercoagulability and hypofibrinolysis state in T2DM [36, 37]. Endothelial cells may express proteins with different functions, in an uncontrolled and uncoordinated way, in response to changes in the vascular environment. Increases are observed in the von Willebrand factor (vWF), fibrinogen, factors VII (FVII), IX (FIX), XII (FXII), as well as in tissular factor (TF), so as to favor the platelet and coagulation stages. In the fibrinolytic stage, the secretion of the tissue plasminogen activator (tPA) is reduced, while the secretion of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is increased in the vascular epithelium, to promote fibrinolysis. Moreover, in this inflammatory scenario, platelet surface receptors, as well as coagulation factors secreted in other sites may experience an increase in concentration. This favors the development of a prothrombotic and hypofibrinolytic environment in

T2DM [34, 36-40]. It is also important to stress that endothelial dysfunction may vary depending on the site. Therefore, even if the picture indicates generalized inflammation, the effect on the vascular endothelium may still be discerned [34]

Microvascular complications often occur concomitantly with macrovascular complications, and it is likely that these two conditions have physiopathological mechanisms in common, chiefly as regards the development of the endothelial dysfunction and of the atherothrombotic state [33, 35, 41]. Platelet hyperactivation, when occurring together with a more intense coagulation onset and a scenario of hypofibrinolysis, may lead to the formation of microthrombi that in turn could trigger a picture of ischemia and embolization of the microvasculature, leading to the functional commitment of the structures of highly vascularized organs [33, 41].

The polymorphisms related to hemostasis more often studied concerning the microvascular complications are the polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T (*MTHFR* rs1801133) and of the *PAI-1*-675 5G/4G (*PAI-1* rs1799768). Regarding DR, studies with T2DM patients in Brazil have not found any association of the disease with the polymorphism *MTHFR* rs1801133 [42, 43] nor with the polymorphism *PAI-1* rs1799768 [42]. Nevertheless, studies with other populations, especially from the East [44] have observed an association of DR with the polymorphism *MTHFR* rs1801133. In a review paper that used a meta-analysis approach, the authors emphasize the existence of few studies on the subject, but suggest that the genotype 677TT may be associated with a higher risk for DR development [45]. Studies involving other hemostatic polymorphisms and DR are scarce, though these papers suggest that the factor XIII and platelet receptors may predispose subjects concerning the formation of microthrombi and the progression of DR [46]. Similarly, it has also been proposed that the variants of prothrombin 20210G>A (*F2* rs1799963) and factor V 1961G>A (*F5* rs6025) may lead to the predisposition to form microthrombi in the retinal vascularization and thus contribute to the risk of retinopathy [47-49].

Concerning DN, the polymorphism *MTHFR* rs1801133 presents conflicting results. Some authors suggest that the genotype 677TT is correlated to hyperhomocysteinemia in T2DM, and thus represents a risk factor for DN [50]. Yet, other authors have not observed any relationship between the genotype and homocystein levels, nor with DN [44, 51, 52]. Most studies on *PAI-1* point to the allele 4G of the polymorphism *PAI-1* rs1799768 as

being linked to the risk of cardiovascular disease and to the progression of DN. Nevertheless, some research papers have failed to demonstrate the association of the risk allele 4G to an increase in PAI-1 activity [53-57].

Studies on the polymorphisms of hemostasis with the outcome DSN in T2DM patients are rare. However, it has been suggested that the predisposition for the formation of microthrombi in the *vasa-vasorum* layer may influence the development of peripheral neuropathy [4, 41]. A recent study on the hemostasis polymorphisms (*F2* rs1799963, *F5* rs6025, *PLAT* rs4646972) which addressed the metabolism of homocystein (*MTHFR* rs1801133) was conducted with non-diabetic patients who developed sudden sensorineural hearing loss due to thrombotic microangiopathy. The authors observed a higher frequency of multiple risk mutations in patients presenting this outcome, and suggested that this mechanism may contribute to the sudden sensorineural hearing loss [58].

Thus, the expression of hemostasis and fibrinolytic function genes changes in this prothrombotic and fibrinolytic state in T2DM. In this sense, studying genetic polymorphisms of these genes may add to a more accurate evaluation of the risk of developing microvascular complications in T2DM.

Materials and methods

Study population

A case-control study was carried out in 393 unrelated T2DM patients participating in a multicenter study that started recruiting regularly since 2002 in southern Brazil [59]. The project aimed to study risk factors for chronic complications of DM. The patient sample consisted of white subjects, descendant mainly from Portugal, Spain, Italy and Germany. T2DM was diagnosed as the occurrence of diabetes after the age of 30 years with no use of insulin during the first year after diagnosis and no previous episodes of ketoacidosis [60].

Cases were defined in terms of the presence of the microvascular complication and were stratified into three outcomes: diabetic nephropathy (DN) (n =389), diabetic retinopathy (DR) (n= 355) and distal sensory neuropathy (DSN) (n= 260). Controls were defined as patients with known T2DM duration of at least 10 years after diagnoses and without a microvascular complication corresponding to the cases.

All patients participating in this study gave their written informed consent. The study protocol was approved by the hospital ethics committee.

Assessment of diabetic complications

DR was assessed by ophthalmoscopic examination through dilated pupils performed by an ophthalmologist and classified as absent, non-proliferative DR, or proliferative DR. DN was evaluated by urinary albumin excretion (UAE) measurements. Patients were classified as normo- (UAE <20 µg/min or <17 mg/L), micro- (UAE 20-200 µg/min or 17-174 mg/L), or macroalbuminuric (UAE ≥200 µg/min or >174 mg/L) (26). UAE values were confirmed by at least two of three measurements performed 3 to 6 months apart. Patients with ESRD being treated at dialysis units were also included. DSN was diagnosed by typical symptoms, abnormal Achilles tendon reflexes, vibration test or sensory perception determined with a 10-g Semmes-Weinstein monofilament applied to the hallux of each foot. Ischemic heart disease (IHD) was diagnosed as the presence of angina pectoris or possible myocardial infarction according to the World Health Organization (WHO) Cardiovascular Questionnaire [61] and/or on the presence of resting electrocardiogram abnormalities [Minnesota Code: Q and QS patterns (1.1-2, 1.3); S–T junction (J) and segment depression (4.1-4); T-wave items (5.1-3) and complete left bundle branch block (7.1)] [62], and/or the presence of perfusion abnormalities (fixed or variable) upon myocardial scintigraphy at rest and after dipyridamole administration. Patients presenting any change in the evaluation criteria above were considered to have IHD [63].

Laboratorial Evaluation and other parameters

The ethnic group was defined based on self-classification and subjective classification (skin color, nose and lip shapes, hair texture, and information about family ancestry). A standard questionnaire was used to collect information about age, age at DM diagnosis, and drug treatment. T2DM patients underwent physical and laboratory evaluations. Patients were weighed without shoes and in light outdoor clothes, and had their height measured by standard procedures. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/ height² (m²). Waist circumference was obtained at the mid-point between the last rib and the antero-superior iliac spine, parallel to the floor, with a nondistensible measuring tape. Blood pressure (BP) was measured twice after a 5-min rest in the sitting

position using a mercury sphygmomanometer (Korotkoff phases I and V). The mean value of two measurements was used to calculate systolic and diastolic BP. Hypertension was defined as BP levels $\geq 140/90$ mm Hg, or if the patient was taking anti-hypertensive drugs.

A serum sample was collected after a 12-h fasting period for laboratory analyses. Glucose levels were determined using the glucose oxidase method; creatinine by the Jaffé reaction; glycosylated hemoglobin (GHb) by an ion-exchange HPLC procedure (Merck-Hitachi L-9100 GHb Analyser, Merck, Darmstadt, Germany; reference range: 4.7-6.0%), total plasma cholesterol and triglycerides by enzymatic methods, and albuminuria by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria, Bayer, Tarrytown, NY, USA; with mean intra- and interassay coefficients of variance of 4.5 and 7.6%, respectively).

Genotyping and nomenclature

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standardized salting-out Procedure [64]. Nine hemostatic gene polymorphisms were evaluated as listed in Table 1.

Polymorphism genotyping was carried out by polymerase chain reaction (PCR). PCR was used to identify the polymorphisms rs4646972 [65] of the *PLAT* gene and rs5742910 [66] of factor VII. Amplicons thus obtained were visualized under UV light on agarose gels 2% and polyacrylamide gels 6%, respectively. The other polymorphisms rs1800790 [67] of the *FGB* gene; rs1799963 [68] of the *F2* gene; rs6025 [69] of the *F5*; rs5918 [70] of the *ITGB3* and rs 1801133 [71] of the *MTHFR* gene were also identified using PCR and specific enzyme digestion (PCR-RFLP) and visualization in polyacrylamide gel 6%. All reactions are performed in duplicate.

Statistical Analysis

Clinical and laboratorial continuous variables with normal distribution were compared between groups by Student's t test whereas variables with skewed distribution were compared with Mann-Whitney U-test. Non continuous variables were evaluated with χ^2 test. Data are presented as mean \pm standard deviation or percentage. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Allelic frequencies were determined by gene counting, and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were assessed using χ^2 tests. Comparisons of allelic and genotypic frequencies among cases and controls were evaluated using χ^2 tests. Recessive

and dominant models to risk allele of each polymorphism also were evaluated for polymorphisms using χ^2 tests.

Whenever statistically significance association with outcome was found in univariate analysis, this variable was included Poisson regression with robust variances, which was used to assess the genotype, allelic frequency and genotype combination of risk with the outcomes. The potentially confounding variables were also included in regression model. Prevalence ratio (PR) was used to estimate confidence intervals because the Poisson regression with robust variances, narrowed confidence intervals and estimates to control for overestimation of errors in the binomial data when study is performed with frequent diseases [72-74]. The χ^2 test with adjusted residues (AR) was used to verify the association between alleles, genotypes and genotypic combinations and the outcomes that distributed according to clinical severity. The value $[AR] > 1.96$ was considered statistically significant.

Results

The clinical and biochemical characteristics, sorted according to the occurrence of microvascular complication (DN, DR, DSN) are described in Table 2. As for DN, the number of male individuals, the waist circumference and obviously the level of serum creatinine were significantly increased. Yet, HDL levels were significantly lower. Concerning DR, plasma creatinine levels were significantly higher, as well as the time diabetes evolved and GHB levels. For DSN, serum creatinine and total cholesterol and LDL levels were increased, though GHB levels were significantly lower.

The allele frequencies of the polymorphisms studied in the total sample met the Hardy-Weinberg equilibrium, except polymorphisms *F5* rs6025 ($P = 0.00$), *PLAT* rs4646972 ($P = 0.02$) and *ITGB3* rs5918 ($P = 0.01$). Yet, when T2DM patients are used as controls concerning the respective outcome, these samples are within the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Of all the polymorphisms studied, only -675 5G/4G (*PAI-1* rs1799768) presented significant difference in allele frequency and genotypic distribution, but only for the outcome DN (Table 3). Differently from what was expected, the risk allele (4G) of this polymorphism was observed to be significantly lower in DN individuals. Even when the

Poisson regression with robust variance was adjusted for the confounding variables (sex, serum creatinine, waist circumference, HDL cholesterol and systolic blood pressure), the risk allele 4G still presented results that contradicted the expected trend [PR = 0.71; 95%(CI 0.57-0.89); P = 0.003].

It is known that DN is progressively manifested as grades, which range from microalbuminuria in the initial stage of the disease to the need of dialysis in the ESRD. Thus, it was decided to test the polymorphisms, especially *PAI-1* rs1799768, for the classes that indicate the degree of renal disease. So, all polymorphisms were analyzed using the χ^2 test, comparing controls to the cases defined as presenting only microalbuminuria. In this situation, no significant differences was observed for polymorphism *PAI-1* rs1799768 (P = 0.404) as well as for the other polymorphisms.

In order to verify whether the risk allele 4G varied with DN severity, the χ^2 test with analysis of adjusted residues was conducted. The results obtained (Table 4) show negative and statistically significant adjusted residues for the patients with T2DM presenting the allele 4G and macroalbuminuria and/or the need for dialysis. These results indicate that, for this class of patients, who present higher severity DN, the number of individuals presenting the allele is lower than expected.

The χ^2 test with analysis of adjusted residues was also used to test the association between degrees of DN severity to IHD. The result was significant (P = 0.03), with a significant AR value (AR = 2.5) for the presence of IHD only in patients with macroalbuminuria and/or the need for dialysis (Table 5), which indicates the significant association between IHD and a higher clinical DN severity.

Due to the significant association between IHD and the DN severity, we decided to test whether carriers of the risk allele 4G were more numerous in the group of patients with macroalbuminuria and/or the need for dialysis as compared to the number of patients with/without IHD (Table 6). The results obtained suggest that patients carrying the 5G allele there is no association with DN progression (P = 0.762). However, when individuals carrying at least one 4G allele are tested, an association with a more severe grade of DN (macroalbuminuria and/or the need for dialysis) occurs in subjects with IHD (P = 0.042; AR = 2.50). This analysis suggests that the carriers of the 4G allele present a higher risk of developing IHD when DN is diagnosed at higher severity levels.

Similarly to DN, DR also presents severity degrees that range from a non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) to a severe proliferative diabetic retinopathy (PDR). Thus, the polymorphisms studied were also tested using the χ^2 test relative to these categories, though no test revealed significant differences in the distribution of allelic or genotypic frequencies (data not shown).

Discussion

This study evaluated 393 T2DM patients of European descent regarding nine polymorphisms related to hemostasis and fibrinolysis as to the development of microvascular complications DN, DR, and DSN. Of the total number of polymorphisms studied, only *PAI-1* rs1799768 exhibited allelic and genotypic frequencies that were statistically different in relation to the outcome DN.

As for DR, our results agree with those of other studies, which did not find any association between *MTHFR* rs1801133 677C>T (*MTHFR* rs1801133) and this complication in Brazilian subjects with T2DM [43]. Apart from this, these findings corroborate previous results obtained by our research group, studying smaller samples, which demonstrate the absence of association of polymorphism *MTHFR* rs1801133 and *PAI-1* rs1799768 with the progression of DR [42]. Even though our data point to the absence of association, other authors have observed an increased risk of DR in the occurrence of these polymorphisms, but the majority of these studies utilized a small number of patients [44, 75, 76], or merely demonstrated some association in a study based on meta-analysis [45, 77]. Similarly, no association was reported between DR and the prothrombin polymorphisms 20120G>A (*F2* rs1799963) and of the factor V 1691G>A (*F5* rs6025). Both polymorphisms are linked mainly to venous thrombosis [78], in spite of the fact that some authors suggest that a predisposition to form microthrombi in the retinal vascularization [47-49], which could increase the risk of DR progression in T2DM patients. Concerning the polymorphisms of fibrinogen +445 G>A (*FGB* rs1800790), factor VII – 323 del/ins (10 bp) (*F7* rs5742910), factor XIII 103G>T (*F13A1* rs5985), tPA ins/del 311 bp (*PLAT* rs4646972) and *ITGB3* 176T>C (*ITGB3* rs5918), no association with DR was observed. It is possible that the effect of these polymorphisms is too marginal to allow a contribution to microvascular disease. Some authors have suggested that this small and

combined effect may be an important risk factor, though so far only the development of macrovascular complications has been analyzed in this scenario [79, 80]. Moreover, studies carried out to compare the effect of these polymorphisms with the occurrence of DR are scarce. Studies on thrombotic microangiopathy are more frequent, though not in T2DM patients [81-83].

Similarly, no association was observed between the polymorphisms studied and DSN, although thrombotic microangiopathy may be a predisposing factor in the DSN progression, especially due to the partial or total occlusion of the *vasa-vasorum* layer of the peripheral circulation associated to enervation [4, 41, 58].

Except for *PAI-1* rs1799768, no other polymorphisms studied were associated to DN. Concerning polymorphism *MTHFR* rs1801133, our results agree with the findings obtained in other studies [44, 51, 52], which likewise did not report association between these polymorphisms and DN. As for the other polymorphisms investigated in the present study there are no specific studies with T2DM patients to afford a comparison. Nevertheless, it is worth stressing that several authors suggest that the state of hypercoagulability and hypofibrinolysis may be a triggering factor or at least a risk factor also in the development of microvascular complications in T2DM, mainly when associated to DN [22, 36, 39-41]. The polymorphism of the allele 4G of *PAI-1* rs1799768 was the only to present a significant association with DN. This polymorphism is characterized by the deletion of one guanine molecule in the position -675 of the *PAI-1* gene, which leaves the individual with 4 guanine molecules (4G). This mutation is linked to an increase in the gene transcription rate. It has been suggested that individuals who carry this deletion may be able to inhibit plasmin, the main fibrinolysis protein, more efficiently. Therefore, the individuals who carry the 4G allele or homozygous individuals for this condition may present a higher risk to develop thrombotic conditions [84].

In the association of polymorphism *PAI-1* rs1799768 and DN, the findings indicate a putative protector effect of the 4G allele [PR = 0.715; 95% (IC = 0.573-0.891); P = 0.003]. In an attempt to explain this unexpected association, since the allele 4G was thought to represent risk, the DN patients were sorted into grades of severity according to the progression of the complication. The comparison between patients presenting DN in an initial stage, characterized by microalbuminuria, and the control individuals revealed no significant association (P = 0.404). Therefore, it is possible to rule out the effect of *PAI-1*

on the onset of DN, which agrees with some studies conducted with a small number of T2DM patients [75]. This effect had been demonstrated in a small study which measured the activity of PAI-1 and did not correlate it to the onset of DN [77]. When the carriers of the allele 4G were compared in terms of the grades of severity of DN using the χ^2 test with analysis of adjusted residue, the results still suggested a significant decrease in the frequency of the risk allele 4G in the class of subjects with ND at its most severe stage (Table 4). Similar results were obtained in a study that compared T2DM patients without DN and ESRD [52]. However, other studies conducted with Asian populations point to a significant increase in the frequency of individuals carrying the allele 4G and with DN [56, 85]. It has similarly been suggested, concerning primary membranous nephropathy, that carriers of the 4G allele also present a higher risk to develop the disease [53].

Microvascular complications usually coexist with macrovascular complications [33, 35, 41]. In DN, a significant increase in the mortality rate occurs as the disease evolves into ESRD. It has been suggested that this increase in the mortality rate is associated mainly to cardiovascular complications [7, 14, 29, 31, 32]. The χ^2 test confirms this association between DN in an advanced stage (macroalbuminuria and/or dialysis) and IHD in our sample ($P = 0.03$). This association affords to suggest that cardiovascular disease in patients with DN may be responsible for the increase in mortality rates. If mortality is associated to carriers of the allele 4G, then there is an explanation for the decrease in the allele's frequency with the increased phenotypic degree of DN severity.

The χ^2 test with analysis of adjusted residues afforded to compare the different degrees of severity of DN between individuals who did not carry the risk allele (5G5G) and those who carried at least one risk allele (5G4G + 4G4G). A significant association ($P = 0.042$; $AR = 2.5$) was observed between severity of DN and the presence of IHD in individuals carriers of at least 1 allele 4G (Table 6). This suggests a risk effect for the allele 4G in IHD in patients with DN. These findings agree with a study with ESRD patients submitted to dialysis. In those patients, a higher risk of fatal and non-fatal acute myocardial infarction was associated with the risk allele 4G of the polymorphism *PAI-1* rs1799768 [86].

These results allow to suggest that polymorphism *PAI-1* rs1799768 may be involved in more functions. It is known that *PAI-1* rs1799768 acts over plasmin, which plays an important role not only in fibrinolysis but also in the remodeling of the

extracellular matrix of the conjunctive tissue. The increased expression of PAI-1 in individuals carrying the allele 4G decreases its activity and contributes to the glomerular changes that accelerate the glomerular fibrosis process, leading the patient to temporarily present ESRD [54, 57]. In the progression of renal disease PAI-1 may act locally and therefore small variations in its expression affect the corresponding vascular bed and, naturally, the respective extracellular matrix of the vascular endothelium of the vascular bed involved [77]. Studies with patients who underwent kidney transplants lend cogency to this idea of local involvement, since donors carrying the allele 4G are at a higher risk of rejection, presenting sclerosis and fibrosis in kidneys that were rejected by the organism [87]. Apart from this, studies that investigated the recombinant tPA in renal fibrosis patients have shed new light on the prevention of the progression of renal disease, promoting recovery and emphasizing once again the importance of the local expression of PAI-1, which may depend on the polymorphism. However, the literature also suggests that the increase in the risk of vascular complications and of DN itself in T2DM patients may be due to the presence of the risk allele and its likely effect in diminishing fibrinolysis [57].

This study suffered with some limitations, among which the fact that PAI-1 activity was not measured, that a stratified statistical analysis was used (which eventually decreases the sample size), and the fact that this is a case-control study. On the other hand, it should be stressed that the comparisons were made with a well-defined control group, since all subjects had identical T2DM background, though these individuals had had diabetes without the respective microvascular complication for at least 10 years. The investigation of the evolution of DN and cardiovascular disease in a cohort study with T2DM patients genotyped for the polymorphisms of interest and who could have their biochemical parameters analyzed would assist in the elucidation of this microvascular complication and the relationship these polymorphisms may have with other complications.

Conclusions

The data obtained in the present study allow to suggest that there is not association between the polymorphisms studied and the microvascular complications DN, DR and DSN in T2DM patients. The exception was polymorphism *PAI-1* rs1799768, which may be related to the progression of DN into its end stage. The significant decrease in the

frequency of the allele 4G, associated to the progression into a more advanced stage of the disease, indicates that it may be an important risk factor in terms of mortality. Apart from this, patients with end-stage DN and who carry at least one risk allele 4G are at a higher risk of developing IHD.

Competing interests/financial disclosure: Nothing to declare.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Israel Roisenberg, PhD for laying the grounds for the present work. This study was partially supported by Projeto de Núcleos de Excelência do Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abbreviations

DN (diabetic nephropathy)

DR (diabetic retinopathy)

DSN (diabetic sensory neuropathy)

ESRD (end-stage-renal-disease)

IHD (ischemic heart disease)

NPDR (non-proliferative diabetic retinopathy)

PDR (proliferative diabetic retinopathy)

T2DM (type 2 diabetes mellitus)

References

1. de Oliveira, A.F., et al., *Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil*. Cad Saude Publica, 2009. **25**(6): p. 1234-44.
2. Ryden, L., et al., *Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Eur Heart J, 2007. **28**(1): p. 88-136.
3. Rahman, S., et al., *Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9**(6): p. 767-80.
4. Orasanu, G. and J. Plutzky, *The pathologic continuum of diabetic vascular disease*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(5 Suppl): p. S35-42.
5. Scheffel, R.S., et al., *[Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus]*. Rev Assoc Med Bras, 2004. **50**(3): p. 263-7.
6. Fowler, M.J., *Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes*. Clinical Diabetes, 2008. **26** (2): p. 77-82.
7. Bilous, R., *Microvascular disease: what does the UKPDS tell us about diabetic nephropathy?* Diabet Med, 2008. **25 Suppl 2**: p. 25-9.
8. Gerchman, F., et al., *Vascular complications of black patients with type 2 diabetes mellitus in Southern Brazil*. Braz J Med Biol Res, 2008. **41**(8): p. 668-73.
9. Kohner, E.M., *Microvascular disease: what does the UKPDS tell us about diabetic retinopathy?* Diabet Med, 2008. **25 Suppl 2**: p. 20-4.
10. Nazimek-Siewniak, B., D. Moczulski, and W. Grzeszczak, *Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes: results of longitudinal study design*. J Diabetes Complications, 2002. **16**(4): p. 271-6.
11. Cardoso, C.R. and G.F. Salles, *Predictors of development and progression of microvascular complications in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients*. J Diabetes Complications, 2008. **22**(3): p. 164-70.
12. Patel, S., et al., *Genetic susceptibility of diabetic retinopathy*. Curr Diab Rep, 2008. **8**(4): p. 257-62.
13. Placha, G., et al., *Evidence for different susceptibility genes for proteinuria and ESRD in type 2 diabetes*. Adv Chronic Kidney Dis, 2005. **12**(2): p. 155-69.

14. Zelmanovitz, T., et al., *Diabetic nephropathy*. *Diabetol Metab Syndr*, 2009. **1**(1): p. 10.
15. Canani, L.H., F. Gerchman, and J.L. Gross, *Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 1999. **48**(4): p. 909-13.
16. Crook, E.D. and S.R. Patel, *Diabetic nephropathy in African-American patients*. *Curr Diab Rep*, 2004. **4**(6): p. 455-61.
17. dos Santos, K.G., et al., *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**(3): p. 280-4.
18. Fong, D.S., et al., *Retinopathy in diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. **27 Suppl 1**: p. S84-7.
19. Liew, G., R. Klein, and T.Y. Wong, *The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy*. *Int Ophthalmol Clin*, 2009. **49**(2): p. 35-52.
20. Cheung, N. and T.Y. Wong, *Diabetic retinopathy and systemic vascular complications*. *Prog Retin Eye Res*, 2008. **27**(2): p. 161-76.
21. Harati, Y., *Diabetic neuropathies: unanswered questions*. *Neurol Clin*, 2007. **25**(1): p. 303-17.
22. Cade, W.T., *Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting*. *Phys Ther*, 2008. **88**(11): p. 1322-35.
23. Karvestedt, L., et al., *Peripheral sensory neuropathy associates with micro- or macroangiopathy: results from a population-based study of type 2 diabetic patients in Sweden*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(2): p. 317-22.
24. Aaberg, M.L., et al., *Gender differences in the onset of diabetic neuropathy*. *J Diabetes Complications*, 2008. **22**(2): p. 83-7.
25. Gerstein, H.C., et al., *Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals*. *Jama*, 2001. **286**(4): p. 421-6.
26. Valmadrid, C.T., et al., *The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus*. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(8): p. 1093-100.
27. Skyler, J.S., *Microvascular complications. Retinopathy and nephropathy*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2001. **30**(4): p. 833-56.
28. Lewis, J.B., *Diabetic nephropathy in patients with type II diabetes*. *Geriatr Nephrol Urol*, 1999. **9**(3): p. 167-75.

29. Brown, W.V., *Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection*. Am J Cardiol, 2008. **102**(12A): p. 10L-13L.
30. Alwakeel, J.S., et al., *Concomitant macro and microvascular complications in diabetic nephropathy*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2009. **20**(3): p. 402-9.
31. Ito, H., et al., *High frequencies of diabetic micro- and macroangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus with decreased estimated glomerular filtration rate and normoalbuminuria*. Nephrol Dial Transplant, 2009.
32. Bruno, R.M. and J.L. Gross, *Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(5): p. 266-71.
33. Krentz, A.J., G. Clough, and C.D. Byrne, *Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9**(6): p. 781-91.
34. Grover-Paez, F. and A.B. Zavalza-Gomez, *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. **84**(1): p. 1-10.
35. Hadi, H.A. and J.A. Suwaidi, *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(6): p. 853-76.
36. Ajjan, R.A. and R.A. Ariens, *Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state*. Blood Rev, 2009. **23**(2): p. 67-78.
37. Faber, D.R., P.G. de Groot, and F.L. Visseren, *Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis*. Obes Rev, 2009. **10**(5): p. 554-63.
38. Goldberg, R.B., *Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3171-82.
39. Erem, C., et al., *Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications*. Med Princ Pract, 2005. **14**(1): p. 22-30.
40. Grant, P.J., *Diabetes mellitus as a prothrombotic condition*. J Intern Med, 2007. **262**(2): p. 157-72.
41. Stratmann, B. and D. Tschoepe, *Atherogenesis and atherothrombosis--focus on diabetes mellitus*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(3): p. 291-303.
42. Santos, K.G., et al., *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**(2): p. 133-6.

43. Errera, F.I., et al., *Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients.* Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(7): p. 883-8.
44. Maeda, M., et al., *MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients.* J Diabetes Complications, 2008. **22**(2): p. 119-25.
45. Zintzaras, E., et al., *The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis.* J Hum Genet, 2005. **50**(6): p. 267-75.
46. Boeri, D., M. Maiello, and M. Lorenzi, *Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals.* Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1432-9.
47. Nagy, V., et al., *Thrombophilic screening in retinal artery occlusion patients.* Clin Ophthalmol, 2008. **2**(3): p. 557-61.
48. Suarez Baraza, J., et al., *[Central retinal vein occlusion in a factor V leiden and G21210A prothrombin variant carrier].* Arch Soc Esp Oftalmol, 2004. **79**(9): p. 457-60.
49. Biancardi, A.L., et al., *Thrombophilic mutations and risk of retinal vein occlusion.* Arq Bras Oftalmol, 2007. **70**(6): p. 971-4.
50. Ukinc, K., et al., *Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy.* Endocrine, 2009. **36**(2): p. 255-61.
51. Zintzaras, E., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis.* J Hum Genet, 2007. **52**(11): p. 881-90.
52. Al-Muhanna, F., et al., *Polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase, plasminogen activator inhibitor-1, and apolipoprotein E in hemodialysis patients.* Saudi J Kidney Dis Transpl, 2008. **19**(6): p. 937-41.
53. Chen, C.H., et al., *Impact of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on primary membranous nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(10): p. 3166-73.
54. Brosius, F.C., 3rd, *New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy.* Rev Endocr Metab Disord, 2008. **9**(4): p. 245-54.
55. Meigs, J.B., et al., *PAI-1 Gene 4G/5G polymorphism and risk of type 2 diabetes in a population-based sample.* Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(5): p. 753-8.
56. Wong, T.Y., et al., *Association of plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G genotype and type 2 diabetic nephropathy in Chinese patients.* Kidney Int, 2000. **57**(2): p. 632-8.

57. Ha, H., E.Y. Oh, and H.B. Lee, *The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(4): p. 203-11.
58. Capaccio, P., et al., *Prothrombotic gene mutations in patients with sudden sensorineural hearing loss and cardiovascular thrombotic disease*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2009. **118**(3): p. 205-10.
59. Kramer, C.K., et al., *Risk factors for micro and macrovascular disease in black and white patients with type 2 diabetes mellitus*. Rev Assoc Med Bras, 2009. **55**(3): p. 308-14.
60. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2009. **32 Suppl 1**: p. S62-7.
61. Rose, G.A., et al., *Cardiovascular Survey Methods, World Health Organization, Geneva*. 1982.
62. Beck, M.O., et al., *Asymptomatic coronary artery disease is associated with cardiac autonomic neuropathy and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 1999. **22**(10): p. 1745-7.
63. dos Santos, K.G., et al., *The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes*. Mol Genet Metab, 2005. **85**(2): p. 149-56.
64. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
65. Ludwig, M., et al., *Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event*. Hum Genet, 1992. **88**(4): p. 388-92.
66. Humphries, S., et al., *Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant*. Thromb Haemost, 1996. **75**(4): p. 567-72.
67. Thomas, A.E., et al., *The association of combined alpha and beta fibrinogen genotype on plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers*. J Med Genet, 1995. **32**(8): p. 585-9.
68. Poort, S.R., et al., *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3698-703.
69. Bertina, R.M., et al., *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 64-7.

70. Weiss, E.J., et al., *A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1090-4.
71. Frosst, P., et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 111-3.
72. Wolkewitz, M., T. Bruckner, and M. Schumacher, *Accurate variance estimation for prevalence ratios*. Methods Inf Med, 2007. **46**(5): p. 567-71.
73. Behrens, T., et al., *Different methods to calculate effect estimates in cross-sectional studies. A comparison between prevalence odds ratio and prevalence ratio*. Methods Inf Med, 2004. **43**(5): p. 505-9.
74. Barros, A.J. and V.N. Hiraakata, *Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio*. BMC Med Res Methodol, 2003. **3**: p. 21.
75. Funk, M., et al., *PAI-1 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus*. Wien Klin Wochenschr, 2005. **117**(19-20): p. 707-10.
76. Nagi, D.K., et al., *Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of PAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 1997. **20**(8): p. 1304-9.
77. Brazionis, L., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 786-91.
78. Lane, D.A. and P.J. Grant, *Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1517-32.
79. Auro, K., et al., *Combined effects of thrombosis pathway gene variants predict cardiovascular events*. PLoS Genet, 2007. **3**(7): p. e120.
80. Martinelli, N., et al., *Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1523.
81. Sucker, C., et al., *The TT genotype of the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor in thrombotic microangiopathies: results from a pilot study*. Clin Appl Thromb Hemost, 2009. **15**(3): p. 283-8.
82. Sucker, C., et al., *The G1691A mutation of the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A mutation of the prothrombin gene as risk factors in thrombotic microangiopathies*. Clin Appl Thromb Hemost, 2009. **15**(3): p. 360-3.

83. Sucker, C., et al., *Are prothrombotic variants of platelet glycoprotein receptor polymorphisms involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies?* Clin Appl Thromb Hemost, 2009. **15**(4): p. 402-7.
84. Tsantes, A.E., et al., *The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk.* Thromb Res, 2008. **122**(6): p. 736-42.
85. Liu, S.Q., et al., *[Relationship between plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism and type 2 diabetic nephropathy in Chinese Han patients in Guangdong Province].* Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004. **24**(8): p. 904-7.
86. Aucella, F., et al., *PAI-1 4G/5G and ACE I/D gene polymorphisms and the occurrence of myocardial infarction in patients on intermittent dialysis.* Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(6): p. 1142-6.
87. Rerolle, J.P., et al., *PAI-1 donor polymorphism influences long-term kidney graft survival.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(10): p. 3325-32.

Table 1. Polymorphisms evaluated in present study

Gene	rs	Allelic variation	Localization	Usual name
<i>FGB</i>	rs1800790	-445 G>A	promoter	β chain fibrinogen
<i>F2</i>	rs1799963	20210 G>A	3'UTR	Prothrombin
<i>F5</i>	rs6025	1691 G>A	R506Q	Factor V leiden
<i>F7</i>	rs5742910	-323 del/ins(10bp)	promoter	Factor VII
<i>F13A1</i>	rs5985	103G>T	V35L	Factor XIII
<i>PLAT</i>	rs4646972	Ins/del 311bp	Intron 8	tPA or PLAT
<i>PAI-1</i>	rs1799768	-675 5G/4G	promoter	PAI-1 or SERPINE1
<i>ITGB3</i>	rs5918	176T>C	L59P	GPIIIa
<i>MTHFR</i>	rs1801133	677C>T	A222V	MTHFR

Table 2. Clinical characteristics of type 2 diabetes patients according to microvascular complications

	DN			DR			DSN		
	(n = 389)			(n = 355)			(n = 260)		
	Controls	Cases	P	Controls	Cases	P	Controls	Cases	P
Patients (%)	37.5	62.5		34.4	65.6		53.1	46.9	
Gender (% male)	38.4	57.2	0.00	42.6	53.6	0.06	50.0	47.5	0.79
Age (Years)	60.9±8.6	62.1±9.1	0.28	60.9±8.0	62.0±9.1	0.16	61.5±8.4	62.2±9.0	0.54
T2DM duration (years)	15.1±6.5	16.8±9.5	0.34	14.3±7.7	17.1±8.7	0.00	15.6±7.3	16.7±9.5	0.67
Fasting Glucose (mg/dL)	164.9±62.6	173.9±73.2	0.50	169.8±62.5	167.3±69.3	0.49	172.0±65.2	172.1±80.4	0.47
GHb (%)	7.0±1.9	6.7±1.9	0.21	6.6±1.9	7.0±1.9	0.03	6.9±1.7	6.4±1.6	0.02
BMI (Kg/m²)	27.6±4.6	28.6±5.4	0.12	28.5±4.8	27.9±5.3	0.25	28.5±4.5	27.6±4.6	0.15
Waist Circumference (cm)	95.6±10.9	100.0±12.5	0.00	97.0±11.8	98.0±11.7	0.55	99.2±11.0	96.4±12.9	0.13
Serum Creatinine (µmol/L)	0.8±0.2	2.4±2.5	0.00	1.2±1.5	2.1±2.2	0.00	1.2±1.1	2.1±2.4	0.00
Total Cholesterol (mmol/L)	206.0±40.6	206.5±47.1	0.92	210.4±42.0	205.4±46.7	0.37	200.4±47.1	212.8±44.5	0.03
HDL Cholesterol (mmol/L)	46.1±11.0	43.3±12.1	0.01	45.1±12.8	43.6±11.5	0.27	45.6±11.8	44.6±13.1	0.29
LDL Cholesterol (mmol/L)	128.5±37.2	128.8±43.3	0.96	129.7±37.8	131.1±43.1	0.79	123.3±41.8	137.2±41.4	0.01
Triglycerides (mmol/L)	170.4±96.7	186.1±117.7	0.22	175.3±102.7	182.2±111.3	0.49	167.3±98.8	186.4±133.0	0.36
Systolic BP (mmHg)	143.4±22.4	148.0±23.6	0.12	142.6±21.0	147.8±24.2	0.06	142.7±20.9	147.3±24.5	0.07
Diastolic BP (mmHg)	86.1±13.4	85.8±13.8	0.68	86.9±14.7	85.9±13.0	0.52	85.9±13.7	84.8±13.8	0.49
Hypertension (%)	73.6	81.2	0.11	73.7	80.0	0.24	73.6	78.8	0.42

Data are mean ± s.d., unless otherwise indicated.

Abbreviations: BP, Blood Pressure; BMI, Body Mass Index; DN, Diabetic Nephropathy; DR, Diabetic Retinopathy; DSN, Distal Sensory Neuropathy

Table 3. Minor allelic frequency and genotype of the polymorphisms according to microvascular complication

		DN (n = 389)			DR (n = 355)			DSN (n = 260)		
		Controls	Cases	P	Controls	Cases	P	Controls	Cases	P
Patients (%)		38.3	61.7		34.4	65.6		53.1	46.9	
<i>FGB</i> rs1800790										
-445G>A	A	0.18	0.17	0.843	0.21	0.16	0.258	0.19	0.19	0.996
	GG	0.67	0.67		0.61	0.69		0.65	0.63	
	GA	0.31	0.32		0.37	0.30		0.32	0.36	
	AA	0.02	0.01	0.394	0.02	0.01	0.412	0.03	0.01	0.538
<i>F2</i> rs1799963										
20210G>A	A	0.03	0.02	0.731	0.02	0.03	0.736	0.03	0.03	0.807
	GG	0.94	0.95		0.96	0.94		0.94	0.94	
	GA	0.06	0.05		0.04	0.06		0.06	0.06	
	AA	0.00	0.00	0.727	0.00	0.00	0.732	0.00	0.00	0.999
<i>F5</i> rs6025										
1691G>A	A	0.02	0.03	0.868	0.02	0.02	0.994	0.02	0.03	0.633
	GG	0.97	0.95		0.96	0.96		0.96	0.95	
	GA	0.03	0.04		0.04	0.03		0.04	0.03	
	AA	0.00	0.01	0.476	0.00	0.01	0.513	0.00	0.02	0.295
<i>F7</i> rs5742910										
-323 del/ins (10bp)	I	0.14	0.13	0.790	0.15	0.13	0.504	0.15	0.12	0.383
	DD	0.73	0.75		0.72	0.74		0.72	0.78	
	DI	0.26	0.24		0.25	0.25		0.26	0.21	
	II	0.01	0.01	0.900	0.03	0.01	0.581	0.02	0.01	0.585
<i>F13A1</i> rs5985										
103G>T	T	0.23	0.23	0.964	0.25	0.23	0.637	0.21	0.27	0.183
	GG	0.60	0.59		0.57	0.60		0.63	0.54	
	GT	0.34	0.36		0.37	0.34		0.33	0.39	
	TT	0.06	0.05	0.919	0.06	0.06	0.849	0.04	0.07	0.354
<i>PLAT</i> rs4646972										
Ins/del(311 bp)	I	0.53	0.50	0.582	0.54	0.52	0.592	0.50	0.48	0.708
	II	0.30	0.29		0.33	0.30		0.32	0.27	
	DI	0.45	0.43		0.43	0.43		0.36	0.43	
	DD	0.25	0.28	0.797	0.24	0.30	0.844	0.32	0.30	0.446

Table 3. continued

<i>PAI-1</i> rs1799768										
-675 5G/4G	4G	0.50	0.40	0.016	0.46	0.43	0.549	0.46	0.42	0.353
	5G5G	0.23	0.36		0.29	0.31		0.27	0.32	
	5G4G	0.54	0.47		0.50	0.51		0.53	0.53	
	4G4G	0.22	0.17	0.029	0.21	0.17	0.736	0.19	0.15	0.567
<i>ITGB3</i> rs5918										
176T>C	C	0.16	0.17	0.875	0.16	0.17	0.815	0.16	0.18	0.571
	TT	0.71	0.73		0.75	0.71		0.75	0.69	
	TC	0.26	0.21		0.19	0.24		0.19	0.27	
	CC	0.03	0.06	0.163	0.06	0.15	0.578	0.06	0.04	0.269
<i>MTHFR</i> rs1801133										
677C>T	T	0.34	0.29	0.172	0.33	0.30	0.409	0.31	0.31	0.947
	CC	0.39	0.51		0.43	0.49		0.44	0.46	
	CT	0.53	0.41		0.49	0.43		0.50	0.45	
	TT	0.08	0.08	0.070	0.08	0.08	0.552	0.06	0.09	0.646

Abbreviations: DN, Diabetic Nephropathy; DR, Diabetic Retinopathy; DSN, Distal Sensory Neuropathy.

Genotype and allele frequencies were compared using the χ^2 test.

Table 4. Distribution of alleles and genotypes of the polymorphism *PAI-1* rs1799768 according to the severity of diabetic nephropathy

	normoalbuminuria		microalbuminuria		macroalbuminuria + dialysis		P
	n (%)	AR	n (%)	AR	n (%)	AR	
Allele							
5G	147 (50.3)	-2.48	91 (54.2)	-0.53	176 (62.9)	2.95	0.009
4G	145 (49.7)	2.48	77 (45.8)	0.53	104 (37.1)	-2.95	
Genotypes							
5G5G	34 (23.3)	-2.60	26 (31.0)	0.00	55 (39.3)	2.70	0.032
5G4G	79 (54.1)	1.40	39 (46.4)	-0.70	66 (47.1)	-0.80	
4G4G	33 (22.6)	0.90	19 (22.6)	0.90	19 (13.6)	-2.10	
5G5G	34 (23.3)	-2.60	26 (31.0)	0.00	55 (39.3)	2.70	0.014
5G4G+4G4G	112 (76.7)	2.60	58 (69.0)	0.00	85 (60.7)	-2.70	
5G5G+5G4G	112 (76.7)	-1.50	65 (77.4)	-0.80	121 (86.4)	2.20	0.082
4G4G	34 (23.3)	1.50	19 (22.6)	0.80	19 (13.6)	-2.20	

AR; Adjusted Residual

The value [AR] > 1.96 is considered statistically significant.

Table 5. Ischemic heart disease and diabetic nephropathy stratified according to the severity

IHD	normoalbuminuria		microalbuminuria		macroalbuminuria + dialysis		P			
	n	(%)	AR	n	(%)	AR				
Absent	74	(57.8)	2.2	40	(52.6)	0.5	55	(41.7)	-2.5	0.03
Present	54	(42.2)	-2.2	36	(47.4)	-0.5	77	(58.3)	2.5	

AR; Adjusted Residual; IHD; ischemic heart disease

The value [AR] > 1.96 is considered statistically significant.

Table 6. Genotypes of the *PAI-1* rs1799768 according to the severity of the diabetic nephropathy stratified for ischemic heart disease

	IHD	normoalbuminuria		microalbuminuria		macroalbuminuria + dialysis		P
		n (%)	AR	n (%)	AR	n (%)	AR	
Genotypes								
5G5G	Absent	15 (55.6)	0.70	11 (47.8)	-0.20	24 (47.1)	-0.50	0.762
	Present	12 (44.4)	-0.70	12 (52.2)	0.20	27 (52.9)	0.50	
5G4G+4G4G	Absent	59 (60.2)	1.90	27 (56.3)	0.50	31 (41.3)	-2.50	0.042
	Present	39 (39.8)	-1.90	21 (43.8)	-0.50	44 (58.7)	2.50	

AR; Adjusted Residual; IHD; ischemic heart disease

The value [AR] > 1.96 is considered statistically significant.

Capítulo 5: Discussão Geral

Capítulo 5: Discussão geral

Pacientes com DM2 apresentam uma alta taxa de morbidade e mortalidade, cerca de 80%, principalmente devido ao desenvolvimento de complicações crônicas, especialmente as micro e macrovasculares, sendo que 30 a 50% dos pacientes só descobrem ter a doença pelo diagnóstico da complicação. Existem fatores de risco clássicos: a hipertensão, obesidade, hiperglicemia, resistência insulínica, dislipidemia aliados a outros, tais como a origem étnica e a predisposição genética (de Oliveira et al. 2009; Gerchman et al. 2008; Kramer et al. 2009; Rathmann & Giani 2004; Ryden et al. 2007).

A maior parte das complicações vasculares está associada com a disfunção endotelial que inicia precocemente associada com a resistência insulínica inicial até o desenvolvimento do quadro inflamatório associado à hiperglicemia e a dislipidemia que promovem desde alterações na permeabilidade vascular como o processo aterosclerótico (Grant 2007; Grover-Paez et al. 2009). Além disso, o estado protrombótico em DM2 pode se manifestar de diferentes formas e já tem início na fase de hiperinsulinemia inicial seguida pela fase de resistência insulínica. A doença nesta fase pode passar totalmente despercebida embora os sintomas protrombóticos já possam dar sinais do seu aparecimento acabando por evoluir significativamente com o desenvolvimento das complicações vasculares (Grant 2007). A disfunção endotelial progride e pode ser acompanhada por uma série de fatores envolvidos no processo inflamatório que acabam por evidenciar o desenvolvimento de um quadro protrombótico de modo concomitante com a evolução do DM2, principalmente associado com a obesidade e o processo de aterogênese (Ajjan & Ariens 2009; Goldberg 2009; Stratmann & Tschoepe 2009).

O aumento da secreção de alguns fatores hemostáticos, tais como o FvW e o PAI-1 e a diminuição na secreção do tPA pelo endotélio vascular (Ajjan & Ariens 2009; Goldberg 2009) são marcantes. Estas alterações, aliadas ao quadro inflamatório que também aumenta a secreção de proteínas hepáticas, tais como o FVII e o fibrinogênio, contribui ainda mais para esse estado protrombótico com aumento da hipercoagulabilidade

e da hipofibrinólise (Ajjan & Ariens 2009; Erem et al. 2005; Goldberg 2009; Stratmann & Tschoepe 2009).

Dentro deste contexto, pode-se supor que o efeito, embora usualmente pequeno dos polimorfismos relacionados com a hemostasia, possa fazer a diferença entre desenvolver ou não alguma complicação vascular para os portadores das variantes de risco.

Neste trabalho foram investigados polimorfismos relacionados com a hemostasia e que podem ter sua expressão alterada devido à disfunção endotelial e/ou o quadro inflamatório associado. Os pacientes com DM2 eram todos eurodescendentes e foram separados em casos para aqueles que apresentaram a complicação e controles para os que não tinham a respectiva complicação. Desta forma se usou um controle interno, que minimizou as diferenças que poderiam estar presentes principalmente no aspecto protrombótico. Além disso, para serem considerados controles, os pacientes com DM2 não podiam ter desenvolvido a complicação microvascular em estudo por pelo menos 10 anos enquanto que no caso da complicação macrovascular, pelo menos por 5 anos.

Mesmo com um controle interno forte, ou talvez, exatamente por isso, não se encontrou associação com as complicações micro e macrovasculares para a maioria deles. Uma grande parte dos estudos que acabam identificando associação com algum desfecho vascular está representado por amostras pequenas (Bersano et al. 2008). Mesmo assim, a utilização dos polimorfismos de risco, especialmente aqueles que demonstram ser funcionais deve ser levada em consideração para estabelecer um menor ou maior risco no desenvolvimento da complicação. Devido ao pequeno efeito da maioria dos polimorfismos, alguns autores sugerem a sua utilização combinada. Quando estão envolvidos numa rota comum e são sinérgicos pode-se encontrar algum grau de associação muito mais significativo do que simplesmente a soma de variantes de risco (Auro et al. 2007; Martinelli et al. 2008; Szolnoki et al. 2003).

No presente trabalho tentou-se estabelecer diferentes combinações, tanto para somar, como para combinar os efeitos dos respectivos polimorfismos que estavam trabalhando numa rota comum, mas os resultados preliminares usando-se estatística

univariada não identificaram associação significativa (dados não mostrados). Entre as explicações, pode-se supor que a amostra passa a ser considerada pequena quando se deseja encontrar duas ou mais variantes raras e de risco em um mesmo indivíduo. Outra explicação pode ser atribuída a natureza multifatorial da complicação vascular. Desse modo um pequeno risco, pode ser compensado totalmente por outro ou anulado pelo efeito do ambiente. Mesmo assim, foi possível encontrar associação de dois polimorfismos estudados no presente trabalho com complicações micro e macrovasculares.

No caso das complicações macrovasculares, encontrou-se uma associação do alelo 176C do ITGB rs5918 com AVCI e PAD. Esse alelo determina a formação da integrina beta 3 alterada com uma leucina no lugar da prolina no resíduo 59. Estudos *in vitro* têm sugerido que a variante 59L possa representar um estado pré-ativado na superfície plaquetária (Stafford et al. 2008; Vijayan & Bray 2006). Porém, estudos que envolvem essa variante apresentam resultados contraditórios em alguns trabalhos envolvendo o desfecho AVC, embora os autores sugiram uma maior tendência para a associação (Bersano et al. 2008). O fato de encontrarmos associação desta variante com DAP e AVCI em pacientes com DM2 pode significar que esse peptídeo ITGB3 59L tenha a sua função alterada favorecida pelo ambiente inflamatório e de hiperagregabilidade plaquetária que se desenvolve em parte, por alterações endoteliais, as quais também são controladoras da atividade plaquetária (El Haouari & Rosado 2008; Schafer & Bauersachs 2008).

Já no caso das complicações microvasculares, o polimorfismo que se encontrou associação foi o do *PAI-1* rs1799768 com a ND. Novamente, o fato de não se encontrar associação com os outros polimorfismos estudados não significa que sejam pouco importantes ou não funcionais, mas sim que podem não representar um risco maior dentro da natureza multifatorial que envolve o desenvolvimento da complicação vascular ou ainda uma limitação do presente estudo devido ao tamanho amostral pequeno.

No caso do polimorfismo *PAI-1* rs1799768 encontrou-se uma associação não esperada num primeiro momento. O alelo de risco 4G está usualmente associado com aumento da secreção do PAI-1 e, por conseguinte, com a diminuição da fibrinólise e, portanto, como um possível fator de risco trombótico (Tsantes et al. 2008). Entretanto, em

nosso estudo encontramos que este alelo apresentaria, num primeiro momento, um suposto efeito protetor para ND, mesmo depois da análise de regressão ajustada pelas variáveis de confusão.

Esse resultado inesperado requereu uma análise dentro da classe dos pacientes com ND. Sendo assim, os pacientes com ND foram estratificados de acordo com a progressão da doença classificada pela albuminúria em pacientes que tinham somente microalbuminúria e pacientes com macroalbuminúria que necessitavam ou não de diálise.

Assim, a comparação de pacientes controles (com normoalbuminúria) com pacientes com microalbuminúria sugere que o alelo de risco 4G não estava influenciando na progressão da ND ($P = 0.404$).

Porém, quando se examina os pacientes com a doença renal em estágio mais avançado, encontra-se uma diminuição significativa na frequência do alelo 4G. Para explicar essa diminuição, seria necessário um estudo de coorte que acompanhasse os pacientes durante a progressão da doença renal em direção ao seu estágio final e pudesse verificar se o alelo 4G estaria contribuindo para aumentar a taxa de mortalidade. Num estudo caso controle não é possível determinar se é a mortalidade que está associada a essa queda no alelo 4G, porém resultados semelhantes em um estudo que comparava normoalbuminúrios com pacientes em hemodiálise já foram descritos (Al-Muhanna et al. 2008).

Cabe salientar a existência de diferentes estudos que demonstram um grande incremento na taxa de mortalidade quando se passa de micro para macroalbuminúria e seguindo para o estágio final da doença renal (Bruno et al. 2000; Ito et al. 2009; Lewis 1999; Zelmanovitz et al. 2009). Talvez, isso pudesse ser usado como uma sugestão para explicar que os portadores do alelo 4G, e em especial, os homocigotos pudessem ter um maior comprometimento da função renal ou de outra complicação associada, tal como as complicações cardíacas e que, na sua maioria levam a óbito o paciente com a ND.

Sabe-se que o PAI-1 atua na plasmina, a qual não desempenha apenas um papel importante na fibrinólise, mas também atua na remodelação da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Assim, a expressão aumentada do PAI-1 em indivíduos com o alelo 4G diminui a atividade da plasmina e contribui para as mudanças glomerulares que acelerarão o processo de fibrose glomerular levando o paciente rapidamente para a ESRD (Brosius 2008; Ha et al. 2009). Na progressão da doença renal, o PAI-1 estaria atuando localmente e deste modo pequenas variações na sua expressão causadas principalmente pelo polimorfismo genético, irão afetar o leito vascular correspondente e, é claro, a matriz extracelular do endotélio vascular no leito envolvido (Brazionis et al. 2008). Estudos com transplantados renais reforçam essa idéia de atuação local, uma vez que doadores 4G4G apresentam um risco maior de rejeição com evidências de esclerose e fibrose nos rins que sofreram rejeição (Rerolle et al. 2008). Também, estudos que utilizam tPA recombinante em pacientes com fibrose renal tem evitado a progressão da doença renal e até promovido a sua recuperação evidenciando novamente a importância da expressão do PAI-1 local, a qual pode ser dependente do polimorfismo. Entretanto, os autores também sugerem que o aumento de risco de complicações vasculares e da própria DN em pacientes com DM2 pode ser devido à presença do alelo de risco e seu possível efeito de diminuição na fibrinólise (Ha et al. 2009).

Outro aspecto interessante reside no fato que indivíduos com ND e portadores do alelo 4G apresentam maior chance de desenvolver cardiopatia isquêmica, conforme o teste do χ^2 com a análise de resíduos sugeriu ($P = 0.042$; $AR = 2.5$). Este resultado demonstra que o alelo de risco 4G está associado com uma complicação cardíaca e devemos lembrar que elas são as principais causadoras da mortalidade durante a progressão da DN (Bruno & Gross 2000).

Além disso, deve-se salientar que as complicações microvasculares frequentemente coexistem com as macrovasculares (Hadi et al. 2007; Krentz et al. 2007; Stratmann & Tschoepe 2009). Desta forma, talvez fosse interessante verificar se os polimorfismos estudados não influenciam de modo significativo em complicações vasculares que coexistem, ou ainda, se a presença de mais de uma complicação vascular pode ser influenciada por alguma variante genética da hemostasia. Como o estudo de caso controle

apresenta limitações quando os desfechos estudados apresentam taxas de mortalidade diferenciais, pode-se sugerir que um estudo de coorte que acompanhasse os pacientes com DM2 ao longo do tempo em que desenvolvem as complicações vasculares poderia esclarecer quais são os polimorfismos de risco e em que momento da doença eles contribuem para a morbidade e mortalidade nestes pacientes. Além disso, parece evidente que o estado inflamatório altera a hemostasia. Além disso, alguns genes da função hemostática podem desempenhar mais funções além da hemostática. Dessa forma, pode ser interessante também, estudar polimorfismos que alterem a função inflamatória e/ou hemostática para observar como os seus efeitos interagem sobre o sistema vascular não só em nível de hemostasia, mas também na remodelação da matriz extracelular do subendotélio e logicamente, da integridade vascular.

Referências Bibliográficas

Ajjan RA, Ariens RA. Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state. *Blood Rev* 2009; 23 (2):67-78.

Al-Muhanna F, Al-Mueilo S, Al-Ali A et al. Polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase, plasminogen activator inhibitor-1, and apolipoprotein E in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008; 19 (6):937-41.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366 (9491):1059-62.

Alwakeel JS, Al-Suwaida A, Isnani AC et al. Concomitant macro and microvascular complications in diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20 (3):402-9.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009a; 32 Suppl 1:S62-7.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 2009b; 32 Suppl 1:S13-61.

Asselbergs FW, Pattin K, Snieder H et al. Genetic architecture of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34 (6):562-8.

Auro K, Alanne M, Kristiansson K et al. Combined effects of thrombosis pathway gene variants predict cardiovascular events. *PLoS Genet* 2007; 3 (7):e120.

Bajt ML, Loftus JC, Gawaz MP et al. Characterization of a gain of function mutation of integrin alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa). *J Biol Chem* 1992; 267 (31):22211-6.

Bersano A, Ballabio E, Bresolin N et al. Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke. *Hum Mutat* 2008; 29 (6):776-95.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369 (6475):64-7.

Bonadonna RC, Cucinotta D, Fedele D et al. The metabolic syndrome is a risk indicator of microvascular and macrovascular complications in diabetes: results from Metascreen, a multicenter diabetes clinic-based survey. *Diabetes Care* 2006; 29 (12):2701-7.

Boronat M, Saavedra P, Varillas VF et al. Use of confirmatory factor analysis for the identification of new components of the metabolic syndrome: the role of plasminogen activator inhibitor-1 and Haemoglobin A1c. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19 (4):271-6.

Brazionis L, Rowley K, Jenkins A et al. Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28 (4):786-91.

Brosius FC, 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9 (4):245-54.

Brown WV. Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. *Am J Cardiol* 2008; 102 (12A):10L-3L.

Brown WV, Fujioka K, Wilson PW et al. Obesity: why be concerned? *Am J Med* 2009; 122 (4 Suppl 1):S4-11.

Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* 2000; 14 (5):266-71.

Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther* 2008; 88 (11):1322-35.

Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost* 1994; 72 (1):1-15.

Calvete JJ. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208 (4):346-60.

Camire RM, Bos MH. The molecular basis of Factor V and VIII procofactor activation. *J Thromb Haemost* 2009.

Camire RM, Kalafatis M, Simioni P et al. Platelet-derived factor Va/Va Leiden cofactor activities are sustained on the surface of activated platelets despite the presence of activated protein C. *Blood* 1998a; 91 (8):2818-29.

Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K et al. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood* 1998b; 92 (9):3035-41.

Carmel R, Green R, Rosenblatt DS et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:62-81.

Carter AM, Mansfield MW, Grant PJ. Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998; 15 (4):315-9.

Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH et al. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19 (11):1265-8.

Coulam CB, Wallis D, Weinstein J et al. Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60 (5):426-31.

Curtis J, Wilson C. Preventing type 2 diabetes mellitus. *J Am Board Fam Pract* 2005; 18 (1):37-43.

Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008; 112 (1):19-27.

Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 1994; 24 (2):139-51.

Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G et al. The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 2004; 104 (2):428-35.

de Oliveira AF, Valente JG, Leite Ida C et al. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. *Cad Saude Publica* 2009; 25 (6):1234-44.

De Taeye B, Smith LH, Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5 (2):149-54.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004; 88 (4):787-835, ix.

Demacker PN. The metabolic syndrome: definition, pathogenesis and therapy. *Eur J Clin Invest* 2007; 37 (2):85-9.

Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003; 423 (6940):599-602.

Duckworth W, Abraira C, Moritz T et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360 (2):129-39.

El Haouari M, Rosado JA. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41 (1):119-23.

Erem C, Hacıhasanoglu A, Celik S et al. Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications. *Med Princ Pract* 2005; 14 (1):22-30.

Errera FI, Silva ME, Yeh E et al. Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39 (7):883-8.

Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* 2008; 26 (2):77-82.

Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 (1):111-3.

Gaughan DJ, Barboux S, Kluijtmans LA et al. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000; 257 (2):279-89.

Gaylor AS, Condren ME. Type 2 diabetes mellitus in the pediatric population. *Pharmacotherapy* 2004; 24 (7):871-8.

Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 2001; 28 (4):389-92.

Gerchman F, Zanatta CM, Burtet LM et al. Vascular complications of black patients with type 2 diabetes mellitus in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41 (8):668-73.

Gerich JE. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 2003; 78 (4):447-56.

Gerstein HC, Miller ME, Byington RP et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358 (24):2545-59.

Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (9):3171-82.

Goyette P, Pai A, Milos R et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9 (8):652-6.

Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* 2007; 262 (2):157-72.

Grant PJ, Humphries SE. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12 (3):505-32.

Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 84 (1):1-10.

Ha H, Oh EY, Lee HB. The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5 (4):203-11.

Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3 (6):853-76.

Hancer VS, Diz-Kucukkaya R, Bilge AK et al. The association between factor XIII Val34Leu polymorphism and early myocardial infarction. *Circ J* 2006; 70 (3):239-42.

Hermans MP, Gala JL, Buysschaert M. The MTHFR CT polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2006; 23 (5):529-36.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359 (15):1577-89.

Humphries S, Temple A, Lane A et al. Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost* 1996; 75 (4):567-72.

Iacoviello L, Vischetti M, Zito F et al. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001; 38 (5):1199-203.

Ito H, Takeuchi Y, Ishida H et al. High frequencies of diabetic micro- and macroangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus with decreased estimated glomerular filtration rate and normoalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant* 2009.

Kain K, Young J, Bavington J et al. Coagulation factor XIII B subunit antigen, FXIIIVal34Leu genotype and ischaemic stroke in South Asians. *Thromb Haemost* 2005; 93 (2):394-5.

Kang SS, Wong PW, Susmano A et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48 (3):536-45.

Kang SS, Zhou J, Wong PW et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43 (4):414-21.

Kelly TN, Bazzano LA, Fonseca VA et al. Glucose Control and Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes. *Ann Intern Med* 2009.

Knowles JW, Wang H, Itakura H et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2007; 154 (6):1052-8.

Kobbervig C, Williams E. FXIII polymorphisms, fibrin clot structure and thrombotic risk. *Biophys Chem* 2004; 112 (2-3):223-8.

Korner J, Woods SC, Woodworth KA. Regulation of energy homeostasis and health consequences in obesity. *Am J Med* 2009; 122 (4 Suppl 1):S12-8.

Kozieradzka A, Kaminski K, Pepinski W et al. The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa gene. *Acta Diabetol* 2007; 44 (1):30-3.

Kramer CK, Leitao CB, Pinto LC et al. Risk factors for micro and macrovascular disease in black and white patients with type 2 diabetes mellitus. *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55 (3):308-14.

Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9 (6):781-91.

Ladenvall P, Nilsson S, Jood K et al. Genetic variation at the human tissue-type plasminogen activator (tPA) locus: haplotypes and analysis of association to plasma levels of tPA. *Eur J Hum Genet* 2003; 11 (8):603-10.

Lam KS, Ma OC, Wat NM et al. Beta-fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia* 1999; 42 (10):1250-3.

Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95 (5):1517-32.

Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005; 307 (5708):373-5.

Le Gal G, Delahousse B, Lacut K et al. Fibrinogen Aalpha-Thr312Ala and factor XIII-A Val34Leu polymorphisms in idiopathic venous thromboembolism. *Thromb Res* 2007; 121 (3):333-8.

Lewis JB. Diabetic nephropathy in patients with type II diabetes. *Geriatr Nephrol Urol* 1999; 9 (3):167-75.

Liu Y, Berthier-Schaad Y, Fink NE et al. Beta-fibrinogen haplotypes and the risk for cardiovascular disease in a dialysis cohort. *Am J Kidney Dis* 2005; 46 (1):78-85.

Ludwig M, Wohn KD, Schleuning WD et al. Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. *Hum Genet* 1992; 88 (4):388-92.

MacCallum PK. Markers of hemostasis and systemic inflammation in heart disease and atherosclerosis in smokers. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2 (1):34-43.

Maeda M, Yamamoto I, Fukuda M et al. MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2008; 22 (2):119-25.

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 (11):1509-16.

Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thromb Haemost* 1995; 74 (4):1032-4.

Marcucci R, Bertini L, Giusti B et al. Thrombophilic risk factors in patients with central retinal vein occlusion. *Thromb Haemost* 2001; 86 (3):772-6.

Martinelli N, Trabetti E, Pinotti M et al. Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis. *PLoS One* 2008; 3 (2):e1523.

Marz W, Boehm BO, Winkelmann BR et al. The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with the risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Diabetologia* 2004; 47 (11):1969-73.

Mendes AB, Fittipaldi JA, Neves RC et al. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brazil. *Acta Diabetol* 2009.

Morozumi T, Sharma A, De Nardin E. The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the beta-fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms. *Immunol Invest* 2009; 38 (3-4):311-23.

Muszbek L, Bagoly Z, Bereczky Z et al. The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6 (3):190-205.

Nagy V, Takacs L, Steiber Z et al. Thrombophilic screening in retinal artery occlusion patients. *Clin Ophthalmol* 2008; 2 (3):557-61.

Naik UP, Parise LV. Structure and function of platelet alpha IIb beta 3. *Curr Opin Hematol* 1997; 4 (5):317-22.

Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care* 2007; 30 (3):753-9.

Nazimek-Siewniak B, Moczulski D, Grzeszczak W. Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes: results of longitudinal study design. *J Diabetes Complications* 2002; 16 (4):271-6.

Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:206-9.

Oksala NK, Heikkinen M, Mikkelsen J et al. Smoking and the platelet fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa P1A1/A2 polymorphism interact in the risk of lacunar stroke and midterm survival. *Stroke* 2007; 38 (1):50-5.

Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53 (5 Suppl):S35-42.

Orozco LJ, Buchleitner AM, Gimenez-Perez G et al. Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (3):CD003054.

Patel A, MacMahon S, Chalmers J et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358 (24):2560-72.

Perez-Martinez P, Adarraga-Cansino MD, Fernandez de la Puebla RA et al. The -675 4G/5G polymorphism at the Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) gene modulates plasma Plasminogen Activator Inhibitor 1 concentrations in response to dietary fat consumption. *Br J Nutr* 2008; 99 (4):699-702.

Phillips LS, Ziemer DC, Kolm P et al. Glucose challenge test screening for prediabetes and undiagnosed diabetes. *Diabetologia* 2009; 52 (9):1798-807.

Poglajen G, Kirbis J, Milutinovic A. The -455G/A polymorphism of the beta fibrinogen gene and the Bgl II polymorphism of the alpha2beta1 integrin gene and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Folia Biol (Praha)* 2004; 50 (6):203-4.

Pollak ES, Hung HL, Godin W et al. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem* 1996; 271 (3):1738-47.

Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4:17.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88 (10):3698-703.

Preis SR, Pencina MJ, Hwang SJ et al. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the framingham heart study. *Circulation* 2009; 120 (3):212-20.

Rahimi Z, Nomani H, Mozafari H et al. Factor V G1691A, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T are not associated with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus in western Iran. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20 (4):252-6.

Rahman S, Rahman T, Ismail AA et al. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9 (6):767-80.

Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27 (10):2568-9; author reply 9.

Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S et al. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* 2009; 373 (9677):1765-72.

Renner W, Cichocki L, Forjanics A et al. G-455A polymorphism of the fibrinogen beta gene and deep vein thrombosis. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 (10):755-8.

Rerolle JP, Munteanu E, Drouet M et al. PAI-1 donor polymorphism influences long-term kidney graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 (10):3325-32.

Resnick HE, Howard BV. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 2002; 53:245-67.

Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH et al. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (9):1687-90.

Robinson SD, Ludlam CA, Boon NA et al. Tissue plasminogen activator genetic polymorphisms do not influence tissue plasminogen activator release in patients with coronary heart disease. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (10):2262-9.

Roldan V, Marin F, Gonzalez-Conejero R et al. Factor VII -323 decanucleotide D/I polymorphism in atrial fibrillation: implications for the prothrombotic state and stroke risk. *Ann Med* 2008; 40 (7):553-9.

Rosenbloom AL, Silverstein JH, Amemiya S et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guideline 2006-2007. Type 2 diabetes mellitus in the child and adolescent. *Pediatr Diabetes* 2008; 9 (5):512-26.

Ryan JG. Cost and policy implications from the increasing prevalence of obesity and diabetes mellitus. *Gend Med* 2009; 6 Suppl 1:86-108.

Ryden L, Standl E, Bartnik M et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007; 28 (1):88-136.

Sabater-Lleal M, Chillon M, Howard TE et al. Functional analysis of the genetic variability in the *F7* gene promoter. *Atherosclerosis* 2007; 195 (2):262-8.

Saely CH, Muendlein A, Vonbank A et al. Type 2 diabetes significantly modulates the cardiovascular risk conferred by the PAI-1 -675 4G/5G polymorphism in angiographed coronary patients. *Clin Chim Acta* 2008; 396 (1-2):18-22.

Santos KG, Tschiedel B, Schneider J et al. 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 (2):133-6.

Sartori M, Favaretto E, Legnani C et al. G20210A prothrombin mutation and critical limb ischaemia in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 38 (1):113-7.

Schafer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2008; 6 (1):52-60.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML et al. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes* 2003; 52 (8):1888-96.

Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO et al. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA diabetes trials: a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association. *Diabetes Care* 2009; 32 (1):187-92.

Slavik L, Krcova V, Hlusi A et al. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009; 153 (1):19-25.

Sodi A, Giambene B, Marcucci R et al. Atherosclerotic and thrombophilic risk factors in patients with recurrent central retinal vein occlusion. *Eur J Ophthalmol* 2008; 18 (2):233-8.

Spijkerman AM, Henry RM, Dekker JM et al. Prevalence of macrovascular disease amongst type 2 diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: the Hoorn Screening Study. *J Intern Med* 2004; 256 (5):429-36.

Stafford P, Ghevaert C, Campbell K et al. Immunologic and structural analysis of eight novel domain-deletion beta3 integrin peptides designed for detection of HPA-1 antibodies. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (2):366-75.

Stratmann B, Tschoepe D. Atherogenesis and atherothrombosis--focus on diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23 (3):291-303.

Sun J, Xu Y, Xue J et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229 (1-2):95-101.

Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A et al. Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74 (12):1615-20.

Tavakkoly Bazzaz J, Shojapoor M, Nazem H et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in diabetes and obesity. *Mol Biol Rep* 2009.

Tfayli H, Bacha F, Gungor N et al. Phenotypic type 2 diabetes in obese youth: insulin sensitivity and secretion in islet cell antibody-negative versus -positive patients. *Diabetes* 2009; 58 (3):738-44.

Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG et al. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res* 2008; 122 (6):736-42.

Tschoepe D, Menart B, Ferber P et al. Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2003; 46 (7):984-9.

van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F et al. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction. The Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 95 (12):2623-7.

van Goor ML, Garcia EG, Leebeek F et al. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study. *Thromb Haemost* 2005; 93 (1):92-6.

Venables MC, Jeukendrup AE. Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25 Suppl 1:S18-23.

Vijayan KV, Bray PF. Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231 (5):505-13.

Vine AK. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina* 2009; 29 (1):1-7.

Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24 (2):216-29.

Vysokovsky A, Saxena R, Landau M et al. Seven novel mutations in the factor XIII A-subunit gene causing hereditary factor XIII deficiency in 10 unrelated families. *J Thromb Haemost* 2004; 2 (10):1790-7.

Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG et al. Insulin resistance, haemostatic and inflammatory markers and coronary heart disease risk factors in Type 2 diabetic men with and without coronary heart disease. *Diabetologia* 2004; 47 (9):1557-65.

Wild S, Roglic G, Green A et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27 (5):1047-53.

Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP et al. Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1 (1):10.

Zintzaras E, Chatzoulis DZ, Karabatsas CH et al. The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2005; 50 (6):267-75.

Anexos

FICHA CLÍNICA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE DIABÉTICO

DM nº: _____ Hospital: _____ Prontuário: _____ Data: ___/___/___

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Fone 1: _____ Fone 2: _____ Sexo: 1- masculino 2- feminino

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Estado civil: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Entrevistador: _____

Grupo étnico (impressão do examinador): 1- caucasóide 2- negróide 3- outro

Entre as seguintes opções, como você se classifica em relação a cor da pele ?

1- branco 2- negro 3- mulato 4- oriental 5- índio 6- outros

Origem dos avós/bisavós (Europa, África, Ásia - se possível, especificar o país):

2. DADOS DE DIAGNÓSTICO

Qual sua idade quando descobriu o diabetes: ? ___ ou Data do diagnóstico: ___/___/___

Na ocasião do diagnóstico do DM, você foi internado? 1-sim 2-não

Motivo: _____

Qual o seu tratamento para o DM?

1- apenas dieta 4 - Glitazonas 5- sulf + metf 8- insulina
2- sulfoniluréia 6- sulfoniluréia + outros 9- agente + insulina
3- metformina 7- metformina + agente oral 10- outros

Se insulina, quanto tempo após o diagnóstico do DM? _____ anos _____ meses

Diagnóstico ou impressão do examinador: Tipo de DM

1- DM tipo 1 2- DM tipo 2 3- DMG 9 - Não classificável

Outros medicamentos (quais e tempo de uso): _____

Sr(a) fuma atualmente? 1- sim 2- não

Se sim, quantos cigarros por dia? ___ Com que idade começou a fumar? _____ anos

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

Se não fuma, o Sr(a) já fumou? (fumo passado) 1- sim 2- não

Se sim, quantos cigarros por dia? ___ Com que idade começou a fumar? _____ anos

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos _____ meses

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

FUMO 1- Nunca fumou 2- Ex-fumante 3- Fumante

Faz uso de bebidas alcoólicas? 1- sim 2- não

Em caso positivo, qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)?

Se Sim, responda às perguntas abaixo (questionário CAGE):

1- Alguma vez você já sentiu que deveria parar de beber? 1- sim 2- não

2- Alguma vez as pessoas o incomodaram criticando seu jeito de beber? 1- sim 2- não

3- Alguma vez você se sentiu mal (ou culpado) a respeito da bebida? 1- sim 2- não

4- Alguma vez você bebeu logo ao acordar para acalmar os nervos ou se livrar de uma ressaca? 1- sim 2- não

Conclusão CAGE: 1- positivo (2 ou + respostas afirmativas às perguntas acima) 2 – negativo

Hepatite 1-sim 2-não HIV 1- sim 2- não

Outras doenças (listar): _____

3. HÁBITOS ALIMENTARES

Uso de adoçantes: Não Sim Quantas gotas por dia? _____

Ingestão de refrigerantes: Não Sim Quanto por dia? _____

Ingestão de café: Não Sim Quantas xícaras pequenas por dia? _____

Ingestão de chá: Não Sim Quantas xícaras por dia? _____

Chimarrão: Não Sim Com que frequência? _____

Ingestão de frutas, verduras e legumes: Não Sim Com que frequência? _____

Ingestão de carne vermelha: Não Sim Quantas vezes por semana? _____

Ingestão de carne branca: Não Sim Qual(is) e quantas vezes por semana? _____

Vacina(s) nos últimos doze meses (quais e quantas vezes): _____

Uso de vitamina(s) nos últimos seis meses (tipo, dose, frequência): _____

4. ATIVIDADES

Profissão (atividades nos últimos dez anos): _____

Exposição a raios-X nos últimos dez anos (quantas vezes?): _____

Exercício físico: Não Sim Tipo de atividade e frequência (se parou, incluir há quanto tempo): _____

5. HISTÓRIA FAMILIAR

(Avaliação de história familiar de diabetes, pressão alta, problemas cardíacos e problemas renais)

Definir como presença (SIM) quando:

- Diabetes: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Pressão alta: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Coração: história de infarto, angina ou morte súbita, relato médico/exames de isquemia ou procedimentos de revascularização miocárdica.
- Rins: história de diálise, ou tratamento para insuficiência renal em centro especializado, relato médico ou exames laboratoriais.
- Derrame: história e/ou seqüelas compatíveis.

5.1. INFORMAÇÃO DOS PAIS:

O pai e a mãe são vivos? PAI 1- sim 2- não MÃE 1- sim 2- não

Se falecidos, de que? PAI: _____ MÃE: _____

O seu pai e/ou mãe tem/tiveram?

	idade atual	diabete	derrame	coração	pressão alta	rim
pai						
mãe						

Outra(s) doença(s), qual(is)?

5.2. INFORMAÇÃO DOS IRMÃOS:

O Sr.(a) tem irmãos/irmãs? 1- sim 2- não Se sim, quantos? ____ irmãos e ____ irmãs
Listar o nome dos irmãos, idade e perguntar: O(s) seu(s) irmão(s) tem/tiveram?

nome	Sexo	idade	vivo	diabetes	derrame	coração	Hipertensão	rim
1-								
2-								
3-								
4-								
5-								
6-								
7-								
8-								
9-								
10-								

5.3. OUTROS FAMILIARES DIABÉTICOS*:

Lado materno da família:

Avó 1-sim 2 -não 9- não sabe

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe (Se sim, quantas (os) com DM _____)

Lado paterno da família:

Avó 1-sim 2 -não 9- não sabe

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe (Se sim, quantas (os) com DM _____)

Outros: _____

Especificar tipo de diabetes, sexo e número de afetados em cada lado da família.

5.4. DEFICIÊNCIA AUDITIVA:

Probando: 1-sim 2- não Tempo? _____

Familiares*: Lado materno da família: _____

Lado paterno da família: _____

* especificar sexo, número de afetados e o tempo de surdez.

6. EXAME FÍSICO

Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____ kg/m²

Especificar qual era o peso no período em que o diabetes foi diagnosticado? _____

Cintura: _____ cm Quadril: _____ cm Relação C/Q: _____

Hipertensão: 1- sim 2- não Uso de anti-hipertensivos: 1- sim 2- não

Especificar medicamento(s), dose e tempo de uso: _____

Pressão 1: ____ / ____ mmHg Pressão 2: ____ / ____ mmHg Pressão 3: ____ / ____ mmHg

Palpação de pulsos periféricos: 1- palpável 2- não palpável

	MID	MIE
tibial posterior		
Pedioso		

7. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

DATA(S)					
Glicose (mg/dl)					
Glico-hemoglobina (%)					
Frutossamina (mmol/L)					
Colesterol total (mg/dl)					
HDL (mg/dl)					
Triglicerídeos (mg/dl)					
LDL (mg/dl)					
Proteína C (mg/L)*					
Albumina (g/dl)*					
Peptídeo C (ng/ml)*					
Insulina (uUI/ml)*					
Uréia (mg/dl)					
Creatinina (mg/dl)					
Albuminúria- amostra (mg/L)					
exc urinária de album (ug/min)					
Uréia urinária (g/24h)*					
QUE hematúria					
QUE proteinúria					
QUE-leucócitos /campo					
Urocultura **					

* protocolos específicos ou quando indicados

** realizar apenas se EQU (qualitativo de urina) alterado

Ecografia de rins: (se disponível)

Laudos:

Data: ___ / ___ / ___

9. AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

DATA(s)					
oftalmoscopia direta/indireta ^c	OD OE				
angiografia ^d	OD OE				
fotocoagulação com laser ^e	OD OE				
examinador ^g					
Observações					

0- normal: 1-não proliferativa leve: 2-Não proliferativa grave 3:proliferativa

Obs: Descrição detalhada em anexo para o médico oftalmologista

10. AVALIAÇÃO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA

Força muscular e exame físico específico: presente = 0 ausente = 1

	direito	esquerdo
Reflexos profundos		
Aquileu		
Sensibilidade vibratória		
Hálux		
Index		
Pin-prick (agulha cabo/ponta)		
Hálux		
Index		
Monofilamente (10 g)		
Hálux		
Index		
Caminhar calcanhares		

Escore de sinais de exame físico (somar os pontos dos itens acima) = MID

MIE

Neuropatia periférica presente se: somatório dos sinais de exame físico ≥ 3 tanto à DIREITA quanto à ESQUERDA OU apenas dificuldade de deambular nos calcanhares.

Conclusão: Diagnóstico de Neuropatia Periférica: 1- sim 2- não

Data: ___/___/___

11. AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR

11.1. QUESTIONÁRIO CARDIOVASCULAR (*Questionário Rose*):

A) Angina (dor no peito aos esforços)

1- Você teve qualquer tipo de dor ou desconforto no peito?

sim (1) não (2) Se não, vá para o item C.

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver marcada com asterisco vá direto ao item "B".

2- Tem dor quando sobe escada/ lomba ou caminha rápido?

sim (1) não (2)* Nunca se apressa ou sobe degraus (3)

3- Você tem dor no peito quando caminha a passo normal em nível plano? sim (1) não (2)

4- O que você faz se tem a dor enquanto está caminhando?

- pára ou diminui a marcha (1) - continua caminhando igual (2)*

5- Se você permanece imóvel, o que acontece? - a dor alivia (1) - a dor não alivia (2)*

6- Quanto tempo leva? 10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)*

7- Pode me mostrar onde é a dor?

esterno região superior ou média (1)

esterno na região inferior (2)

tórax anterior esquerdo (3)

braço esquerdo (4) - outra(s) (5)

8- Você sente mais alguma coisa? sim (1) não (2)

B) Possível IAM

9- Você já teve forte dor no peito por meia hora ou tempo mais prolongado? sim (1) não (2)

C) Claudicação intermitente

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver marcada com asterisco, não prosseguir.

- 10- Você tem dores nas pernas ao caminhar? sim (1) não (2)*
10) Em que perna? direita (1) esquerda (2)
11- Esta dor sempre inicia quando você está imóvel ou sentado? sim (1)* não (2)
12- Em que parte da sua perna você sente a dor?
- a dor inclui a panturrilha (1) - a dor não inclui a panturrilha (2)*
se a panturrilha não for mencionada, perguntar: Algum outro local mais? _____
13- Tem dor quando sobe escada/lomba ou caminha rápido? sim (1) não (2)*
14- Você sente a dor quando caminha a passo normal em nível plano? sim (1) não (2)
15- A dor sempre desaparece enquanto você está caminhando? sim (1)* não (2)
16- O que você faz se tem a dor enquanto está caminhando?
- pára ou diminui a marcha (1) - continua caminhando igual (2)*
17- O que acontece com a dor se você permanece imóvel? - a dor alivia (1) - a dor não alivia (2)*
18- Em quanto tempo? 10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)

INTERPRETAÇÃO:

ANGINA PECTORIS (indivíduos que respondem a todas perguntas como segue):

- 1- sim 2- ou 3- sim 4- pára ou diminui 5- alivia 6- 10 minutos ou menos
7- esterno (superior, inferior ou médio) OU tórax anterior E braço esquerdo.

POSSÍVEL INFARTO (indivíduos que respondem como segue): 9- sim (1)

CONCLUSÃO QUESTIONÁRIO ROSE:

- 1- ausência de cardiopatia isquêmica 2- angina pectoris 3- possível infarto

CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE (indivíduos que respondem a todas perguntas como segue):

- 3- sim 10- sim 11- não 12- inclui a panturrilha 13- ou 14- sim 15- não 16- pára ou diminui 17- alivia 18- 10 minutos ou menos

Claudicação intermitente 1-sim 2-nao

ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: 1- sim 2- não (história, seqüela ou imagem)

11.2. ELETROCARDIOGRAMA DE REPOUSO:

CÓDIGO MINNESOTA: Critérios diagnósticos de cardiopatia isquêmica (OMS)

- 0 - ausente 1 - presente

“PADRÕES Q E QS”

PAREDE ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL, V₆):

PAREDE POSTERIOR (INFERIOR) - derivações DII, DIII, aVF:

PAREDE ANTERIOR (derivações V₁, V₂, V₃, V₄ e V₅):

“ONDA T”

SÍTIO ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL, V₆):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

PAREDE ANTERIOR (derivações V₂, V₃, V₄ e V₅):

“SEGMENTO ST”

SÍTIO ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL e V₆):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

“DEFEITO DE CONDUÇÃO VENTRICULAR”

BLOQUEIO COMPLETO DE RAMO ESQUERDO

CONCLUSÃO: Data: ____/____/____ 1- Normal 2- Anormal:

2.1. provável infarto agudo do miocárdio: presença de onda Q (grande ou média) [1.1, 1.2] ou bloqueio completo de ramo esquerdo [7.1];

2.2. e/ou possível isquemia miocárdica: onda Q pequena [1.3] ou qualquer anormalidade no segmento ST [4.1, 4.2, 4.3] se acompanhadas por anormalidades da onda T [5.1 ou 5.2 ou 5.3].

11.3. ELETROCARDIOGRAMA DE ESFORÇO: 1- sim 2- não

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- sim 2- não

Listar fármacos suspensos: _____

Laudo: _____

Conclusão: _____ Data: ____/____/____

11.4. CINTILOGRAFIA MIOCÁRDIA COM ESTRESSE: 1- sim 2- não

Marcar o tipo de estudo: Estresse físico ou farmacológico (dipiridamol)

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- Sim 2- Não

Listar fármacos suspensos: _____

Fração de ejeção: _____

Observações: _____

Conclusão: 1- exame normal 2- alteração fixa (hipoperfusão em repouso e estresse) = necrose 3- alteração variável (hipoperfusão somente no estresse) = isquemia

DATA: _____

11.5. ANGIOGRAFIA CORONARIANA: 1- sim 2- não

Laudo: _____ Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu,.....declaro, sob a responsabilidade do médico que assina esse documento, que concordo em participar do projeto de pesquisa Genética do Diabetes Mellitus e suas Complicações Crônicas. Recebi explicação clara e detalhada sobre a pesquisa acima mencionada, a qual submeto-me de livre e espontânea vontade, reconhecendo que:

- 1) Foi explicado que o objetivo do estudo é possibilitar uma melhor compreensão dos fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento do diabetes mellitus e suas complicações. Esse é um estudo que avaliará alterações no DNA em genes possivelmente envolvidos na patogênese do diabetes mellitus e nas complicações do diabetes.

- 2) Minha participação envolve a retirada de 14 ml de sangue periférico para análise, uma coleta de células da mucosa oral e uma entrevista. O desconforto que poderei sentir é o da picada da agulha e a formação de um pequeno hematoma. A coleta das células da mucosa oral será feita através de uma espátula, não causando nenhum tipo de risco ou de desconforto. A amostra de sangue coletada será utilizada estritamente para os exames laboratoriais descritos no presente projeto. O DNA genômico extraído da minha amostra de sangue e das células da mucosa oral será armazenado apropriadamente e identificado por um código, garantindo o sigilo da minha identidade. O DNA extraído será utilizado para o estudo das alterações genéticas descritas no presente projeto. O mesmo será armazenado e o estudo de outros genes no futuro somente será possível se aprovado por uma comissão de ética em pesquisa. Foi garantido que nenhuma outra pessoa, além dos pesquisadores e de seus colaboradores diretamente envolvidos no projeto, terão acesso ao material proveniente da minha amostra. Foi explicado que todos os restos celulares resultantes da coleta de sangue, não utilizados no presente trabalho, serão desprezados.

- 3) Me foi dada a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à minha pessoa.
- 4) Foi dada a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida acerca dos benefícios e riscos da pesquisa. Os dados referentes a este estudo poderão ser acessados por mim, pelos pesquisadores envolvidos ou pelo médico responsável.
- 5) Foi dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial da informação em relação à minha privacidade.
- 6) Foi explicado que não receberei medicação e foi garantido que não terei gastos em participar desse estudo.

.....
assinatura do paciente

Data: ____ / ____ / ____

.....
assinatura do médico responsável

.....
assinatura de testemunha

Declaro que esse formulário foi lido para o

paciente.....em...../...../.....,

pela Dr(a).....enquanto

eu.....estava presente.

.....
assinatura da testemunha