



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1

Raquel Garcia Rocco da Silva



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1

Raquel Garcia Rocco da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadores:

Profa. Márcia Gonçalves Ribeiro

Prof. Marcelo A. Costa Lima

**Rio de Janeiro
Março de 2024**

Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1

Raquel Garcia Rocco da Silva

Orientadores:

**Profa. Márcia Gonçalves Ribeiro
Prof. Marcelo A. Costa Lima**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada por:

Profa. Márcia Gonçalves Ribeiro – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Elaine Sobral da Costa – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Marília Martins Guimarães – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Flávia Nardes dos Santos - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Amanda Faria de F. R. da Silva – Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Raquel Garcia Rocco da.

Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1/ Raquel Garcia Rocco da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/PPGCM, 2024.

xiii, 118f.:il.;31cm.

Orientadores: Márcia Gonçalves Ribeiro e Marcelo Aguiar Costa Lima

Tese (doutorado) – UFRJ/ PPGCM/ Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, 2024.

Referências Bibliográficas: f. 84-98.

1. Diabetes Mellitus. 2. Neuropatia Diabética. 3. Polimorfismos Associados a Polineuropatia Simétrica Distal. I. Ribeiro, Márcia Gonçalves e Lima, Marcelo Aguiar Costa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, meu sustento e fortaleza.

Aos meus filhos, Elis, Bernardo e Marianna, minhas bênçãos do Senhor e alegrias; minha força motriz para superar todos os desafios da minha vida.

A minha mãe "*in memoriam*", a mulher mais linda e forte que já conheci.

Aos milhares de estudantes que, como eu, foram açotados mentalmente pela pandemia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora, Márcia Ribeiro, por ter sido muito mais do que uma orientadora. Márcia é um ser humano abençoado e apenas quem convive consegue entender a sua generosidade e preciosidade e, por isso, sou abençoada através de sua vida.

Ao Marcelo Costa que foi um gentil e disponível orientador e possibilitou as análises de DNA no Laboratório de Genética Molecular Humana, do Departamento de Genética, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Agradeço ao Dr. Jorge Luescher e a Dra. Ludmila Campos por terem me ensinado e possibilitado a coleta de dados. Nos longos meses em que estive no ambulatório de Diabetes do IPPMG aprendi muito sobre diabetes tipo 1, mas meu maior aprendizado foi vivenciar os maiores tesouros do ambulatório: a educação em saúde, a qualidade de atendimento, dedicação e o respeito aos pacientes.

A Claudia Moura que me acolheu, treinou e ensinou sobre extração de DNA e genotipagem.

Ao Dr. Daniel Silva agradeço imensamente, uma vez que, em plena pandemia, ele me recebeu, ensinou e possibilitou que os exames de condução nervosa fossem realizados.

As minhas amigas de trabalho: Beatriz Carrapatoso, Katia Marques, Michele Lourenço e Mônica Romitelli e ao amigo Fabio Feitosa, por terem sido instrumentos de Deus em minha vida, cada um de uma forma especial.

As minhas amigas e irmãs Alessandra Lacerda e Ednéia Leme, por ouvirem, apoiarem e incentivarem este trabalho.

Ao meu pai e a minha madrasta que me estruturam e me concedem a base que preciso.

Ao meu marido por suportar comigo muitos desafios.

RESUMO

SILVA, Raquel Garcia Rocco. Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1. Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

INTRODUÇÃO: A polineuropatia simétrica distal (PSD) é o tipo mais comum de neuropatia diabética (ND) e afeta tanto indivíduos com diabetes tipo 1 quanto tipo 2, mas a progressão e as manifestações são mais rápidas e graves em diabéticos tipo 1. Vários estudos demonstram que o controle glicêmico e a duração do diabetes são importantes fatores de risco para o desenvolvimento das ND, mas a velocidade da progressão e a gravidade das lesões nervosas variam consideravelmente entre indivíduos. Acredita-se, portanto, que haja implicações dos fatores genéticos no desenvolvimento da PSD porque alguns genes estão envolvidos em vias biológicas específicas, atuando em diferentes vias do processo patogênico. **OBJETIVOS:** Descrever as associações de polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com provável diagnóstico de PSD em crianças e adolescentes diabéticos tipo 1 e identificar os polimorfismos C677T do gene *MTHFR* C677T e do VNTR do intron 3 do gene interleucina-4 (*IL4*) que possam estar associados a PSD. **METODOLOGIA:** Estudo descritivo observacional, do tipo seccional, em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 que frequentam o Ambulatório de Diabetes, do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, nos períodos de março de 2017 a junho de 2019. As crianças e adolescentes com diagnóstico provável de PSD receberam orientações a partir de palestras e material bibliográfico. Foi utilizado um questionário estruturado, contendo informações clínicas e sociodemográficas; dois protocolos de avaliação da neuropatia diabética: Escore de Sintomas Neuropáticos e *Diabetic Neuropathy Examination* e avaliação da sensibilidade térmica, do reflexo aquileu e da sensibilidade protetora dos pés (avaliado através do monofilamento Semmes-Weinstein - 10g). Foram colhidas amostras de saliva para extração do DNA e investigação do polimorfismo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR* C677T) e a da IL4 (A1A1, A1A2 e A2A2). Os dados foram analisados através do pacote estatístico EPI-Info (versão 7). **RESULTADOS:** A prevalência da PSD e da neuropatia sensorial foi de 14% e 42,71%, respectivamente. Nos participantes com genótipo A1A1 observamos associações entre PSD e aumento: da hemoglobina glicada, tempo de diabetes, peso, altura, IMC, colesterol total, LDL e HDL colesterol, triglicerídeos e VLDL. A alteração da sensibilidade térmica foi associada ao polimorfismo CC e ao CT. Não observamos associações estatísticas entre PSD e neuropatia sensorial com nenhum polimorfismo investigado. **CONCLUSÕES:** Não encontramos associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o polimorfismo I3VNTR do gene *IL4*. No entanto, o estudo fornece outras associações e sugere possíveis implicações para esses achados. A falta de associação observada entre os polimorfismos investigados e a PSD podem ter sido influenciados pela falta de informações étnicas ou pela característica da população (crianças e adolescentes).

Palavras-Chave: neuropatia diabética, criança, adolescente, polimorfismo genético, interleucina 4 e metilenotetrahidrofolato redutase

ABSTRACT

SILVA, Raquel Garcia Rocco da. Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1. Rio de Janeiro, 2024. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

BACKGROUND: Distal symmetrical polyneuropathy (DSP) is the most common type of diabetic neuropathy (DN) and affects both patients with type 1 and type 2 diabetes, but progression and manifestations are more rapid and severe in type 1 diabetics. Glycemic control and duration of diabetes are important risk factors for the development of DN, but the speed of progression and the severity of nerve damage vary considerably among patients. Therefore, it is believed that there are implications of genetic factors in the development of DSP because some genes are involved in specific biological pathways, acting in different pathways of the pathogenic process.

OBJECTIVES: To describe the associations of genetic polymorphisms, clinical and sociodemographic variables with a probable diagnosis of DSP in type 1 diabetic children and adolescents and identify the C677T polymorphisms of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* gene) and the VNTR of intron 3 of the interleukin 4 (*IL4*) gene that may be associated with DSP. **METHODS:** A descriptive, observational, cross-sectional study was carried out in children with type 1 diabetes who attend the Diabetes Outpatient Clinic of the Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, from March 2017 to June 2019. The. Saliva samples were collected for DNA extraction and investigation of the polymorphism of the *MTHFR* and that of *IL4* (A1A1, A1A2 and A2A2). A structured questionnaire was used, containing clinical and sociodemographic information, two evaluation protocols for diabetic neuropathy, Neuropathic Symptom Score and Diabetic Neuropathy Examination and evaluation of thermal sensitivity, Achilles reflex and protective sensitivity of the feet (assessed using the Semmes- Weinstein - 10g). Children and adolescents with a probable diagnosis of DSP received guidance based on lectures and bibliographic material. Data were analyzed using the EPI-Info statistical package (version 7).

RESULTS: The prevalence of DSP and sensory neuropathy was 14% and 42.71%, respectively. In patients with the A1A1 gene, we observed associations between DSP and increases in: glycated hemoglobin, duration of diabetes, weight, height, BMI, triglycerides, total cholesterol and LDL, HDL and VLDL cholesterol. The change in thermal sensitivity was associated with the CC and CT polymorphisms. We did not observe statistical associations between DSP and sensory neuropathy with any investigated polymorphism. **CONCLUSIONS:** We found no association between the C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and the I3VNTR polymorphism of the *IL4* gene. However, the study provides other associations and suggests possible implications for these findings. The absence of association observed between the polymorphisms investigated and DSP may have been influenced by the lack of ethnic information or by the characteristics of the population (children and adolescents).

Keywords: diabetic neuropathies, child, adolescent, genetic polymorphism, interleukin 4 and methylenetetrahydrofolate reductase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Subtipos de Polineuropatia Simétrica Distal	29
Figura 2	Critérios para Classificar a PSD	31
Figura 3	Possíveis Alterações em um Neurônio Sensorial na PSD	35
Figura 4	Principais Mecanismos Implicados na Patogênese da PSD	36
Figura 5	Mecanismos propostos para explicar o dano celular pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas	39
Figura 6	Papel dos biomarcadores inflamatórios na neuropatia periférica diabética	41
Figura 7	Expressões da <i>IL-4</i>	42
Figura 8	Metabolismo do Ácido Fólico, Homocisteína e Óxido Nítrico	44
Figura 9	Esquema do Estudo Seccional	53
Figura 10	Frequência dos Sintomas Sensoriais Relatados	60
Figura 11	Quantidade de participantes diagnosticados, segundo os instrumentos e critérios utilizados	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis clínicas da população de estudo	59
Tabela 2	Frequência dos parâmetros utilizados para classificar provável PSD e a neuropatia sensorial	61
Tabela 3	Variáveis clínicas e laboratoriais e suas associações entre os participantes com provável PSD e sem provável PSD	63
Tabela 4	Variáveis clínicas e laboratoriais e suas associações com neuropatia sensorial	64
Tabela 5	Parâmetros do exame de condução nervosa ajustado por gênero	65
Tabela 6	Média dos parâmetros avaliados no ECN do nervo sural e suas associações com provável PSD e neuropatia sensorial	66
Tabela 7	Genótipos da <i>IL-4</i> entre pessoas com e sem provável PSD	67
Tabela 8	Associação entre <i>IL-4</i> e parâmetros utilizados para classificar a provável PSD e a neuropatia sensorial	68
Tabela 9	Associação dos polimorfismos da <i>IL-4</i> com provável PSD	69
Tabela 10	Associação dos polimorfismos da <i>IL-4</i> com a neuropatia sensorial	70
Tabela 11	Genótipos do MTHFR entre participantes com e sem provável PSD	71
Tabela 12	Associação entre polimorfismos da <i>MTHFR</i> e parâmetros utilizados para classificar a provável PSD e a neuropatia sensorial	71
Tabela 13	Associação dos polimorfismos da MTHFR com provável PSD	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

μ V – Amplitude
ADA – *American Diabetes Association*
CC – Tipo Selvagem
CN – Condução Nervosa
CT – Heterogizotos
DCCT – *Diabetes Control and Complications Trial*;
DM – Diabetes Mellitus
DM1 – Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
DNE - *Diabetic Neuropathy Examination*
DRG - Gânglios da raiz dorsal
ECN – Estudo de Condução Nervosa
EDIC – *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*
GAPDH – Enzima da Via Glicólítica
H₂O₂ – Hidrogênio
HbA_{1C} – Hemoglobina Glicada
HLA – *Human Leukocyte Antigens*
HUCFF - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IL-4 – Interleucina-4
INS – *Insulin Gene*
IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
IPPMG – Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
m/s – Velocidade de Condução Nervosa
MTHFR- Metilenotetrahidrofolato Redutase
ND – Neuropatia Diabética
NEURODIAB - Grupo de Estudo de Neuropatia Diabética da Associação Europeia para o Estudo do Diabetes
NO - Óxido Nítrico
NSS - *Neuropathy Symptom Score*
O₂ – Superóxido
OR – Odds Ratio
Pb - (pares de base)
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PSD – Polineuropatia Simétrica Distal
RFLP - Comprimento de Fragmento de Estricção
SNP - Polimorfismos de Nucleotídeo Único
Th2 - Células T Auxiliares Tipo 2
TT – Homozigotos
UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
VNTR - *Variable Numbers of Tandem Repeats*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Diabetes Mellitus	18
2.1.2	Diabetes Tipo 1 em Crianças e Adolescentes	20
2.1.2.1	Complicações Microvasculares	23
2.2	Neuropatia Diabética	25
2.2.1	Polineuropatia Simétrica Distal em Crianças e Adolescentes com Diabetes Tipo 1	26
2.2.1.1	Critérios para Classificação e Diagnóstico da PSD	30
2.2.1.2	Classificação da Gravidade e Progressão da PSD	33
2.2.1.3	Patogênese da PSD	34
2.3	Polimorfismos Associados a PSD	39
2.3.1	Interleucina	41
2.3.2	Metilenotetrahidrofolato Redutase	43
3	JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo Geral	46
4.2	Objetivos Específicos	46
5	METODOLOGIA	
5.1	Desenho e Amostra de Estudo	47
5.2	Instrumentos Utilizados	47
5.2.1	Ficha de Avaliação Estruturada	47
5.2.2	Amostras Biológicas, Extração de DNA e Genotipagem Molecular	49
5.3	Classificação da Provável Polineuropatia Simétrica Distal	50
5.3.1	Definição do Caso e Universo do Estudo	51
5.3.2	Parâmetros e Avaliação da Condução Nervosa e Concordância entre avaliadores	52
5.4	Tamanho Amostral e Logística	52
5.5	Variáveis do Estudo	54
5.6	Controle de Qualidade	57
5.7	Análise Estatística	57
5.9	Considerações sobre os Aspectos Éticos	58
6	RESULTADOS	59
6.1	Análise Descritiva das Variáveis Clínicas e Sociodemográficas Estudadas	59
6.2	Provável PSD	61
6.3	Neuropatia sensorial	63
6.4	Exame de condução nervosa	65
6.5	Interleucina-4	67
6.6	Metilenotetrahidrofolato Redutase (<i>MTHFR</i>)	70
7	DISCUSSÃO	73
8	CONCLUSÃO	82
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	83
	APÊNDICE 1 – Ficha de avaliação	99
	APÊNDICE 2 – Termo de consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis de crianças e adolescentes com diabetes mellitus	102
	APÊNDICE 3 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis de crianças e adolescentes com diabetes mellitus	104

APÊNDICE 4 - Resumo submetido ao 18º Congresso Nacional de Pediatria em Portugal	106
APÊNDICE 5 - Resumo submetido ao 18º Congresso Nacional de Pediatria em Portugal	107
APÊNDICE 6 - Resumo apresentado no XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica	108
APÊNDICE 7 - Resumo apresentado no III Congresso de Neurogenética 2021	109
APÊNDICE 8 - Resumo apresentado no III Congresso de Neurogenética 2021	110
APÊNDICE 9 – Artigo “Association of Interleukin 4 and <i>MTHFR</i> polymorphisms with distal symmetrical polyneuropathy in young diabetics”	111
ANEXO 1 – Teste de aquiescência	132

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1), forma presente em 5%-10% dos casos de diabetes mellitus (DM), é a principal doença endócrina e forma de diabetes diagnosticada na infância e na juventude (ELSAYED et al, 2022).

Nos últimos anos foi relatado um crescimento significativo anual da DM1 na Europa e em outras partes do mundo, com o aumento tanto do número de casos incidentes quanto prevalentes, relacionados ao aumento da incidência em muitos países. No total, estima-se que 1.211.900 crianças e adolescentes com menos de 20 anos tenham diabetes tipo 1 globalmente. Estima-se que cerca de 108.200 crianças e adolescentes menores de 15 anos sejam diagnosticados a cada ano e esse número sobe para 149.500, quando a faixa etária se estende aos menores de 20 anos (OGLE; WANG; GREGORY, 2022).

Segundo o *International Diabetes Federation* (2021), no Brasil 588.800 pessoas vivem com DM1 e, neste cenário, 33 anos/pessoa de vida saudáveis são perdidos. O crescimento no Brasil da DM1 é de 5% ao ano, enquanto o DM2 cresce 3,6% no mesmo período. O Brasil também ocupa o terceiro lugar no *ranking* dos países com maior prevalência e incidência de casos de DM1 em crianças e adolescentes. Estima-se que, atualmente, 588.800 pessoas vivem no Brasil com DM1 e que, entre elas, 112.240 pessoas têm menos de 20 anos de idade. Como consequência, o número de crianças com diabetes tipo 1 que necessitam de cuidados aumentou junto com os encargos do sistema de saúde (SVENSSON et al., 2023).

No momento do diagnóstico, a maioria das pessoas já tem cerca de 85% das células β pancreáticas destruídas, o que explica a insulinopenia, com grande labilidade glicêmica no controle e dependência diária da aplicação de insulina (ELSAYED et al., 2022). Na maioria dos casos a destruição das células β é mediada por autoimunidade, porém, existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática. Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos (antiinsulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico e antitirosina-fosfatases) (YI; SWENSEN; QIAN, 2018). Foi observado que estes anticorpos podem estar presentes na fase pré-clínica da doença e em até 90% dos indivíduos, quando a hiperglicemia é identificada. Além do componente autoimune, o DM1 apresenta forte associação com determinados genes do sistema

antígeno leucocitário humano (*HLA – Human Leukocyte Antigens*), alelos esses que podem ser predisponentes para o desenvolvimento da doença (YI; SWENSEN; QIAN, 2018).

A taxa de destruição das células β é variável, geralmente mais rápida em crianças. A forma progressiva e lenta ocorre, geralmente, em adultos (PRIMAVERA; GIANNINI; CHIARELLI, 2020).

A forma idiopática do DM1 corresponde a uma minoria dos casos, caracterizando-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células-beta e a não associação com haplotipos do HLA. Os indivíduos com esta forma podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência insulínica (PRIMAVERA; GIANNINI; CHIARELLI, 2020).

Há inúmeros fatores genéticos e ambientais que favorecem o aumento da incidência da doença e contribuem para que haja ativação imunológica e processo destrutivo das células β , com manifestações clínicas mais precoces (BARAT; VALADE et al, 2008). A combinação de marcadores genéticos - *Human Leukocyte Antigens* e *Insulin Gene* (INS) - e a história familiar podem estratificar o risco da DM1 e serem usados para seleção de parentes de primeiro grau, nesse caso, para tratamento primário e estratégias de intervenção (ACHENBACH; BONIFACIO; ZIEGLER, 2005).

As manifestações clínicas do DM1 são polimorfas e variam consideravelmente de paciente para paciente. As repercussões microvasculares estão pautadas na triopatia diabética – oftalmo, nefro e neuropatia – e se constitui em importante problema de saúde, trazendo morbidade e mortalidade e piorando significativamente a qualidade de vida por incapacitação e diminuição da sobrevida (ASSOCIATION, 2022).

As estimativas da prevalência e incidência da neuropatia diabética (ND) em pessoas com DM1 variam consideravelmente entre os estudos, mas, recentemente, a *American Diabetes Association* (ADA, 2016) relatou que estudos de coorte com populações significativas de pessoas com DM1 e dois grandes estudos de pesquisa em diabetes (DCCT – *Diabetes Control and Complications Trial*; EDIC – *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) relataram que, após 20 anos de duração da doença, 20% das pessoas desenvolvem ND. Além disso, as prevalências da ND em jovens com DM1 e DM2 se equiparam as prevalências observadas nos adultos (POP-BUSUI et al, 2016).

O acometimento neuropático é geralmente precoce e considerado o mais prevalente dentre as manifestações microvasculares. A ND abrange um largo espectro de anormalidades, afetando diversos tipos de fibras sensitivas, motoras e autonômicas, ocorrendo, tanto no diabetes tipo 1 e tipo 2, quanto nas formas de diabetes adquiridas, sendo a polineuropatia simétrica distal (PSD) a forma mais comum e conhecida de ND (TESFAYE et al, 2010).

As principais manifestações clínicas são dormência ou queimação em membros inferiores, assim como, formigamento, pontadas, choques, agulhadas, desconforto ou dor, ao toque de lençóis e cobertores, além de queixas de diminuição ou perda de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa em pernas e pés. Ainda que a predominância de sintomas e sinais se localize nos membros inferiores, os membros superiores (mãos e braços) podem, também, ser afetados. É importante destacar que a ausência de sintomas e sinais de parestesia, anteriormente mencionada, não exclui a PSD, pois algumas pessoas evoluem direto para a perda total da sensibilidade (ASSOCIATION, 2022).

A fisiopatologia subjacente da PSD no DM1 não é bem compreendida. Sabe-se, hoje em dia, que o controle metabólico do diabetes diminui a frequência e a intensidade da lesão neurológica, conforme demonstrado em um importante estudo prospectivo do DCCT/EDIC em diabéticos do tipo 1 (ALBERS et al; 2010).

Apesar do controle glicêmico e a duração do diabetes serem considerados fatores importantes para o desenvolvimento da PSD, todavia, observa-se que a velocidade de progressão e o envolvimento do tecido nervoso apresentam grandes diferenças individuais (JANKOVIC; NOVAKOVIC; NIKOLIC; MAKSIC; BRANKOVIC; PETRONIC; CIROVIC; DUCIC; GRAJIC; BOGICEVIC, 2021). Há evidências de que uma predisposição genética desempenhe um papel na susceptibilidade para as lesões nervosas. Com a inserção da biologia molecular nas diversas áreas têm sido identificados alguns polimorfismos, possivelmente relacionados às complicações do diabetes tipo 1 (VACCARO; PERNA; MANCINI, 2000).

Os genes responsáveis por favorecerem uma resposta inflamatória são importantes candidatos associados ao dano neural (MIESSE; WILLEY; BATEMAN 2004).

A interleucina-4 (*IL-4*) é uma citocina secretada pelas células T tipo 2, eosinófilos e macrófagos e desempenha um papel importante na formação de moléculas de adesão das células endoteliais, quimiotaxia de células imunes e na

resposta inflamatória. Vários polimorfismos têm sido descritos, mas a VNTR (*variable numbers of tandem repeats*) está associada às doenças inflamatórias e deficiência na regulação e produção da *IL-4* (BASOL et al, 2013; BURACZYNSKA et al, 2017).

A metileno-tetra-hidrofolato redutase (*MTHFR*) catalisa a transformação da homocisteína em metionina através da via de remetilação, contudo, a diminuição da atividade enzimática da *MTHFR* aumenta as chances de hiperhomocisteinemia. Esta mutação é a causa genética mais comum para a hiperhomocisteinemia, afetando a função nervosa por estresse oxidativo (SCHLÜSSEL et al, 1995; MOLL et al; 2013; VARGA, 2015; HAMIDI; RADFAR; AMOLI, 2018).

Diante do exposto acima, o presente analisou as associações de polimorfismos genéticos (*IL-4* e *MTHFR*), variáveis clínicas e sociodemográficas com provável diagnóstico de polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIABETES MELLITUS

O DM cresce em todo mundo e, em 2019, a prevalência no Brasil foi de 7,7%, sendo maior entre as mulheres (8,4%) do que nos homens (6,9%). Em relação a 2013, houve um aumento relativo da prevalência do DM em 24% e este aumento foi correlacionado ao aumento do envelhecimento (1,8%), ao aumento da detecção e da incidência de casos e a diminuição da mortalidade geral em 24,7%. A hipertensão, a obesidade e a menor escolaridade (ensino fundamental incompleto) também se apresentam associadas ao aumento da prevalência da DM no Brasil. A prevalência, ajustada por idade, foi menor na região Norte e maior nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (REIS et al, 2022).

O DM é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta a hiperglicemia como fator de risco comum, resultando em anormalidades na ação da insulina, na secreção da insulina ou em ambos (MARATHE; GAO; CLOSE, 2017). A classificação atual está baseada na etiologia e não no tipo de tratamento; e é proposta pela *American Diabetes Association* (2022) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (2022), de acordo com as seguintes categorias:

- Diabetes tipo 1 (DM1): autoimune e idiopática;
- Diabetes tipo 2 (DM2);
- Diabetes mellitus gestacional (diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não era claramente manifestada antes da gestação);
- Tipos específicos de diabetes devido a outras causas (síndromes de diabetes monogênicas, doenças do pâncreas exócrino e diabetes induzida por drogas ou produtos químicos).

Outras classificações têm sido propostas, levando-se em conta características clínicas: momento do início do diabetes, a história familiar, a função residual das células β , os índices de resistência à insulina, o risco de complicações crônicas, o grau de obesidade, a presença de autoanticorpos e eventuais características sindrômicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022).

Há ainda duas categorias referidas como pré-diabetes que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, que não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento da DM e doenças cardiovasculares. Neste referencial teórico será abordado apenas a DM1, a fim de entender a sua associação com o mecanismo patológico para o desenvolvimento da PSD (ASSOCIATION, 2022).

O DM1 e o DM2 são classificações díspares, nas quais a apresentação clínica e a progressão da doença podem variar consideravelmente. Portanto, a classificação torna-se importante como forma de determinação da terapia, embora alguns indivíduos não possam ser claramente classificados quando diagnosticados. Outro fator importante, é a quebra de paradigmas com relação aos ciclos de vida e à classificação do DM, ambas as doenças podem ocorrer na infância e adolescência tanto quanto na fase adulta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022). Embora haja, inicialmente, dificuldades em distinguir o tipo de diabetes em todas as faixas etárias, o diagnóstico torna-se mais claro quando em indivíduos que apresentam deficiência de células β .

Vários fatores genéticos e ambientes podem resultar na perda funcional e progressiva das células β em pessoas com DM1 e DM2, manifestada clinicamente como hiperglicemia. Em qualquer forma do DM a hiperglicemia aumenta o risco de desenvolver as mesmas complicações crônicas, embora haja variação nas progressões das taxas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022).

O DM2 e suas complicações contribuem tremendamente para o fardo da mortalidade e da incapacidade em todo o mundo (LI et al; 2015). O *Global Burden of Disease Study 2013* identificou a DM como a nona principal causa de redução da expectativa de vida (WANG et al, 2017).

O DM2 é a forma verificada em 90 a 95% dos casos de DM e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. A resistência à insulina e o defeito na função das células β estão presentes precocemente na fase pré-clínica da doença. É causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019-2020).

Quando a secreção e a ação da insulina não funcionam adequadamente, há uma resistência à insulina nos tecidos sensíveis à mesma e a secreção da insulina pelas células β pancreáticas é afetada, o que resulta em níveis sanguíneos anormais de glicose. Na DM2 a resistência à insulina contribui para aumentar a produção de

glicose no fígado e para a diminuição da absorção de glicose no tecido muscular e adiposo. Além disso, a disfunção das células β resulta em redução da liberação de insulina, o que é insuficiente para manter os níveis normais de glicose no corpo. Tanto a resistência à insulina quanto a disfunção da célula β ocorrem cedo na patogênese da DM2 (ZHENG; LEY; HU, 2017).

Nas últimas décadas, foi possível a identificação de numerosas variantes genéticas associadas ao DM2, mas ainda há uma grande proporção da herdabilidade que permanece inexplicada. Entre os fatores ambientais associados estão sedentarismo, dietas ricas em gorduras e envelhecimento. A maioria é obesa, o que, por si só, já é uma causa de resistência à insulina, ou muitos, se não preenchem critérios para a obesidade, pelo índice de massa corporal, têm aumento de gordura predominante na região abdominal (ZHENG; LEY; HU, 2017). O aumento de gordura intra-abdominal ou visceral é uma causa conhecida de insulino-resistência e, com o passar do tempo, costuma agregar fatores de risco as pessoas, como doença cardiovascular, hipertensão arterial, dislipidemia, microalbuminúria e fatores favorecedores da coagulação e trombose (STROJEK, 2003). A hiperglicemia geralmente se desenvolve de forma gradual e, nos estágios iniciais, não é suficiente para promover o aparecimento dos sintomas clássicos. Assim, o DM2 não é diagnosticado com frequência, até que suas complicações apareçam; desse modo, é possível afirmar que aproximadamente 1/3 de todas as pessoas com diabetes podem estar sem diagnóstico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019-2020).

2.1.2 DIABETES TIPO 1 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

O DM1 representa 5% a 10% dos casos de DM e é a classificação mais comum de diabetes na infância e adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade. A forma mais comum é a imunomediada, causado pela destruição das células β pancreáticas; como resultado, o corpo produz muito pouca ou nenhuma insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019-2020).

A destruição autoimune das células β tem múltiplas predisposições genéticas e também está relacionada a fatores ambientais ainda pouco definidos. Os anticorpos, marcadores autoimunes, são: antiinsulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico

antitirosina-fosfatases, presentes meses ou anos antes do diagnóstico clínico, mas observada em 90% das pessoas após o diagnóstico (BELL et al, 2009).

O DM1 também está associado, como fator protetor ou de risco, com genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA). Estão relacionados com a obesidade e também com a predisposição a outras doenças autoimunes, como tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença celíaca, doença de Addison, vitiligo, hepatite autoimune, miastenia gravis e anemia perniciosa (MANTOVANI et al, 2023).

Pessoas com DM1 geralmente apresentam sintomas agudos de diabetes e níveis elevados de glicose no sangue; e aproximadamente um terço delas é diagnosticada com cetoacidose e com risco de vida. A caracterização da fisiopatologia é desenvolvida de forma mais clara em DM1 do que em DM2. Os níveis de hemoglobina glicada (HbA1C) aumentam antes do início clínico do diabetes, tornando o diagnóstico viável bem antes do início da cetoacidose (MANTOVANI et al, 2023).

Existem considerações genéticas importantes, já que a maioria das mutações que causam diabetes é herdada de forma dominante. Estudos demonstram que a DM1 progride sequencialmente, variavelmente e de forma previsível, podendo ser observada dentro de um dos estágios de classificação (ASSOCIATION, 2021):

- Estágio 1: presença de marcadores autoimune de células β , evidenciada por dois ou mais anticorpos contra ilhotas com normoglicemia e pré-sintomático;
- Estágio 2: presença de autoimunidade de células β com disglucemia e estágio pré-sintomático;
- Estágio 3: deficiência de insulina em crianças com diabetes tipo 1.

A taxa de destruição das células β é bastante variável, normalmente mais rápida em lactentes e crianças e mais lenta nos adultos. Crianças e adolescentes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença e um outro grupo ter a hiperglicemia de jejum modesta, algo que pode mudar rapidamente para hiperglicemia grave (SILLER; TOSUR; RELAN; ASTUDILLO; MCKAY; DABELEA; REDONDO, 2020).

Uma minoria de pessoas com DM1 não apresentam autoimunidade para as células β , caracterizando-se com etiologia conhecida. Apesar disto, podem desenvolver insulinopenia permanente e cetoacidose (SILLER; TOSUR; RELAN; ASTUDILLO; MCKAY; DABELEA; REDONDO, 2020).

Nos últimos 20 anos, houve transformações tanto no quadro quanto na forma do cuidado com o DM1 e isto foi devido a descobertas de novos anticorpos e novas insulinas e formas de administração. Contudo, ainda permanecem indefinidas as formas para prevenir ou minimizar a progressão da DM1, principalmente na infância e adolescência (CHIANG et al, 2018; MANTOVANI et al, 2023).

Chiang et al (2018) indicam que a medição de anticorpos de ilhotas em indivíduos geneticamente em risco para DM1 (parentes ou indivíduos com fatores genéticos associados) identifica indivíduos que podem desenvolver DM1 (CHIANG et al, 2018). Esses testes, juntamente com a educação sobre os sintomas do diabetes e um acompanhamento próximo, podem permitir a identificação precoce do início do DM1 (ALASSAF et al, 2023).

O DM1 – com início na infância – é diferente do DM1 no adulto por causa de sua epidemiologia, fisiopatologia, considerações de desenvolvimento e resposta terapêutica, portanto, o tratamento de crianças com DM1 não deve ser extrapolado para adultos com DM1 e vice e versa (CHIANG et al, 2018). Os estágios de desenvolvimento da criança e do adolescente devem ser respeitados e a terapêutica adaptada as suas necessidades. A orientação antecipada oportuna e a coordenação dos cuidados permitem uma transição perfeita para criança/adolescente/jovem adulto, tanto para o paciente em desenvolvimento quanto para a sua família (ASSOCIATION, 2021).

Segundo *International Diabetes Federation* (2021), o DM1 causa complicações relacionadas à macroangiopatia e à microangiopatia. Doenças renais, cardíacas e oculares estão presentes em 31% dos brasileiros entre 13 e 19 anos.

A macroangiopatia é mais frequente em DM2 do que em DM1 (STROJEK, 2003). A coexistência de aterosclerose e diabetes pode causar dificuldades de diagnóstico resultantes de um curso assintomático. Alternativamente, pessoas podem expressar seus sintomas como um resultado da conscientização das consequências da doença. A avaliação cuidadosa dos sintomas clínicos seguida do diagnóstico preventivo de indivíduos de alto risco, bem como a informação adequada destes permitem reduções significativas do risco das consequências das complicações macrovasculares (STROJEK, 2003).

A gênese da macroangiopatia em pessoas com DM é complexa porque inclui vários fatores que estão ligados e que demonstram uma relação condicional. Além

disso, as interações da micro e macroangiopatia são consideradas adaptações estruturais (remodelagem) da angiogênese e da artereogênese, e que, progressivamente, vão causando alterações no paciente com DM. Entre as mudanças iniciais está a disfunção endotelial, além disso, o estresse oxidativo associado ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia (KUNZ, 2012).

2.1.2.1 COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES

A patogênese das complicações microvasculares começa no início do DM1 e pode estar presente alguns anos após o diagnóstico, mesmo em jovens. Além disso, a incidência de complicações microvasculares acelera durante a transição para a idade adulta, ilustrando uma trajetória clínica que pode impactar a saúde a longo prazo em pessoas com diabetes de início juvenil e contribuem para morbidade e mortalidade significativas ao longo da vida (TOMMERDAHL et al, 2021). O ISPAD *Clinical Practice Consensus Guidelines* (2018) recomenda que a triagem para complicações microvasculares comece antes dos dez anos de idade (DONAGHUE et al, 2018).

A microangiopatia tende a ocorrer predominantemente nos tecidos onde a absorção da glicose é independente da atividade da insulina. A lesão causada pela hiperglicemia dá-se por subtipos especiais de células: células capilares endoteliais, células mesangiais nos glomérulos renais e células de Schwann (encontrados, por exemplo, no rim, retina, nervo periférico e endotélio vascular). Essas células são expostas à hiperglicemia porque não conseguem reduzir o transporte de glicose no meio intercelular, ao contrário de outras células, cuja glicose intracelular permanece constante devido a um eficiente mecanismo de transporte de glicose (KHALIL, 2017). Isto levou a uma hipótese de que o dano neural ocorre, primariamente, dentro da célula. Essas lesões metabólicas causam alteração no fluxo sanguíneo e mudanças na permeabilidade endotelial, deposição extravascular de proteína e coagulação, resultando em disfunção orgânica, que é responsável por complicações microvasculares (KHALIL, 2017). Por isso, a microangiopatia é responsável pela tríade: nefropatia, retinopatia e neuropatia (KHALIL, 2017).

Tommerdahl et al (2021) evidenciam que muitas pessoas descobrem a DM2 no momento do diagnóstico das complicações microvasculares, entre eles a PSD

(TOMMERDAHL et al, 2021). Ou seja, os sintomas e sinais da PSD é que motivam o paciente a procurar a causa. Isto porque a DM2 é considerada uma doença silenciosa, quando comparada à DM1 que apresenta manifestações graves desde o início (TOMMERDAHL et al, 2021). Por isso a ADA (2016) estabeleceu que todas as pessoas com DM2 devem ser avaliadas para investigar a PSD logo após o diagnóstico da diabetes; e todas com DM1 devem ser avaliadas após 5 anos de diagnóstico; e tanto as com DM1 quanto as com DM2 devem realizar a investigação anualmente para rastreamento da PSD (ASSOCIATION, 2016).

Os esforços para mitigar o aparecimento e a progressão das complicações microvasculares são difíceis pela presença frequente de lesões vasculares significativas; e bem estabelecidas no momento da manifestação clínica (DONAGHUE et al, 2018).

O DCCT realizou um ensaio clínico controlado com o objetivo de avaliar os efeitos do rigoroso controle glicêmico. Foram acompanhados 195 adolescentes com DM1 (entre 13 e 17 anos de idade) durante seis anos e cinco meses; a conclusão foi que o melhor controle glicêmico reduz significativamente o risco de complicações microvasculares. Contudo, o DCCT demonstrou que os efeitos do rigoroso controle glicêmico eram mais eficazes quando introduzido durante os cinco primeiros anos de diagnóstico do DM1 (NATHAN et al, 1993). No final do estudo do DCCT, o EDIC iniciou um estudo observacional com estas pessoas com o objetivo de avaliar os efeitos do controle glicêmico para o desenvolvimento e a progressão das complicações microvasculares, em mais um período de seis anos e cinco meses. Apesar do aumento da média da HbA1C ter sido maior no estudo do EDIC do que durante o DCCT, a redução do risco para o desenvolvimento da retinopatia e da nefropatia foi preservada (LACHIN et al, 2000).

Em uma coorte de adolescentes, acompanhados por uma média de sete anos e quatro meses, foi comparado o rigoroso controle glicêmico com o tratamento convencional e foi observada redução de 53% para o risco e progressão da retinopatia diabética, redução de 60% para a neuropatia clínica e de 54% para a microalbuminúria. Além disso, a média da HbA1C também foi menor no grupo com rigoroso controle glicêmico (8,1% e 9,8%, respectivamente) (WHITE et al, 2010).

Várias hipóteses foram propostas para explicar o processo de desenvolvimento de complicações microvasculares: estresse oxidativo, estimulação da via de poliols,

produção de produtos finais de glicação avançada, iniciação de fluxo através da via da hexosamina, expressão alterada e a ação de fatores de crescimento e desencadeamento da proteína quinase C. Como resultado, conclui-se que o desenvolvimento de complicações é uma combinação direta dos danos causados ao endotélio devido à hiperglicemia (INZUCCHI et al, 2012).

2.2 NEUROPATIA DIABÉTICA

A epidemiologia e a história natural da ND permanecem mal definidas, devido a critérios para o diagnóstico pouco estabelecidos e pela falta de metodologias padronizadas utilizadas para avaliação destes indivíduos (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012). No entanto, foi estimado que 50% das pessoas com diabetes têm ND e 2,7 milhões têm neuropatia dolorosa nos Estados Unidos. A história natural da ND apresenta duas entidades distintas, as que progridem gradualmente com o aumento da duração da diabetes e as que remeteram completamente os sintomas. As neuropatias sensoriais e autonômicas geralmente progridem, enquanto mononeuropatias, radiculopatias e neuropatias dolorosas agudas, apesar de manifestarem sintomas graves, são de curta duração e tendem a se recuperar (VINIK et al, 2013). A progressão da ND está relacionada ao controle glicêmico no diabetes tipo 1 e tipo 2 (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012; VINIK et al, 2013).

No diabetes tipo 1, a deterioração da função nervosa ocorre logo após o início da diabetes tipo 1 (dentro de 2 a 3 anos) e no diabetes tipo 2 o diagnóstico da ND, muitas vezes, é feita no mesmo momento que o diabetes é diagnosticado. Isto é porque, geralmente, o diagnóstico do DM2 é tardio, mas o tempo médio para a lesão nervosa é de 10 anos (TESFAYE et al, 2010).

A ND é um distúrbio em que a anormalidade predominante é a perda de axônios que eletrofisiologicamente se traduz em uma redução de amplitudes e não em velocidades da condução nervosa; portanto, mudanças na eletroneuromiografia podem não ser um meio apropriado para monitorar o progresso ou a deterioração da função nervosa (VINIK et al, 2013).

2.2.1 POLINEUROPATIA SIMÉTRICA DISTAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIABETES TIPO 1

A PSD é definida como polineuropatia sensório-motora comprimento/dependente, simétrica e atribuível a alterações metabólicas e microvasculares, apresentando sintomas e ou sinais de disfunção nervosa periférica em pessoas com diabetes, após a exclusão de outras causas (POP-BUSUI et al, 2016). É provavelmente a forma mais comum de ND (ZIEGLER et al, 2022). Franceschi et al. (2022) conduziram uma revisão sistemática com o objetivo de estimar a prevalência do diagnóstico provável de PSD em pessoas com DM1 o que, de acordo com o estudo, variou entre 13,5% e 62% e a PSD subclínica entre 22% e 88% (FRANCESCHI et al, 2022). Peterson et al (2017) também sugerem que a intolerância à glicose diminuída pode levar à PSD, com prevalência variando de 25% a 62% (PETERSON et al, 2017).

Estudos utilizando biópsias de pele e de nervo mostraram uma redução progressiva nas fibras nervosas periféricas, no momento do diagnóstico do diabetes ou mesmo em estágios pré-diabetes (intolerância à glicose diminuída e síndrome metabólica), (LI et al, 2015). Além disso, Ziegler et al (1998) observaram que a deterioração da função da condução nervosa (CN) motora e sensorial ocorre de modo mais rápido em pessoas com DM1 e com descontrole glicêmico (no primeiro ano).

O envolvimento das fibras nervosas sensoriais causa sintomas negativos (hipoestesia) e positivos (dor, parestesia ou disestesia), com o envolvimento das fibras do tipo fina e grossa. As principais manifestações clínicas são: dormência ou queimação em membros inferiores, formigamento, pontadas, choques, agulhadas, desconforto ou dor ao toque de lençóis e cobertores, queixas de diminuição ou perda de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa em pernas e pés. Ainda que a predominância de sintomas e sinais se localize nos membros inferiores, os membros superiores (mãos e braços) podem, também, ser afetados. É importante destacar que a ausência de sintomas e sinais de parestesia, anteriormente mencionada, não exclui a PSD, pois algumas pessoas evoluem direto para a perda total da sensibilidade (BOULTON; GRIES; JERVELL, 1998). Além disso, os sintomas negativos, como entorpecimento nos pés e pernas, com o tempo evoluem com perda da sensibilidade protetora dos pés e, conseqüentemente, úlceras plantares e amputações, se a neuropatia não for prontamente reconhecida e tratada (BOULTON; GRIES; JERVELL,

1998). Em contrapartida, estima-se que 50% das pessoas podem estar completamente assintomáticos e os sinais só podem ser descobertos por um exame neurológico detalhado (TESFAYE et al, 2010).

Pop-Busui et al (2017) propuseram atribuir três apresentações clínicas a classificação da PSD: neuropatia de fibras finas, neuropatia de fibras grossas e neuropatia mista (envolvimento de fibras grossas e finas) (POP-BUSUI et al, 2017). No Quadro 1, observamos as manifestações da PSD relacionadas ao comprometimento das fibras grossas e das fibras finas. A maioria das pessoas com PSD, no entanto, tem uma variedade "mista" de neuropatia com danos nas fibras nervosas grossas e finas (ZIEGLER et al, 2022).

Muitas vezes, as primeiras evidências de lesão em fibra grossa são a alteração da percepção vibratória, da sensibilidade tátil e da propriocepção articular. Já, as primeiras evidências de envolvimento da fibra fina, normalmente, são a alteração da sensibilidade térmica e dor. A maioria das pessoas com PSD, no entanto, tem uma variedade de neuropatia "mista" com danos de fibra nervosa fina e grossa (DYCK et al, 2011).

Quadro 1- Manifestações da PSD relacionadas ao tipo de fibra comprometida

Neuropatia com envolvimento das fibras finas (A δ mielinizadas e fibras C não mielinizadas)	Neuropatia com envolvimento das fibras grossas (A α / β mielinizadas de condução rápida, podendo envolver nervos sensoriais e ou motores)
Função motora preservada	Ataxia sensorial, atrofia dos músculos intrínsecos dos pés e mão, diminuição da força dos músculos das mãos e pés e deformidade óssea (dedo do pé em martelo)
Reflexos tendinosos profundos preservados	Diminuição ou ausência dos reflexos tendinosos (patelar e ou aquileu)
Dor lancinante, dor em queimação	Diminuição ou ausência da sensibilidade vibratória (geralmente a primeira evidência objetiva)
Hiperalgesia, disestesia e alodinia	Diminuição ou ausência da sensibilidade tátil
Progressão para dormência e hipoalgesia*	Diminuição ou ausência da propriocepção articular (cinestesia)
Diminuição ou ausência da sensibilidade térmica	Sintomas mínimos (sensação de andar sobre algodão, “chão estranho”, incapacidade de virar páginas de um livro ou discriminar moedas)
Função autonômica anormal (diminuição da sudorese, pele seca, comprometimento da vasomoção e do fluxo sanguíneo, pés frios)	Aumento do fluxo sanguíneo da pele (pés quentes)
Perda ou diminuição das fibras nervosas cutâneas observadas em biópsias de pele.	Progressão: fraqueza muscular grave gerando incapacidade de ficar na ponta dos pés e calcanhares e encurtamento do tendão calcâneo e pé equino
Sem alteração na velocidade da CN	Alteração na velocidade da CN
Risco de ulceração plantar e amputação	Maior risco de quedas, fraturas e desenvolvimento de neuroartropatia de Charcot

Nota: (*) o desaparecimento da dor pode não refletir necessariamente a recuperação do nervo, mas sim a morte do nervo (e a progressão da neuropatia deve ser excluída por exame cuidadoso); PSD (polineuropatia simétrica distal); A δ (fibras A Delta), A α / β (fibras Alfa/Beta); CN (condução nervosa)

Fonte: Adaptado de POP-BUSUI et al, 2017.

No exame físico, observamos que a distribuição dos sintomas sensoriais nos membros inferiores é simétrica (do tipo bota ou meia) **(Figura 1)**.

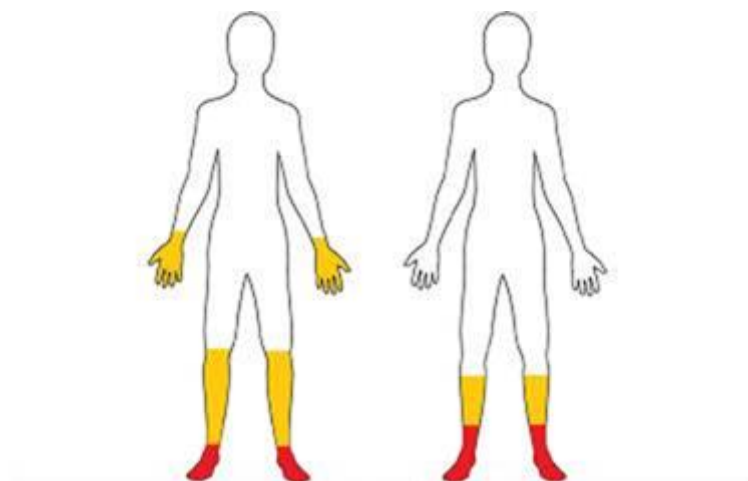


Figura 1 – Subtipos de Polineuropatia Simétrica Distal. Legenda: A figura esquerda refere-se à distribuição de sintomas (luva e bota) característica do envolvimento de fibra grossa; e a figura da direita, ao envolvimento de fibra fina. A cor amarela significa uma área com menor prevalência de sinais e sintomas e a vermelha, uma área com maior prevalência de sinais e sintomas.

Fonte: Adaptado de ZIEGLER et al, 2022.

Em casos mais graves, as mãos podem estar envolvidas (do tipo luva). Os reflexos tendinosos podem estar ausentes ou diminuídos, especialmente nas extremidades inferiores. Pode ser observada uma fraqueza muscular leve, mas raramente a fraqueza é grave e isto, normalmente, é considerado para o diagnóstico diferencial na PSD. A PSD é frequentemente acompanhada de neuropatia autonômica. A neuropatia autonômica é uma complicação comum e grave do diabetes e repercute com grande impacto negativo na sobrevivência e qualidade de vida. Os órgãos que mais frequentemente exibem sinais e sintomas autonômicos proeminentes do diabetes incluem as pupilas, glândulas sudoríparas, sistema genitourinário, sistema gastrointestinal, medular adrenal e sistema cardiovascular. No entanto, a disfunção autonômica subclínica pode ocorrer dentro de um ano de diagnóstico em pessoas com DM2 e, em dois anos, em pessoas com DM1 (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012). A função autonômica anormal está relacionada com a diminuição da sudação, pele seca, vasomoção anormal e pés frios (DYCK et al, 2011).

Podemos encontrar atrofia dos músculos intrínsecos das mãos, deformidade do tipo dedo em martelo nos pés e fraqueza muscular nas mãos e pés. Com a progressão, observamos encurtamento do tendão calcâneo (pé em equino) e, nos casos de fraqueza muscular grave, incapacidade de ficar de pé nos pés ou nos calcanhares. Os sintomas podem ser mínimos (sensação de andar em algodão, incapacidade para virar as páginas de um livro ou alteração na sensibilidade

discriminativa), além disto, pés quentes devido ao aumento do fluxo sanguíneo da pele (TESFAYE et al, 2010; DYCK et al, 2011).

A ulceração do pé é a principal comorbidade associada à PSD, antecedendo à amputação do membro. A PSD aumenta o risco de amputação em 1,7 vezes e quando associada à deformidade dos pés o risco passa a ser 12 vezes maior. Considerando que o paciente com amputação prévia já apresenta um quadro instalado de descontrole glicêmico e PSD, o risco atribuído para a amputação passa a ser ainda maior, 36 vezes (ARMSTRONG; A LAVERY; HARKLESS, 1998).

Muitas doenças podem mimetizar a PSD como, por exemplo, quadros dolorosos que cursam com claudicação intermitente (neuroma de Morton, osteoartrite, radiculopatia, neuropatia de Charcot, fascite plantar, síndrome do túnel tarsal). Todavia, o diagnóstico diferencial é contrastado com as características da dor da PSD que são: simetria, bilateralidade, dor cobrindo todo o pé e particularmente o dorso e piora do quadro à noite, interferindo no sono. Os diagnósticos diferenciais mais importantes, do ponto de vista clínico, incluem as neuropatias causadas por abuso de álcool, uremia, hipotireoidismo, deficiência de vitamina B12, doença arterial periférica, câncer, doenças inflamatórias e infecciosas e drogas neurotóxicas (BOULTON; VALENSI; TEFAYE, 2011).

2.2.1.1 CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA PSD

Estimar a prevalência de PSD é complexo devido à falta de concordância sobre definição e critérios diagnósticos, por isso, ao longo dos anos, várias conferências foram realizadas com o objetivo de estabelecer critérios mínimos para o diagnóstico da PSD. A Figura 2 resume os critérios estabelecidos nas principais conferências e comitês ao longo dos anos.

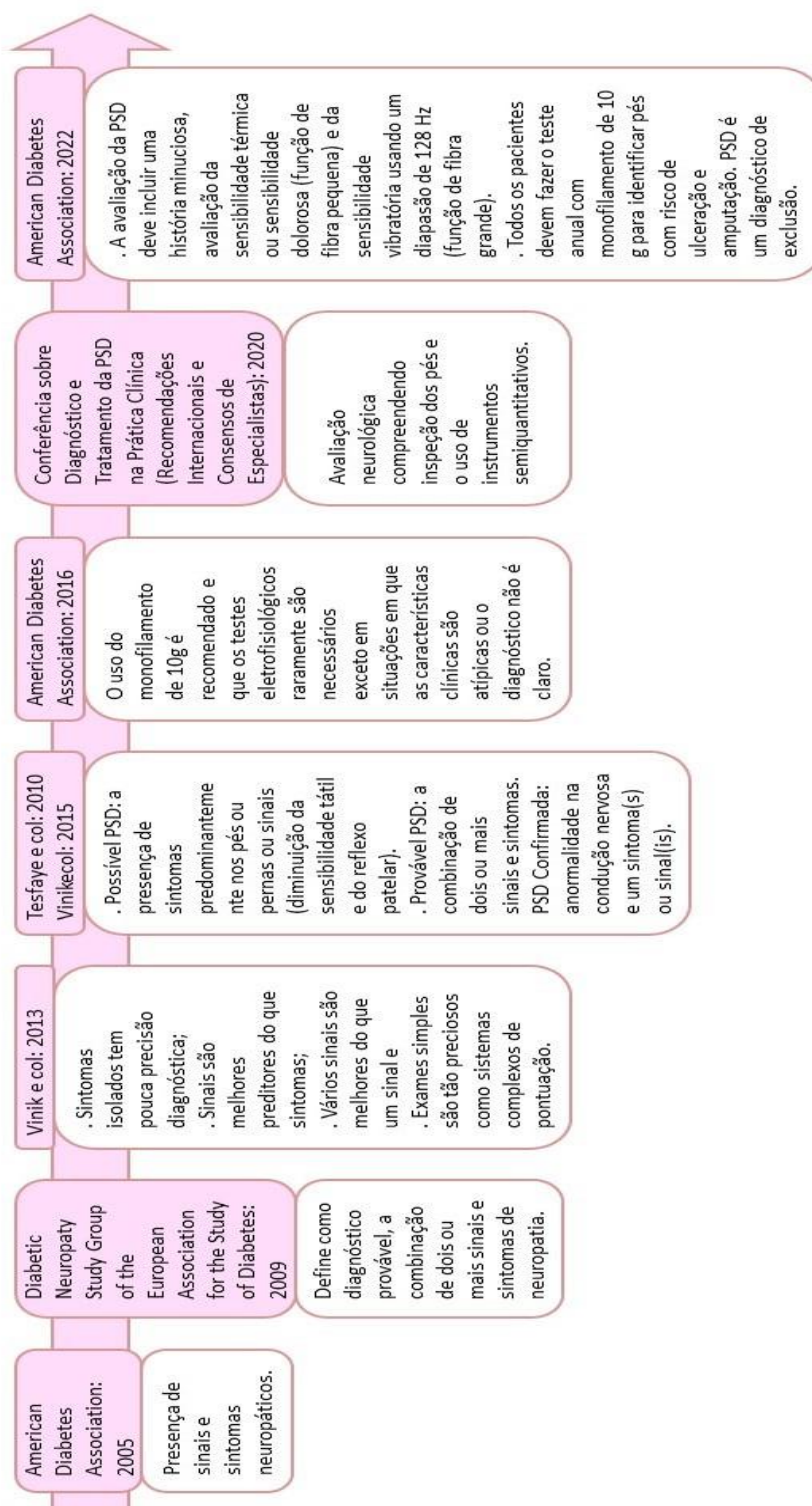


Figura 2 – Critérios para classificar a PSD.

Fonte: Elaborado pela autora com base em BOULTON et al, 2005; TESFAYE et al, 2010; VINIK et al, 2013; TESFAYE et al, 2010; KAKU, VINIK e SIMPSON, 2015; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2016) *Apud* POP-BUSUI et al, 2017; ZIEGLER, 2020 e ELSAYED et al, 2023.

A definição da PSD, na prática clínica, é a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção nervosa periférica em pessoas com diabetes depois da exclusão de outras causas (BOULTON; GRIES; JERVELL, 1998); todavia, o diagnóstico não pode ser feito sem um cuidadoso exame clínico dos membros inferiores. Todos os diabéticos devem ser avaliados anualmente através da sensibilidade dolorosa, térmica e da percepção vibratória (usando um diapasão 128 Hz), monofilamento (10g) e reflexo patelar (ASSOCIATION, 2017).

Os critérios neurológicos básicos envolvem inspeção dos pés e exames neurológicos utilizando instrumentos semiquantitativos: avaliação de sensibilidade, pesquisa de reflexos tendinosos, propriocepção articular e força muscular. O diagnóstico de PSD deve estar alicerçado nos resultados dos exames clínicos e neurológicos, ou seja, na presença de sintomas neuropáticos (positivos e negativos, sensoriais e motores) e sinais (déficit sensorial, fraqueza motora, ausência de reflexos) (BOULTON et al, 2005; VINIK et al, 2006).

Em 2009, durante a 19ª Reunião Anual do Grupo de Estudo de Neuropatia Diabética da Associação Europeia para o Estudo do Diabetes (NEURODIAB) e o 8º Simpósio Internacional de Neuropatia Diabética, que aconteceu em Toronto (Canadá), foram definidas as classificações e critérios diagnósticos para a PSD. Definiu-se como diagnóstico provável da PSD, uma combinação de sinais e sintomas de neuropatia incluindo dois ou mais dos seguintes achados: sintomas neuropáticos, diminuição da sensibilidade distal, diminuição ou ausência de reflexos do tornozelo (Quadro 2). Definiu-se também que para o diagnóstico da PSD é necessário uma anormalidade da CN, algo que pode ser subclínico (assintomático e sem sinais ou sintomas de polineuropatia), ou biópsia de pele, sendo a primeira indicação objetiva e quantitativa da PSD e uma condição necessária para o diagnóstico confirmado (TESFAYE et al, 2010). Em contrapartida, Tesfaye et al (2010) e Pop-Busui et al. (2016) relataram que para a grande maioria dos diabéticos, o diagnóstico da PSD é baseado apenas na história e no exame físico, não sendo necessários testes adicionais. A utilização dos ECN e da biópsia de pele podem ser usados no cenário de pesquisa ou como parte da investigação diagnóstica dos diabéticos com apresentações clínicas atípicas (FELDMAN et al, 2019).

Segundo Vinik et al (2013), a definição de PSD pode basear-se em algumas evidências: [1] sintomas isolados têm pouca precisão diagnóstica para predizer a

presença da PSD; [2] sinais são melhores preditores do que sintomas; [3] vários sinais são melhores preditores do que um único sinal e [4] exames simples são tão precisos como sistemas complexos de pontuação. Em 2016, a ADA considera que os testes eletrofisiológicos e de biópsia de pele raramente são necessários, exceto em situações em que as características clínicas são atípicas ou o diagnóstico não é claro (POP-BUSUI et al, 2016).

Recentemente, a ADA recomenda a avaliação da função das fibras finas e grossas e que a PSD é um diagnóstico de exclusão (ASSOCIATION, 2022).

2.2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE E PROGRESSÃO DA PSD

Dyck (1988) sugeriu um sistema de classificação que pode ser utilizado para avaliar a gravidade e progressão da PSD que estabelece, como critério mínimo, anormalidade no ECN. Portanto, a gravidade da PSD vem sendo atribuída a uma combinação de sintomas e sinais de lesão neural mais anormalidades de testes neurofisiológicos e outras disfunções e deficiências.

A NEURODIAB (2009) e o 8º Simpósio Internacional de Neuropatia Diabética (Toronto-Canadá) também recomendam que o sistema de classificação e critérios diagnósticos para a PSD também seja usado como forma de avaliar a gravidade e a progressão da disfunção neural (Quadro 2) (TESFAYE et al, 2010). Propuseram, também, a utilização de escores de avaliações de sinais e sintomas neurológicos (soma de medidas contínuas), que já são amplamente utilizadas na prática clínica em pessoas com PSD, além disto, sistemas de pontuações para testes de disfunções neurológicas, escalas de avaliação de vida diária e escalas de incapacidade. Independente da abordagem utilizada deve ser garantido proficiência no monitoramento destas pessoas ao longo do tempo (ZIEGLER et al, 2022).

Quadro 2 – Definições e Critérios Mínimos para Classificação e Avaliação da Progressão e Gravidade da PSD

Categoria de Classificação	Definição
Possível PSD	A presença de sintomas ou sinais de PSD: sensação de diminuição dos sintomas, sintomas sensoriais neuropáticos positivos (por exemplo, dormência, formigamento ou dor em pontada, queimação ou dor “dolorida”) predominantemente nos dedos dos pés, pés ou pernas; ou sinais (diminuição simétrica distal da sensibilidade ou diminuição/ausência do reflexo aquileu).
Provável PSD	A presença de uma combinação de sintomas e sinais de neuropatia (incluindo dois ou mais): sintomas neuropáticos, diminuição da sensibilidade distal ou diminuição/ausência do reflexo aquileu.
PSD Confirmada	A presença de uma anormalidade de CN e um sintoma ou sintomas ou um sinal ou sinais de neuropatia confirma PSD. Se a CN for normal, uma medida validada de neuropatia por fibras finas (biópsia de pele) (com evidência de classe 1) pode ser usada.
PSD Subclínica	Sem evidência de sintoma ou sinal neuropático, mas com achados de anormalidade no ECN ou alteração em alguma medida validada para avaliação da fibra fina (exemplos: biópsia de nervo, biópsia de pele).

Nota: PSD (polineuropatia simétrica distal); CN (condução nervosa); ECN (exame de condução nervosa).

Fonte: Adaptado de ZIEGLER et al, 2022.

2.2.1.3 PATOGÊNESE DA PSD

A PSD é um distúrbio neurodegenerativo do sistema nervoso periférico que atinge preferencialmente os axônios sensoriais, axônios autônomos e, posteriormente, os axônios motores (CASHMAN; HÖKE, 2015).

Na Figura 3 observamos que neurônios sensoriais enviam informações de seus terminais nervosos para o corno dorsal da medula espinhal e seus corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG). Por outro lado, os corpos celulares dos neurônios motores residem no corno ventral da medula espinhal e transmitem informações para a periferia. Axônios podem ser mielinizados ou amielínicos. Embora a PSD não seja, prioritariamente, uma neuropatia desmielinizante, as células de Schwann são alvo da hiperglicemia e por sua vez, mantêm uma interrelação com o axônio. Portanto, o comprometimento das células de Schwann afeta a regulação das propriedades do citoesqueleto e o seu

comprometimento pode afetar diretamente a função axonal. Por sua vez, disfunções nos axônios estão associadas a alterações no pericárdio (FELDMAN et al, 2019).

A lesão neural, em pessoas com PSD, caracteriza-se por uma degenerescência com início nos segmentos mais distais do seu prolongamento axonal, *dying back* (morte retrógrada). Seu padrão de envolvimento de "meia e luva" significa que os danos são, primariamente, nos axônios sensoriais mais longos e, por isto, uma neuropatia comprimento-dependente (CASHMAN; HÖKE, 2015).

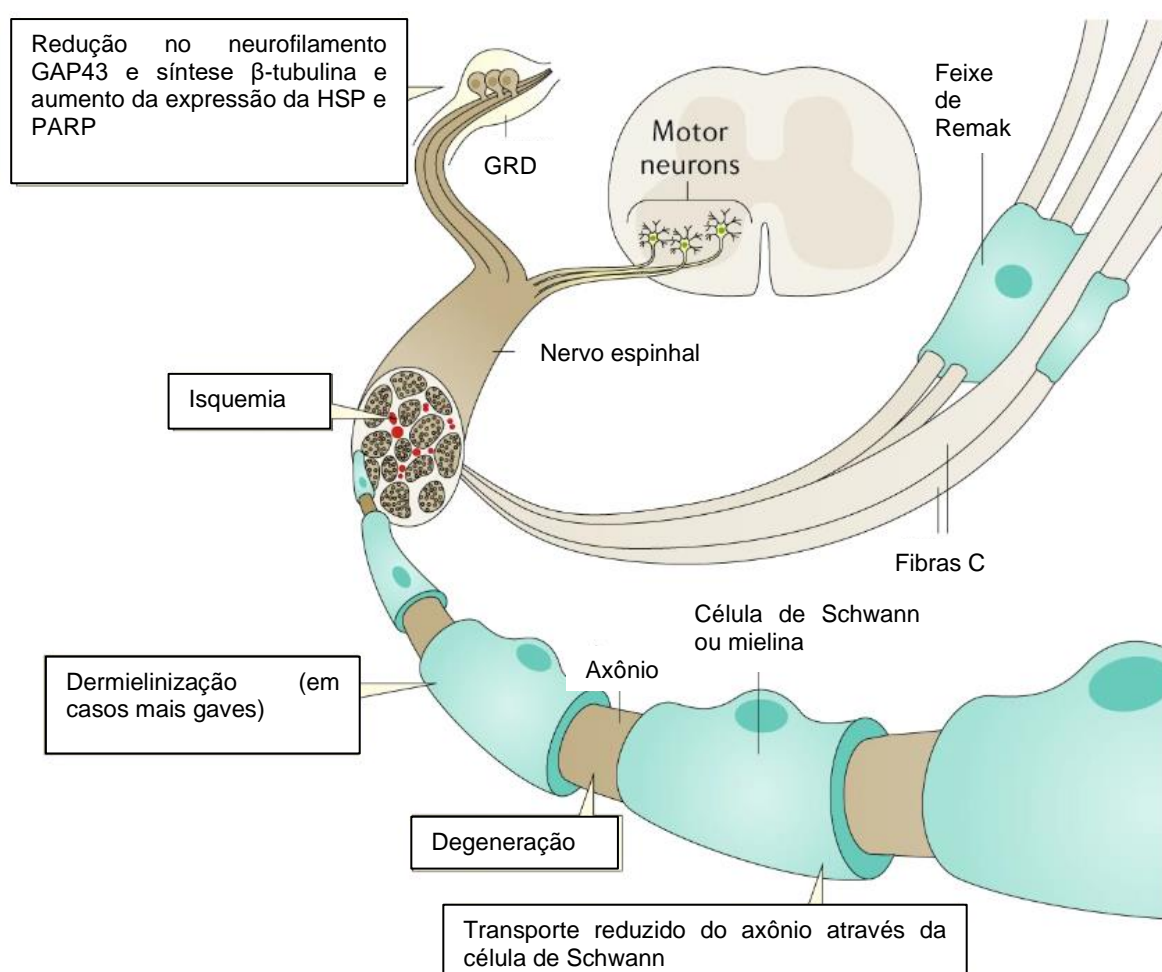


Figura 3 - Possíveis Alterações em um Neurônio Sensorial na PSD

Nota: GRD (gânglios da raiz dorsal); GAP43 (proteína 43 associada ao crescimento celular); HSP (proteína de choque térmico); PARP (poli ADP-ribose polimerase).

Fonte: Adaptado de FELDMAN et al, 2019.

A hiperglicemia crônica de longa duração sobreposta aos fatores de risco cardiovascular são os maiores mecanismos patogênicos (VINIK et al, 2013). O tempo de diagnóstico também é importante para a avaliação da PSD isto porque para se

estabelecer uma lesão nervosa deverá, necessariamente, que ter exposição ao principal fator de risco – a hiperglicemia (STEVENS; SHAKHER, 2011).

A patogênese da PSD, na maioria das vezes, é induzida pela hiperglicemia. Uma vez dentro da célula, pode ativar quatro vias de mecanismos tóxicos e induzir ao dano neural (Figura 4).

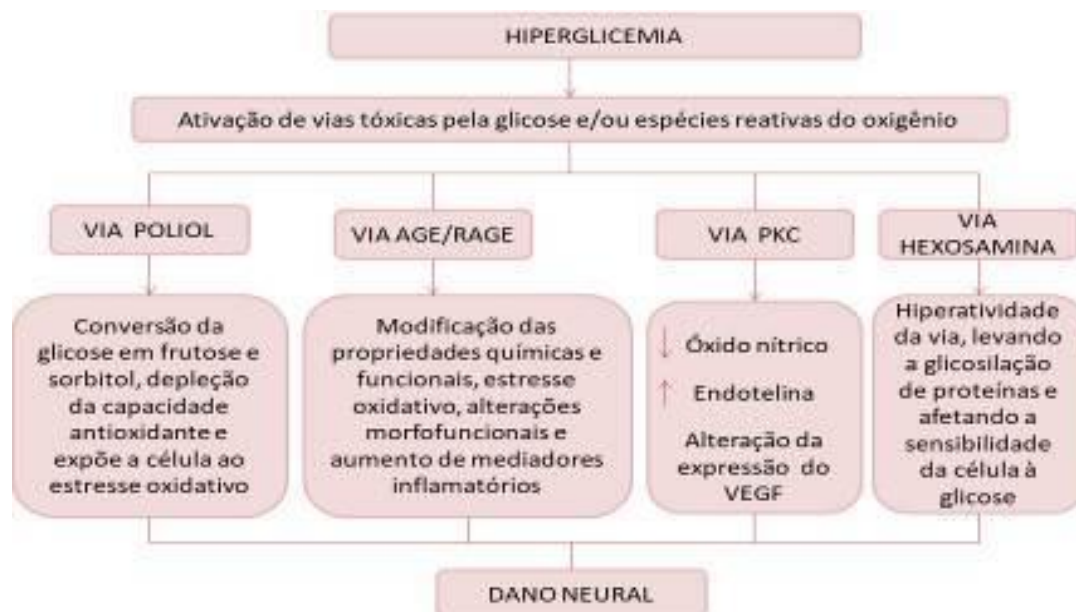


Figura 4 – Principais Mecanismos Implicados na Patogênese da PSD.

Fonte: Adaptado de Dagogo-Jack, S (2013). Complicações do diabetes melito. [http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5484/complicacoes_do_diabetes_melito_%E2%80%93_samuel_dagogo_jack.htm]

As quatro vias são:

Via Poliol – É o mecanismo metabólico mais largamente citado na patogênese da PSD. A glicose penetra em níveis altos dentro dos nervos periféricos e é convertida em sorbitol pela enzima aldose redutase, presente normalmente no axoplasma. O acúmulo de sorbitol intracelular provoca diminuição do transporte ativo de vários metabólitos, entre eles o mio-inositol. A diminuição do mio-inositol altera os mecanismos de regulação intracelular, dessa forma, reduzindo a atividade da enzima sódio potássio-ATPase que, por sua vez, reduz a atividade da bomba Na/K, com o consequente acúmulo de sódio intracelular e alterações do potencial de repouso da membrana. Essas anormalidades diminuem a velocidade de condução neural e produzem as primeiras e reversíveis alterações estruturais nos nódulos de Ranvier. De fato, foi demonstrado que inibidores da enzima aldose redutase normalizam ou

melhoram várias funções alteradas do nervo periférico do diabético. O acúmulo de sorbitol no endotélio endoneural e o subsequente edema podem, diretamente, alterar a produção de prostaciclina e comprometer a difusão do oxigênio (O₂) (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; VINIK et al, 2013).

Via AGE (*advanced glycosylation end products*) – É o produto final da glicação avançada. Os efeitos patológicos das AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais e levam a estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento de mediadores inflamatórios. As AGEs também podem estar envolvidas no processo de espessamento dos vasos sanguíneos que suprimem os nervos causando isquemia vascular (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; VINIK et al, 2013).

Via PKC (*proteína quinase C*) - As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas. Este processo é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas. A ativação da PKC resulta em diminuição da produção de óxido nítrico (vasodilatador), aumento da atividade da endotelina (vasoconstrictor), alteração da expressão de fatores de crescimento endotelial vascular. Estas alterações resultam em uma vasoconstrição, aumento da permeabilidade capilar e comprometimento do fluxo sanguíneo; que podem transformar-se em edema, hipóxia e estímulo à neovascularização (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; VINIK et al, 2013).

Via Hexosamina - A hiperatividade da hexosamina (enzima reguladora – glutamina) leva à glicosilação de proteínas e afeta a sensibilidade da célula à glicose. A ativação destas, pela hiperglicemia, leva ao dano neural (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; VINIK et al, 2013).

A disfunção nessas vias promove um processamento anormal de proteínas, disfunção mitocondrial e dano oxidativo, levando à perda da função neural (FELDMAN et al, 2019).

O estresse oxidativo é o produto final de todas essas vias induzidas pela hiperglicemia e resulta na produção de radicais livres, excedendo a capacidade antioxidante desse sistema. Várias espécies de radicais livres são normalmente produzidas no corpo para desempenhar funções específicas: superóxido (O₂⁻),

peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO); são três espécies reativas de oxigênio (ROS) de radicais livres que são essenciais para a fisiologia normal, mas também se acredita que elas acelerem o processo de envelhecimento e mediem a degeneração celular (VINCENT et al, 2004). O excesso do radical livre danifica proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, inibindo parcialmente a enzima da via glicolítica (GAPDH) e resulta em aumento dos metabólitos formados antes da ação da GAPDH. Esses metabólitos são desviados para utilização nas quatro vias metabólicas, induzidos pela hiperglicemia, levando a diminuição da atividade biológica, à perda do metabolismo energético, sinalização celular, transporte e outras funções importantes da célula (BOGHDADY; BADR, 2012). Esse estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de mecanismos necróticos e apoptóticos em neurônios e células gliais de suporte e, portanto, sendo um mecanismo unificador que leva a danos no sistema nervoso nos diabéticos (CASHMAN; HÖKE, 2015).

O oxigênio é um elemento químico altamente reativo que tem a capacidade de se tornar parte de moléculas potencialmente nocivas e prejudiciais (radicais livres). O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no equilíbrio de antioxidantes e pró-oxidantes, ou seja, ele se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes na remoção das moléculas altamente reativas (ROS) ou quando há produção excessiva de ROS. Como resultado, células saudáveis do corpo perdem a sua função e estrutura (VINCENT et al, 2004).

Os sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa celular contra o estresse oxidativo envolvem vários compostos, entre eles as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e o sistema glutatona, que engloba a glutatona e as diferentes enzimas envolvidas em seu metabolismo (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008) (Figura 5).

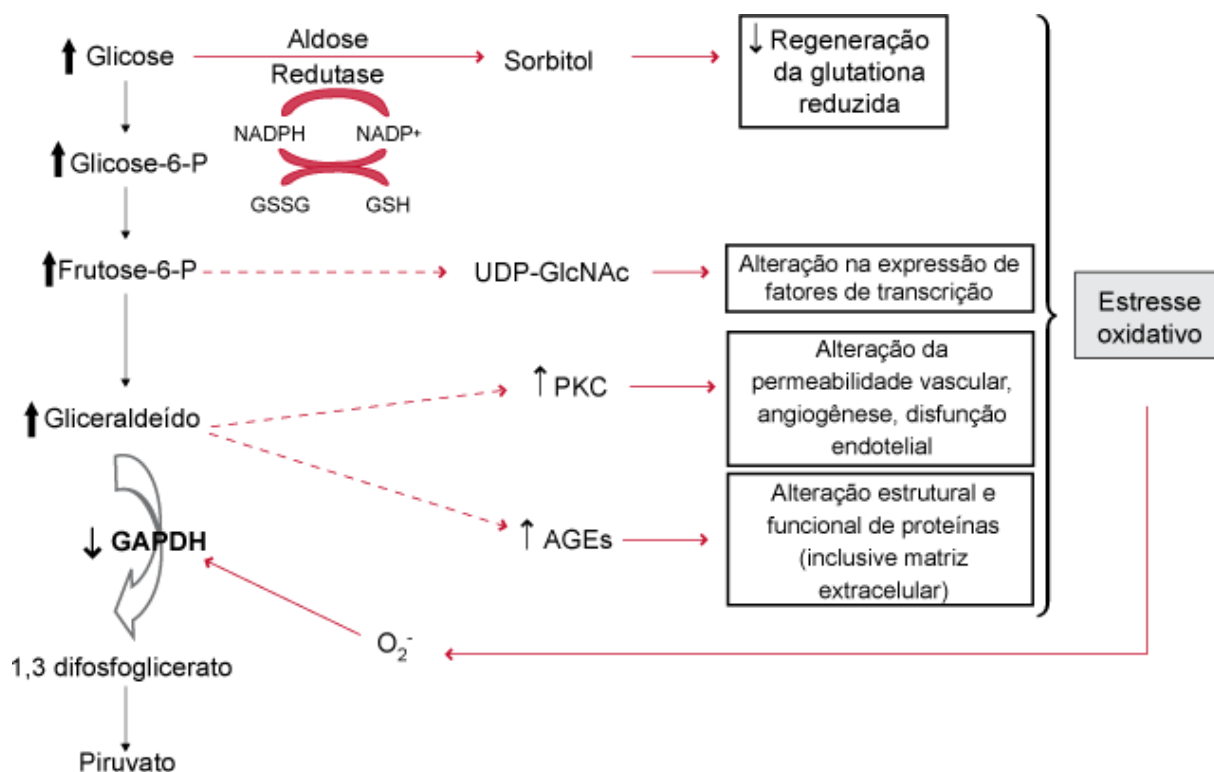


Figura 5– Mecanismos propostos para explicar o dano celular pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas.

Legenda: O excesso de radical superóxido (O_2^-) inibe parcialmente o GAPDH (enzima da via glicolítica), resultando em aumento dos metabólitos formados antes da ação do GAPDH. Esses metabólitos são desviados para utilização nas quatro vias metabólicas responsáveis pelo dano celular da hiperglicemia, em um ciclo vicioso que aumenta a geração de O_2^- .

Fonte: Adaptado de CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008.

2.3 POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PSD

O papel da hiperglicemia crônica é bem estabelecido na literatura como fator de risco para as microangiopatias, mas outros determinantes também estão associados (idade no início do diagnóstico, duração do DM, gênero e predisposição genética) (APELQVIST et al, 2008). A predisposição genética tem sido relacionada à susceptibilidade para complicações microvasculares, podendo desempenhar um papel importante nas velocidades de progressão e na gravidade do dano neural entre as pessoas com PSD (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008; POLITI et al, 2016).

A predisposição genética é a probabilidade aumentada de se desenvolver uma determinada doença, de acordo com os marcadores genéticos de um indivíduo e as variações genéticas, frequentemente herdadas do pai e/ou da mãe; não sendo causa direta para uma determinada condição ou doença, mas atuando de forma colaborativa. O risco genético pode ser maior ou menor dependendo da doença e,

também, da associação com outras variáveis: alimentação, fatores ambientais e estilo de vida (ASKARI et al, 2019)

Polimorfismos genéticos são elementos-chave para o estudo da genética e podem ser definidos como a coexistência de formas alélicas múltiplas para um mesmo *locus* gênico, como componentes estáveis, com frequência superior a 1% dos alelos na população, ou seja, variações mais comuns na sequência do DNA na população. São classificados de acordo com a forma como a sequência de DNA varia entre os diferentes alelos: polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), inserção/deleções (indels), variantes no número de cópias ou inversões (KAZEMI, 2010).

Numerosos genes foram estudados como candidatos à suscetibilidade à PSD (JIN; PARK, 2018; BASOL et al, 2013; KAZEMI, 2010) e as citocinas compõe um grupo particular associado à lesão neural porque influenciam na resposta inflamatória (KAZEMI, 2010). Portanto, apesar da via inflamatória, desencadeada pela hiperglicemia ser extremamente importante no desenvolvimento da PSD, citocinas inflamatórias podem estar envolvidas neste progresso (Figura 6) (JIN; PARK, 2018).

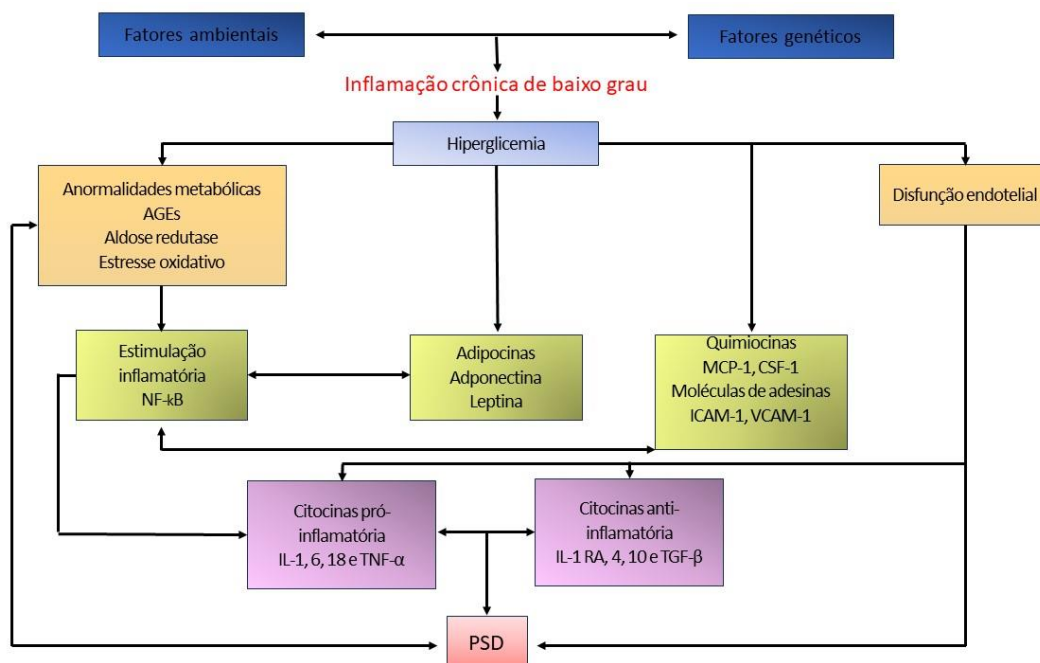


Figura 6 - Papel dos biomarcadores inflamatórios na neuropatia periférica diabética

Legenda: Via inflamatória da hiperglicemia como risco para o desenvolvimento da PSD.

Nota: AGEs = produtos finais de glicação avançada; CSF = fator estimulante de colônias; CTGF = fator de crescimento do tecido conjuntivo; ICAM = molécula de adesão intercelular; IL = interleucina; MCP = proteína quimioatraente de monócitos; NF-κB = fator nuclear kappa potenciador da cadeia leve de células B; TGF = fator transformador de crescimento beta; TNF-α = fator alfa de necrose tumoral; VCAM = molécula de adesão celular vascular; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Adaptado de JIN; PARK, 2018.

2.3.1 INTERLEUCINA-4

A *IL-4* é uma importante citocina pleiotrópica, secretada por células Th2, eosinófilos e mastócitos. Considerada como a assinatura do subgrupo Th2, ela desempenha um papel na formação de células endoteliais e no estímulo à troca de classe de cadeia pesada Ig da célula B para o isótipo IgE e IgG1, mas inibe a troca para IgG2a, IgG2b e IgG3 (Figura 7) (BASOL et al, 2013). A *IL-4* é um fator de crescimento para os mastócitos e desempenha um importante papel regulador nas respostas alérgicas. Nos macrófagos, a *IL-4* inibe a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1β. A *IL-4* também é importante para a defesa contra helmintos porque a produção de IgE promovida pela *IL-4* prejudica a capacidade dessas células de produzir intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e bloqueia a expressão induzida por IFNγ de moléculas de adesão celular. No entanto, a *IL-4* também pode induzir DCs e macrófagos a regular positivamente a sua síntese de *IL-12*, fornecendo um mecanismo de *feedback* negativo para regular a resposta Th2 (MAK; SAUNDERS, 2006). Ou seja, tem um papel importante na formação de

moléculas de adesão de células endoteliais, quimiotaxia de células imunes e anti-inflamatória (MAK; SAUNDERS, 2006).

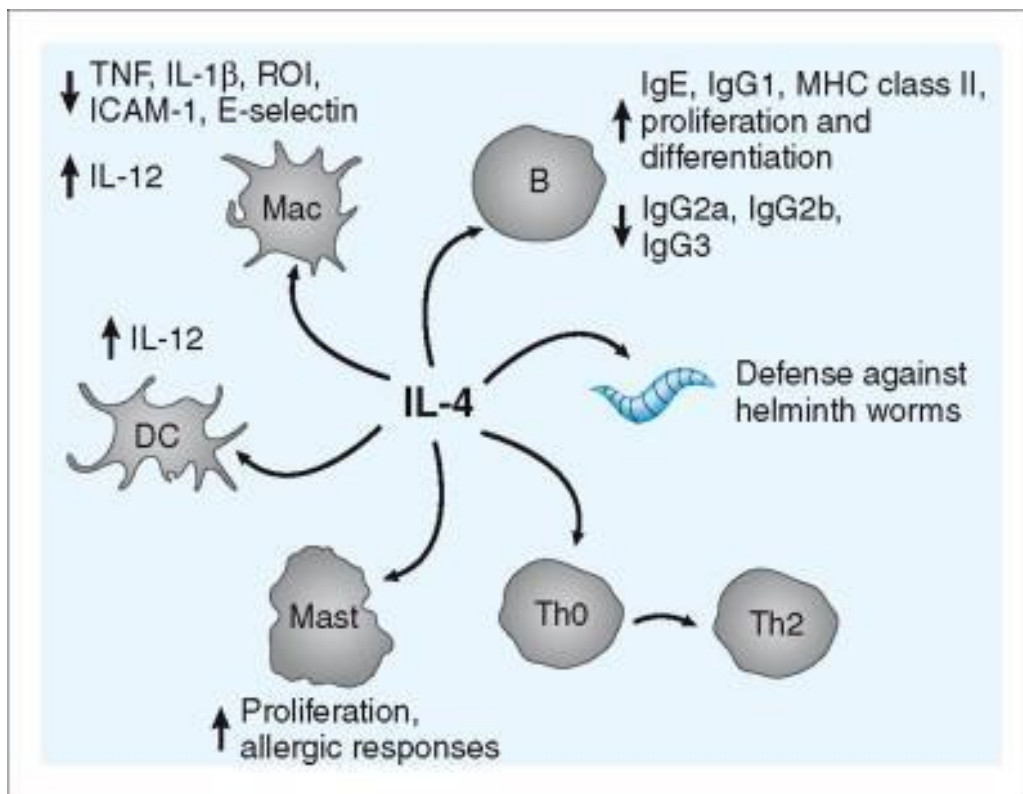


Figura 7 – Expressões da *IL-4*
Fonte: Adaptado de MAK; SAUNDERS, 2006.

O polimorfismo VNTR do gene *IL-4* está associado a várias doenças inflamatórias (TONG et al, 2013), incluindo a PSD (BASOL et al, 2013).

O gene da *IL-4* (*IL4*) encontra-se no braço longo do cromossomo 5 (5q31-33), onde está localizado dentro do grupo de outros genes de citocinas Th2 (ARABABADI, 2010). Vários polimorfismos foram implicados na regulação e na produção da *IL-4* e uma variante importante é a repetição em tandem de número variável (VNTR) contendo 70 pb, localizado no terceiro íntron do gene (BURACZYNSKA et al, 2017). Dois alelos são comumente observados nas populações: um com uma repetição de 70 pb e outro com duas repetições de 70 pb (TONG et al, 2013). (lembrando que há um terceiro alelo - raro - que contém 3 repetições)

2.3.2 METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

Metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) é uma enzima codificada pelo gene *MTHFR* em humanos e apresenta um papel importante no metabolismo do folato e da homocisteína. *MTHFR* estimula a transformação da homocisteína em metionina pela via de remetilação, estando o gene codificador localizado no braço curto do cromossomo 1, em 1p36 (YIGIT; KARAKUS; INANIR, 2013).

A hiper-homocisteinemia é o resultado da diminuição da atividade da enzima *MTHFR*. Mutações no gene *MTHFR* podem levar à redução da atividade enzimática e comprometer a função nervosa por meio de efeitos citotóxicos diretos ou como resultado de lesões oxidativas da célula endotelial (HAMIDI; RADFAR; AMOLI, 2018).

MTHFR catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, que é a forma ativa de folato e co-substrato para a remetilação de Hcy em metionina (Hcy é um aminoácido potencialmente tóxico) (Figura 8). A variante c.677C>T (rs1801133) em *MTHFR* consiste de uma mutação pontual do tipo substituição (substituição C→T no nucleotídeo 677) que resulta em uma substituição do aminoácido Alanina para Valina na posição 222 da proteína, tendo como consequência a produção de uma enzima com aumento na termolabilidade e atividade 50% diminuída. Mais de dez polimorfismos foram descritos no gene *MTHFR* e a variante C677T (rs1801133) é um dos mais investigados. Indivíduos com duas cópias de 677C (677CC) têm o genótipo “tipo selvagem”. Diz-se que indivíduos 677TT (homozigotos) têm deficiência de *MTHFR*, causando baixo nível de folato ativo (MIRANDA-MASSARI et al, 2011). Para a conversão do ácido fólico em 5-metil THF é necessária uma ativação de várias enzimas, além de uma adequada função hepática, gastrointestinal e de vitaminas (B3, B6, B12, C) e o mineral zinco como cofatores. Aproximadamente, a metade dos indivíduos se revela incapaz de converter totalmente o ácido fólico em 5-metil THF e o polimorfismo *MTHFR* C677T tem sido associado à hiper-homocisteinemia (YIGIT; KARAKUS; INANIR, 2013).

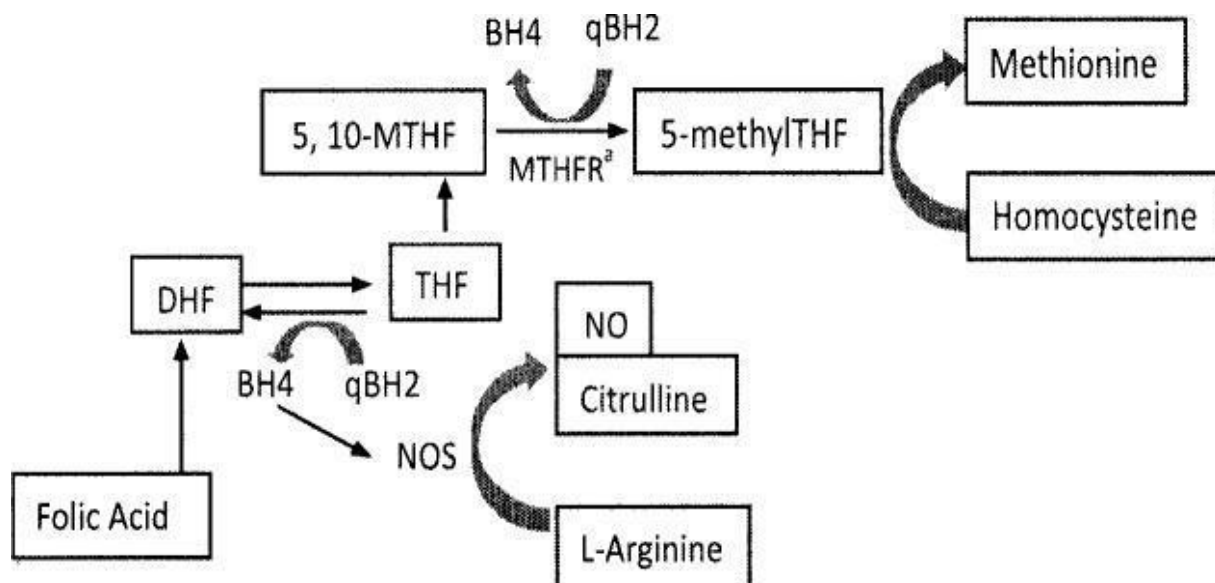


Figura 8 – Metabolismo do Ácido Fólico, Homocisteína e Óxido Nítrico

Nota: *MTHFR* = metileno-tetrahydrofolato redutase; 5, 10-MTHF = 5, 10 metileno-tetrahydrofolato; DHF = desidrofolato; THF = tetrahydrofolato; NOS = sintase de óxido nítrico; BH4 (= etrahydrobiopterina; NO = óxido nítrico.

Fonte: Adaptado de MIRANDA-MASSARI et al, 2011.

A mutação c.677C>T é considerada a causa genética mais comum de níveis elevados de homocisteína e alguns estudos relacionam o polimorfismo *MTHFR* com complicações vasculares do diabetes, incluindo a PSD (HAMIDI; RADFAR; AMOLI, 2018; JIMÉNEZ-RAMÍREZ et al, 2017; ASKARI et al, 2019).

3 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

A prestação de saúde e assistência social para pessoas com DM1 está associada a elevados custos, inclusive os relacionados com reposição de insulina, internação, consultas e tratamento das complicações. Além disso, o ônus da DM1 reflete a perda da expectativa de vida que é reduzida para 5-20 anos (KARL et al, 2022; FEDERATION, 2022). O início precoce do DM1 na infância determina maior exposição aos distúrbios metabólicos da doença quando comparado com a diabetes no adulto, aumentando os encargos da doença (KARL et al; 2022).

Como a incidência do DM1 tem aumentado, particularmente nas crianças, o peso das complicações também irá aumentar e influenciar negativamente no prognóstico da doença (FEDERATION, 2021). A PSD é uma complicação importante e contribui para a morbidade do DM1. A descoberta de marcadores precoces de risco deve estimular o debate quanto à necessidade de intervenções terapêuticas adicionais para fornecer proteção contra as complicações nessa faixa etária. Investigações visando esclarecer os fatores etiológicos, tanto genéticos quanto ambientais envolvidos na patogênese das PSD e a identificação de marcadores biológicos, que refletem a sua influência, poderiam ajudar na identificação de indivíduos em risco de desenvolver a PSD e permitir a implementação de estratégias preventivas e terapêuticas para reduzir o seu desenvolvimento e/ou progressão.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

- Descrever as associações de polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com provável diagnóstico de polineuropatia simétrica distal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a prevalência do diagnóstico provável da polineuropatia simétrica distal em crianças com DM 1;

- Identificar, na amostra estudada, polimorfismos C677T do gene *MTHFR* e do polimorfismo VNTR do intron 3 do gene *IL4* que possam estar associados ao provável diagnóstico de polineuropatia simétrica distal.

- Estimar a concordância entre os observadores no diagnóstico da polineuropatia simétrica distal.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO E AMOSTRA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo observacional do tipo seccional. Todas as crianças e adolescentes, com cinco ou mais anos de diagnóstico do diabetes tipo 1, acompanhadas no ambulatório de diabetes, do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG) e do Ambulatório de Diabetes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), que aceitaram participar do estudo foram avaliadas para o diagnóstico provável da PSD. Como as crianças/adolescentes frequentam o ambulatório de três em três meses, foi possível o rastreamento no período compreendido entre março de 2017 a dezembro de 2018, além disso, analisando a frequência dos atendimentos, observamos que crianças/adolescentes não faltam mais do que duas consultas.

Todas as crianças e adolescentes que participaram do estudo e seus respectivos pais cederam material salivar para obtenção de DNA genômico, que foi utilizado para estudo de variantes genéticas polimórficas do gene da *IL-4* e do gene da *MTHFR*. Estas amostras constituíram um banco de DNA, depositado no Laboratório de Genética Molecular Humana, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

5.2 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

5.2.1 FICHA DE AVALIAÇÃO ESTRUTURADA

Para coleta de informações foi utilizado pesquisa em prontuário e ficha de avaliação estruturada (Apêndice 1).

Os sinais clínicos foram avaliados com o *Diabetic Neuropathy Examination* (DNE) (MEIJER et al, 2000) e os dados foram obtidos através de um exame neurológico minucioso. O DNE consiste de oito itens, dois testes de força muscular (quadríceps femoral e tibial anterior), reflexo (tríceps sural) e cinco sensações (sensibilidade dolorosa no segundo dedo e no hálux, sensibilidade ao toque, percepção vibratória e percepção articular do hálux). A avaliação da percepção vibratória foi feita com diapasão de 128 Hz e a resposta foi considerada anormal quando o paciente não sentiu a vibração ou quando o paciente perdeu a percepção vibratória enquanto o examinador ainda percebia. O reflexo e as sensações avaliadas

foram registrados como presente (0), diminuído (1) ou ausente (2). O DNE preconiza a avaliação apenas no membro inferior direito e, em caso de ulceração ou calosidade, as sensações são avaliadas no membro inferior esquerdo. A ideia de otimizar a condução clínica apenas em um lado (membro inferior direito) provavelmente seja devido à característica da PSD ser simétrica, ou seja, em razão de os *déficits* em um dimídio ser representativo para o outro. Mas a avaliação foi conduzida nos dois membros inferiores em razão da assimetria dos *déficits* motores e sensoriais ser entendida como um critério de exclusão, por considerar a necessidade de se investigar outras causas de lesão neural que cursem com *déficits* assimétricos (diagnóstico diferencial) (ZIEGLER et al, 2022). A pontuação máxima é 16; e quando >3 é considerada significativa para a presença da PSD. O reflexo aquileu também foi investigado e também registrado como presente, diminuído ou ausente.

The Neuropathy Symptom Score (NSS) foi utilizado para avaliar a neuropatia sensorial (MOREIRA et al, 2005) que consiste de cinco itens relacionados à experiência de dor e desconforto nas pernas. Os participantes são questionados e atribui-se uma pontuação para cada item: (1) presença de queimação, dormência ou formigamento (2 pontos) e fadiga câimbras ou prurido (1 ponto); (2) sintomas presentes nos pés (2 pontos) ou panturrilha (1 ponto); (3) exacerbação noturna dos sintomas (2 pontos) ou presença durante o dia e noite (1 ponto) e apenas durante o dia (0 ponto); (4) os sintomas já o acordaram durante a noite (1 ponto) ou não (0 ponto); (5) o paciente é perguntado se realiza alguma manobra para diminuir os sintomas: andar (2 pontos), ficar de pé (1 ponto), sentar ou deitar (0 ponto). O escore máximo para os sintomas é 9. A gravidade dos sintomas é classificada de acordo com o NSS da seguinte forma: sem alteração (0–2), leve (3–4), moderada (5–6), e grave (7–9). Além disso, foram colhidos os relatos dos sintomas (dor em pontada, dor em agulhada, dor em punhalada formigamento, queimação, choque, dormência e outros) (PEDROSA et al, 1998).

Foi utilizado o monofilamento de náilon de 10 g de Semmes-Weinstein (SORRI, Bauru) para avaliar a perda de sensibilidade protetora dos pés em quatro diferentes locais da região plantar de ambos os pés (1º, 3º, e 5º metatarso e 1º pododáctilo) (SOUZA et al, 2005). Durante o teste a criança/adolescente teve a visão ocluída. O filamento foi aplicado perpendicularmente à superfície testada, exercendo uma tensão até se curvar e mantendo-o por dois segundos. Áreas ulceradas, necróticas, cicatriciais ou com calosidades foram excluídas. O método sim/não foi utilizado, no

qual a criança/adolescente diz sim para cada sensação percebida à aplicação do monofilamento. Foi considerada perda da sensibilidade protetora quando não houve percepção ao toque em pelo menos um local testado.

A sensibilidade térmica foi avaliada através de dois tubos de ensaio, um contendo água fria (5° a 10° C) e outro com água quente (40° a 54° C), mantidos em equipamento com banho-maria digital (Marca 7Lab, que permite temperatura de 5°C até 100°C). A criança e ou adolescente deveria identificar as temperaturas e suas diferenças nos pés (CAMPBELL; BAROHN, 2014).

5.2.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS, EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM MOLECULAR

As amostras de saliva foram obtidas através de bochechamento de 3mL, de solução de sacarose à 3% e o DNA, obtido a partir da metodologia de extração salina descrita por Aidar e Line (2007). Todas as crianças e adolescentes que participaram do estudo foram submetidas à coleta do material biológico. O material somente foi colhido após a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice 3) pelo responsável e, quando necessário, o “Termo de Assentimento” (Apêndice 2), pela criança e ou adolescente. O material obtido foi quantificado através de espectrofotometria de volumes reduzidos em um equipamento modelo NanoDrop™; e armazenado a -20°C para investigação do polimorfismo *MTHFR* C677T (rs1801133) e do VNTR *IL-4*. A mutação *MTHFR* C677T foi analisada através do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) baseado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial de desnaturação de 5 min a 94 °C; seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 61 °C e 30 s a 72 °C; e de uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C. As sequências dos iniciadores utilizados para a PCR foram 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' e 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. A PCR foi realizada em um volume total de 25 µl de reação, contendo 100 ng de DNA, 2,5 µl de tampão de PCR 10X, 200 µM de dideoxinucleotídeos trifosfatos, 10 pM de cada iniciador e uma unidade de Taq DNA polimerase. Após a amplificação, o produto de PCR de 198 pb (pares de base) foi digerido com a endonuclease de restrição *HinfI* a 37 °C, em 15 µl de solução de reação contendo 10 µl de produto de PCR, 1,5 µl de tampão 10X e duas unidades de *HinfI*. Os produtos da digestão foram separados em géis de agarose 3% e os

fragmentos corados com brometo de etídio foram fotografados em um transiluminador ultravioleta. Indivíduos homocigotos do tipo selvagem (CC) foram identificados por apresentarem apenas um fragmento de 198 pb, heterocigotos (CT) apresentavam fragmentos de 198 pb e 175/23 pb e variantes homocigotos (TT) por fragmentos de 175/23 pb.

O polimorfismo VNTR, no íntron 3 do gene *IL-4*, foi analisado por PCR-SSLP em um volume total de reação de 25 µl contendo 3µl de solução de DNA, 10µl tampão de reação, 2 µl de primer sense (5'-GTAAATAGGCTGAAAGGGGGAAA-3') e primer anti-senso (5'-CATCTTTTCCTCCCCTGTATCTT-3') e 1U de TAq DNA polimerase. As condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação de 2 min a 95 °C; seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 56 °C e 30 s a 72 °C; seguido de uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% e os fragmentos gerados foram visualizados sob luz ultravioleta após serem corados com brometo de etídeo. O alelo comum ou tipo selvagem é representado por uma sequência de três repetições de 70 pb (3R = A1) aparece como uma banda de tamanho 342 pb; o alelo raro é representado por duas repetições de pb (2R = A2) aparece no tamanho de banda de 272 pb. Os genótipos foram representados por A1A1 (homocigoto), A1A2 (heterocigoto) e A2A2 (variante homocigota).

As crianças que estavam de acordo com os critérios de inclusão coletaram material para a análise genética no mesmo momento da avaliação física. As amostras de saliva foram encaminhadas para o Laboratório de Genética Molecular Humana, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ); e após a análise foram descartadas.

5.3 CLASSIFICAÇÃO DA PROVÁVEL POLINEUROPATIA SIMÉTRICA DISTAL

Diabetic Neuropathy Study Group of the European Association for the Study of Diabetes (2009) publicou atualizações relativas à classificação e ao critério diagnóstico para a PSD, definindo como diagnóstico provável a combinação de sinais e sintomas de neuropatia, incluindo dois ou mais dos seguintes achados: sintomas neuropáticos, diminuição da sensibilidade distal, diminuição ou ausência de reflexos do tornozelo (*Apud* TESHAYE et al, 2010; VINIK et al, 2013).

Como utilizamos dois instrumentos de avaliação – um para investigar sintomas e outro para a avaliação dos sinais motores – consideramos como diagnóstico provável de PSD todas as crianças/adolescentes que apresentarem: (TESFAYE et al; 2010; VINIK et al, 2013; POP-BUSUI et al, 2016)

- DNE>3 ou NSS>2 mais perda da sensibilidade protetora dos pés; ou
- NSS>2 mais alteração da sensibilidade térmica; ou
- NSS>2 mais alteração do reflexo aquileu; ou
- Alteração da sensibilidade térmica mais perda da sensibilidade protetora dos pés; ou
- Alteração da sensibilidade térmica mais alteração do reflexo aquileu; ou
- Perda da sensibilidade protetora dos pés mais alteração do reflexo aquileu.

5.3.1 DEFINIÇÃO DO CASO E UNIVERSO DO ESTUDO

Definiu-se como casos de diabetes tipo 1 todos aqueles, em cujos registros do ambulatório, constavam diagnóstico de DM1. Os critérios de inclusão para a avaliação da provável PSD e aplicação do questionário foram: (1) crianças e adolescentes de ambos os sexos; (2) diagnóstico de DM1 há cinco anos ou mais (ASSOCIATION, 2022); (2) serem capazes de entender o exame; (3) ser aprovado no Teste de Aquiescência – teste de compreensão e veracidade de respostas para perguntas simples (Anexo 1) (CUMMINS, 1997); (4) crianças alfabetizadas (5) até 18 anos de idade. Estes critérios estão em consonância com as recomendações da *American Diabetes Association* (2022):

"All patients should be assessed for diabetic peripheral neuropathy starting at diagnosis of type 2 diabetes and 5 years after the diagnosis of type 1 diabetes and at least annually thereafter."

Os critérios de exclusão foram: (1) doença associada que tenha similaridade com os sintomas neuropáticos (paralisia cerebral, acidente vascular cerebral, hanseníase, neuropatia nutricional, neoplásica, infecciosa, inflamatória, urêmica ou medicamentosa, diagnosticada e constada em prontuário); (2) em uso da metformina (WEI et al, 2022); (3) deficiência de vitamina B12, constado no prontuário (WEI et al,

2022); (4) hipotireoidismo, constado no prontuário e (5) *déficits* sensoriais e motores assimétricos (ZIEGLER et al, 2022).

5.3.2 PARÂMETROS E AVALIAÇÃO DA CONDUÇÃO NERVOSA E CONCORDÂNCIA ENTRE AVALIADORES

Todas as crianças e adolescentes avaliados no ambulatório de diabetes, foram convidados a comparecer ao Hospital Universitário Pedro Ernesto ou a Clínica de Neurofisiologia e Neuromodulação. Setenta crianças e adolescentes, que faziam parte da população amostral do estudo, compareceram para o exame de condução nervosa (ECN), realizado pelo Dr. Daniel de Souza e Silva usando o instrumento *Counterpoint* (Medtronic). A temperatura da pele foi controlada e mantida entre 32° e 34° em todos os participantes a fim de não influenciar nos resultados. Foram utilizados eletrodos de superfície, posicionados na borda lateral do pé, próximo ao quinto pododáctilo e com o local do estímulo posterior ao maléolo lateral, com o cátodo localizado aproximadamente 100mm proximal do eletrodo de registro. A avaliação ocorreu bilateralmente, ou seja, pé direito e esquerdo. Considerou-se como registro de referência normal para o estudo eletrofisiológico: amplitude (μV) do potencial de ação >6 e velocidade de condução (m/s) >39 (WEISMAN et al, 2013).

O diagnóstico da PSD, através do ECN, foi comparado com o diagnóstico através das escalas e parâmetros de avaliação clínica descritos no item 5.3 para identificar a concordância entre os observadores.

5.4 TAMANHO AMOSTRAL E LOGÍSTICA

Todas as crianças acompanhadas no ambulatório no período – e em consonância com os critérios de inclusão e exclusão – foram avaliadas através dos instrumentos específicos e seus prontuários analisados. Havia, aproximadamente, 450 crianças/adolescentes em acompanhamento no ambulatório de diabetes tipo 1, do IPPMG e, após apresentarmos os critérios de inclusão e exclusão para a equipe médica, obtivemos como retorno aos dados a informação de que cerca de 40 % destas obedeciam a estes critérios (aproximadamente 180). Após o rastreamento (um ano e oito meses) não tivemos recusa de nenhuma criança e/ou adolescente ou pais para participarem da pesquisa. Acreditamos que por serem pessoas acompanhadas em hospital universitário; por receberem, desde o início do tratamento, acesso à

informação em saúde com uma equipe multi e interdisciplinar e, por isto, perceberem a importância do autogerenciamento em saúde e por receberem informações concernentes ao risco da PSD, bem como das formas de prevenção e cuidados, obtivemos uma excelente adesão. Acreditamos, também, que o tempo de permanência no ambulatório, em todos os dias da semana em que havia atendimento, permitiu que não tivéssemos perdas de seguimento. Ao final, a amostra estudada foi constituída por 199 crianças e adolescentes. Através da checagem ao sistema de informação hospitalar, MEDTRAK (TrakHealth, 1998), foram listados os pacientes com consulta no ambulatório no período do estudo (Figura 9).

As crianças/adolescentes que apresentaram PSD ou sintomas sensoriais, diagnosticada durante a avaliação, foram orientadas, assim como os seus responsáveis, em relação aos cuidados necessários com os membros inferiores.

Ao considerar que não estamos trabalhando com amostra, e sim com uma população de estudo definida, pertencente a um programa de acompanhamento, que foram feitos esforços para acompanhar e avaliar todas as crianças que obedeceram aos critérios de inclusão, o poder estatístico não ficou comprometido.

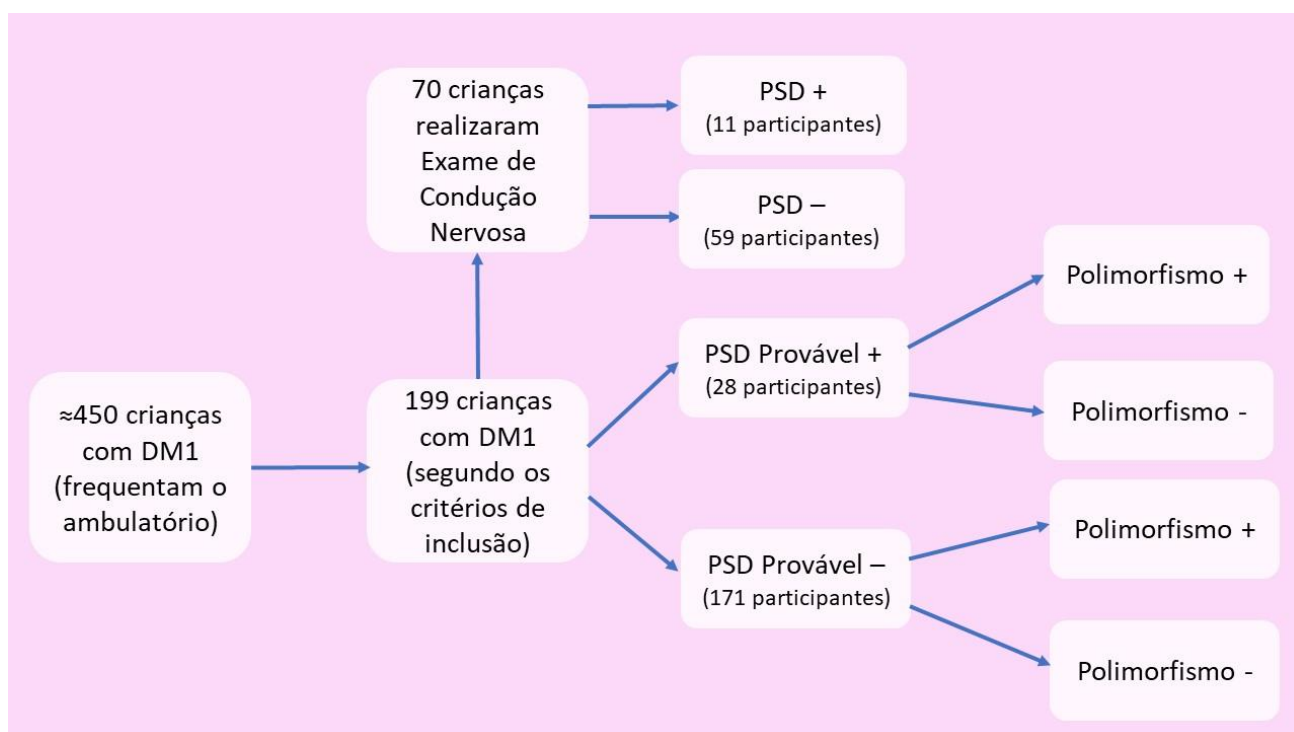


Figura 9 – Esquema do Estudo Seccional.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

No Quadro 3, são apresentadas as variáveis sociodemográficas do estudo.

Quadro 3 – Variáveis sociodemográficas do estudo.

Variáveis Sociodemográficas	Coleta	Tipo	Valores
Idade	Prontuário	Contínua	Anos\meses
Sexo	Prontuário	Dicotômica	Feminino/Masculino
Escolaridade	Prontuário	Categórica	Sem escolaridade; alfabetizado; de 2 a 5 anos estudados; de 6 a 9 anos; de 10 a 13 anos.
Renda familiar	Entrevista	Categórica	< 1 salário mínimo; 1 salário mínimo até 2 salários; > 2 salários até 3 salários; > 3 salários até 4 salários; > 4 salário até 5 salários; > 5 até 6 salários; >6 salários até 7 salários; > 7 salários até 8 salários; > 9 salários até 10 salários; >10 salários mínimos.
Bairro	Prontuário	Categórica	

As variáveis clínicas são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 – Variáveis clínicas do estudo

Variáveis Clínicas	Coleta	Tipo	Valores
Duração do diabetes	Prontuário	Contínua	Anos
História familiar de diabetes	Anamnese	Categórica	(Pai, mãe, irmão (ã), tios (as), primos (as), avós, bisavós)
Hipoglicemia inter consulta	Prontuário	Dicotômica	Sintomática, assintomática, grave
Hipoglicemia grave no último ano	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Cetoacidose no último ano	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Poliúria	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Polidipsia	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Polifagia inter consulta	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Emagrecimento inter consulta	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Nefropatia	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Retinopatia	Prontuário	Dicotômica	Presente/Ausente
Úlcera prévia	Anamnese	Categórica	Sim/ Não

Quadro 4 – Variáveis clínicas do estudo

Úlcera	Anamnese	Categórica	Sim/Não
Calorias ingeridas	Prontuário	Contínua	
Doenças associadas ao DM1	Prontuário	Categórica	
Tipo de alimentação	Prontuário	Categórica	Quantidade/Contagem
Atividade física	Anamnese	Categórica	Orientada/ Não orientada/ Sem atividade
Índice de Massa Corporal (IMC) IMC=[PESO/(ALTURA ²)]. (WHO, 2004)	Banco de Dados	Contínua Categórica	Kg/m ² Obeso (acima de 30 kg/m ²) e Não obeso (até 30 kg/m ²)
Peso (dia da avaliação)	Prontuário	Contínua	Kg/ m ²
Altura (dia da avaliação)	Prontuário	Contínua	Cm
Pressão Arterial Sistêmica	Prontuário	Contínua	mmHg
Técnica para conservação da insulina (de acordo com os critérios adotados no ambulatório e presentes no manual “Rotina para consultas”)	Prontuário	Categórico	Satisfatória/Não satisfatória (foi considerada não satisfatória se uma das perguntas feitas para os pais obtiveram resposta incorreta)
Qual tipo de insulina lenta	Anamnese	Categórica	
Dose da insulina lenta	Anamnese	Categorias	Dose unidade/dia Dose unidade/kg
Número de aplicações/dia insulina lenta	Anamnese	Categórica	Uma vez/ Duas vezes/ Três vezes/ Quatro vezes/ Não sabe
Faz uso da insulina rápida	Anamnese	Categórica	Regularmente/ Irregularmente/ Não usa/ Não sabe
Qual insulina de ação rápida	Anamnese	Categórica	
Dose da insulina de ação rápida	Anamnese	Numérica	
Número de aplicações/dia insulina rápida	Anamnese	Numérica	Uma vez/ Duas vezes/ Três vezes/ Quatro vezes/ Não sabe
Faz auto monitorização da insulina	Anamnese	Categórica	Sim/ Não
Número de medições por dia	Anamnese	Numérica	
Usa bomba de insulina	Anamnese	Categórica	Sim/ Não
Hemoglobina glicada	Prontuário	Contínua	(%) Colhidos oito hemoglobinas mais próximas
Lipidograma	Prontuário	Numérica	(mg/dl) Colesterol total/ LDL/ HDL/ Triglicerídeos
Albuminúria	Prontuário	Numérica	g/dL
Classificação de Tanner	Prontuário	Categórica	Estágio I, II, III, IV e V
Marcador genético <i>IL-4</i>	Exame laboratorial	Categórico	A1/ A2/ A3

Quadro 4 – Variáveis clínicas do estudo

Marcador genético <i>MTHFR</i>	Exame laboratorial	Categórico	CC/ CT/ TT
Sensibilidade Protetora dos pés	Exame Físico (monofilamento 5.07 - 10g)	Dicotômica	Presente/Ausente Avaliado nos quatro pontos para os pés esquerdo e direito
Exame das mãos (sinal da prece)	Prontuário	Categórica	Presente/Ausente
Neuropatia sensorial	Exame físico (NSS)	Categórica	Presente/Ausente
Escore do NSS	Exame físico	Categórico	Leve/ Moderado/ Grave
Sintomatologia	Exame físico	Categórico	Formigamento/ Queimação/ Agulhada/ Choque/ Outras Dormência/ Pancada/ Punhalada/
Força do quadríceps	Exame físico	Categórica	Avaliada no direito e esquerdo. Normal/ Debilidade suave ou moderada/ Debilidade grave ou ausente
Força do tríceps sural	Exame físico	Categórica	Avaliado no direito e esquerdo. Normal/ Debilidade suave ou moderada/ Debilidade grave ou ausente
Reflexo patelar	Exame físico	Categórico	Presente Ausente/ Diminuído
Sensibilidade dolorosa do segundo dedo	Exame físico	Categórico	Normal/ Diminuído/ Ausente
Sensibilidade dolorosa do hálux	Exame físico	Categórico	Normal/ Diminuído/ Ausente
Sensibilidade tátil do hálux	Exame físico	Categórico	Normal/ Diminuído/ Ausente
Sensibilidade vibratória do hálux	Exame físico	Categórico	Normal/ Diminuído/ Ausente
Propriocepção articular hálux	Exame físico	Categórica	Normal/ Diminuído/ Ausente
Neuropatia motora	NDE	Categórica	Presente/Ausente
Sensibilidade Térmica	Avaliação	Categórica	Normal ou Alterada (incluindo a ausência da percepção)
Reflexo Aquileu	Avaliação	Categórica	Presente / Ausente/ Diminuído

5.6 CONTROLE DE QUALIDADE

Semanalmente os dados eram compilados para o banco de dados e os questionários revisados e avaliados quanto ao preenchimento.

As amostras do material genético eram encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular Humana da UFRJ uma vez por semana (6^o feira); e o DNA extraído em seguida.

A pesquisadora Raquel Garcia Rocco da Silva foi treinada, durante seis meses, no Ambulatório de Neurologia Pediátrica do IPPMG para o aprimoramento da avaliação sensorial e motora.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência de PSD e o seu IC 95% (p valor=0,05) foram estimados, assim como *odds ratio* (OR) para as variáveis investigadas. A análise de variância foi utilizada para comparar as médias. Os dados foram analisados através do pacote estatístico Epi-Info, versão 7.2 e pelo JASP v 0.14. A significância estatística foi avaliada usando o teste quiquadrado (χ^2), para proporções; e t de Student ou Kruskal Wallis para médias. Um modelo de regressão logística foi ajustado para identificar fatores independentes associados à PSD. O modelo inicial foi composto pelas variáveis com p -valor $\leq 0,20$ e utilizada uma estratégia de retirada de variáveis do modelo cheio, comparando-se modelos com subconjuntos de variáveis, através do teste da razão de verossimilhança (likelihood-ratio teste). Ajustou-se, também, um modelo de regressão de poisson, com variância robusta para estimar a razão de risco (prevalência) das variáveis de interesse com a PSD, diretamente, controlando-se por variáveis de confundimento (consideradas de acordo com a literatura e ou se a sua inclusão no modelo alterasse a razão de chances em 10% ou mais). A concordância entre avaliadores, com relação ao diagnóstico para PSD, foi determinada através do coeficiente de concordância Kappa de Cohen; e interpretados como: nenhuma (0-0,20), mínimo (0,21-39), fraco (0,40-0,59), moderado (0,60-0,79), forte (0,80-0,90) e quase perfeito (acima de 0,90).

Para verificar a direção e o grau de associação entre duas variáveis numéricas, utilizou-se o coeficiente linear de Pearson; entre duas variáveis ordinais ou nominais, utilizou-se o coeficiente de Spearman.

5.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS ÉTICOS

Os autores deste projeto têm conhecimento e cumpriram os requisitos da resolução 466/12 do CNS e suas complementares. Os indivíduos, cuja participação na pesquisa foi voluntária e sem compensação financeira, tiveram garantidas as medidas necessárias para minimizar os riscos previsíveis (considerando as dimensões físicas, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, conforme item III.1e III.2, da Res. CNS 466/12).

Foi assegurada uma adequada e acurada descrição e informação sobre os riscos, desconfortos ou benefícios que podem ser antecipados. Tais dados estavam especificados e explicados por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento, assinados pelos responsáveis e participantes quando aplicável (Apêndices 2 e 3).

As informações obtidas foram analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

Os participantes tiveram salvaguardado o direito de se retirarem do estudo, em qualquer etapa sem prejuízos, bem como o acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os dados coletados no prontuário foram somente os referentes às variáveis em estudo, previstas no projeto de pesquisa, e somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam.

Durante o estudo, os participantes foram mantidos e atualizados sobre os resultados parciais e tiveram acesso aos resultados.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPPMG/UFRJ sob o número 1.910.920 (CAAE 60302816.7.0000.5264) em 07/02/17.

6 RESULTADOS

6.1 Análise Descritiva das Variáveis Clínicas e Sociodemográficas Estudadas

A população foi constituída por 199 crianças e adolescentes (97 meninas e 102 meninos). Na Tabela 1 são apresentadas as médias das variáveis contínuas da população de estudo.

Tabela 1 – Variáveis clínicas da população de estudo

Variáveis	Média (desvio padrão)
Idade (anos)	13,60 (2,95)
Tempo de diagnóstico (anos)	9,42 (3,05)
Hemoglobina glicada* (%)	8,70 (5,41)
Altura (cm)	1,56 (0,16)
Peso (Kg/m ²)	51,93 (15,99)
Índice de massa corporal (kg/m ²)	20,95 (4,14)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	105,40 (11,88)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	66,88 (9,20)
Albuminúria (g/dL)	10,17 (13,93)
HDL colesterol (mg/dL)	60,52 (16,44)
LDL colesterol (mg/dL)	92,68 (29,49)
Triglicérides (mg/dL)	78,95 (43,17)
Colesterol total (mg/dL)	168,84 (37,39)
Insulina lenta** (unidade/dia)	25,09 (12,16)
Insulina rápida *** (unidade/dia)	29,14 (13,57)

Nota: *foi analisada uma média de oito resultados para cada participante; **Insulina lenta prescrita por dia; ***Insulina rápida por dia para uma glicemia de 80 a 100 mg/dl,

Os estratos socioeconômicos mais frequentes são os que ganham de 1 a 2 salários mínimos (34,02%), 2 a 3 salários (25,26%) e menos de 1 salário (13,92%). A maior parte da população tem entre 6 e 9 anos de escolaridade (50,27%), seguidos de 2 a 5 anos (23,24%) e 10 a 13 anos de escolaridade (21,08%).

O tipo de alimentação por contagem é utilizado por 75,13% da população; e a média do consumo de caloria por dia é de 2.275 (DP ± 447,00). Todos relataram conservar adequadamente a insulina.

Cinquenta e quatro por cento da população apresentou alguma sensação subjetiva e a cãimbra e o formigamento foram os sintomas mais frequentes (Figura 10).

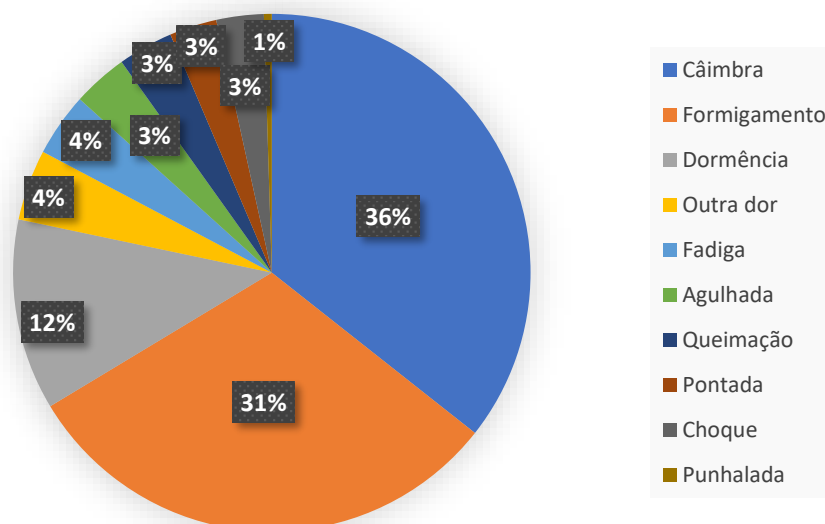


Figura 10 – Frequência dos sintomas sensoriais relatados

Na Tabela 2, observamos a frequência dos parâmetros utilizados para classificar a PSD. Dentre os itens avaliados no DNE, a alteração do reflexo patelar foi o mais prevalente (10,55%). Os sintomas sensoriais leves (19,70%) e moderados (15,58%), classificados pelo NSS, foram os mais prevalentes nesta população.

Tabela 2 – Frequência dos parâmetros utilizados para classificar provável PSD e a neuropatia sensorial

Variáveis	Alterações observadas n (%)
DNE>3	
Alteração da força do quadríceps femural	13 (6,53)
Alteração da força do tibial anterior	4 (2,01)
Alteração do reflexo patelar	21 (10,55)
Alteração da sensibilidade dolorosa do 2º dedo	2 (1,01)
Alteração da sensibilidade dolorosa do hálux	3 (1,51)
Alteração da sensibilidade ao toque do hálux	1 (0,50)
Alteração da sensibilidade vibratória do hálux	4 (2,01)
Alteração da percepção articular do hálux	1 (0,50)
NSS	
Comprometimento Leve	39 (19,70)
Comprometimento Moderada	31 (15,58)
Comprometimento Grave	16 (8,04)
Alteração da sensibilidade térmica	23 (11,56)
Alteração da sensibilidade protetora dos pés	5 (2,51)
Alteração do reflexo aquileu	13 (6,53)

Nota: DNE (*Diabetic Neuropathy Examination*; >3 é considerada significativa para a presença da PSD); NSS (*Neuropathy Symptom Score*)

6.2 Provável PSD

A prevalência da provável polineuropatia simétrica distal (PSD) foi de 14%, 14 meninas e 14 meninos, mas ela não esteve relacionada ao sexo (p valor=0,36). Na Tabela 3 são apresentadas as associações da PSD com as variáveis contínuas. As médias apresentadas foram ajustadas por sexo e quando olhamos esta relação observamos que as associações da PSD com idade, tempo de diagnóstico, peso altura, IMC, colesterol total e VLDL foram relacionadas ao feminino. O sexo feminino não se mostrou como variável confundidora nas associações com triglicerídios e hemoglobina glicada. No entanto, a PSD e o sexo se apresentaram associados (OR=1,074; IC95%=0,72-1,59; p valor=0,44).

O risco de provável PSD, nesta população, foi 2,14 vezes maior em crianças e adolescentes que apresentam poliúria do que nas crianças que não relatam poliúria (0,03). Não foram observadas associações estatísticas significativas entre provável

PSD e cetoacidose (0,16), histórico de hipoglicemia (0,18), hipoglicemia grave no último ano (0,08), polidipsia (0,44), polifagia interconsulta (0,21), emagrecimento interconsulta (0,47), nefropatia (0,37), retinopatia (0,43) e úlcera prévia (0,42). Não haviam crianças e ou adolescentes com úlcera.

Também não encontramos associações da PSD com nenhuma categoria de atividade física investigada, orientada, não orientada, sem atividade ($p=0,47$; 0,48 e 0,44, respectivamente). Com relação ao histórico materno de diabetes, não observamos associação com nenhuma relação familiar investigada isoladamente. Também criamos uma variável agrupada, envolvendo todo histórico e também não observamos associações estatísticas tanto para a história familiar paterna ($OR=0,71$; $IC95\%=0,42-2,54$; $p \text{ valor}=0,07$) quanto para a história familiar materna ($OR=0,00$; $IC95\%=0,67-1,46$; $p \text{ valor}=0,48$). Onze crianças e ou adolescentes apresentavam sinal da prece, mas não foi observado associação com PSD ($p \text{ valor}=0,38$).

Tabela 3 - Variáveis clínicas e laboratoriais e suas associações entre os participantes com provável PSD e sem provável PSD

Variáveis Clínicas e Laboratoriais	Média (dp) PSD/ SEM PSD	P Valor	Média meninas*(dp) PSD/ SEM PSD	P * valor	Média meninos* (dp) PSD/ SEM PSD	P * valor
Idade (anos)	14,79 (2,61) 13,50 (3,00)	0,03	14,78 (2,35) 13,04 (3,07)	0,04	14,76 (3,05) 13,94 (2,87)	0,33
Tempo de diabetes (anos)	10,89 (2,82) 9,26 (3,06)	0,00	10,78 (2,51) 9,14 (2,93)	0,04	10,92 (3,30) 9,40 (3,18)	0,12
Hemoglobina glicada** (%)	9,26 (2,29) 8,11 (1,41)	0,00	8,99 (1,51) 8,13 (1,31)	0,04	9,59 (3,02) 8,09 (1,50)	0,00
Peso (kg/m ²)	60,51 (16,52) 50,80 (15,59)	0,00	62,49 (12,92) 48,61 (15,67)	0,02	57,33 (20,06) 53,07 (15,39)	0,37
Altura (cm)	1,62 (0,15) 1,54 (0,16)	0,00	1,61 (0,10) 1,50 (0,15)	0,00	1,60 (0,18) 1,59 (0,15)	0,94
Índice de massa corporal (kg/m ²)	22,78 (3,30) 20,76 (4,19)	0,01	23,73 (2,72) 20,90 (4,17)	0,01	21,72 (3,73) 17,77 (4,21)	0,39
Pressão arterial sistólica (mmHg)	107,57 (11,24) 105,03 (11,96)	0,29	105,50 (9,05) 102,58 (10,43)	0,39	110,38 (13,30) 107,17 (12,81)	0,40
Pressão arterial diastólica (mmHg)	68,39 (8,06) 66,63 (9,38)	0,35	69,28 (7,30) 65,96 (9,31)	0,20	68,07 (9,02) 67,15 (9,42)	0,74
Albuminúria (g/dL)	8,14 (5,50) 9,83 (12,77)	0,53	8,25 (6,29) 11,46 (15,66)	0,48	8,50 (4,77) 8,15 (8,85)	0,90
HDL colesterol (mg/dL)	58,86 (15,85) 60,80 (16,56)	0,56	48,33 (14,36) 50,28 (12,10)	0,82	61,12 (15,31) 61,09 (16,67)	0,99
LDL colesterol (mg/dL)	106,92 (42,10) 90,26 (26,24)	0,00	124,78 (45,73) 95,49 (29,25)	0,00	90,38 (30,85) 85,22 (22,08)	0,45
Triglicerídeos (mg/dL)	110,03 (60,69) 73,77 (37,30)	0,00	129,78 (69,36) 78,74 (41,22)	0,00	94,61 (43,37) 68,73 (32,81)	0,01
Colesterol total (mg/dL)	185,39 (52,46) 164,92 (33,58)	0,01	208,14 (59,41) 170,61 (37,31)	0,00	164,38 (33,37) 159,39 (28,80)	0,56
VLDL (mg/dL)	25,80 (13,95) 15,40 (7,09)	0,00	31,77 (13,79) 15,68 (7,16)	0,00	16,83 (8,95) 15,05 (7,09)	0,58

Nota: (*) média e p valor ajustados por sexo; (**) foi analisada uma média de oito resultados para cada paciente; PSD (polineuropatia simétrica distal; dp (desvio padrão)

6.3 Neuropatia Sensorial

A neuropatia sensorial (NS) foi prevalente em 42,71% da amostra e associada ao sexo feminino (OR= 1,72; p valor=0,03). Também foram observadas associações com cetoacidose (OR= 7,79; p valor= 0,00), emagrecimento (OR= 2,35; p valor= 0,04), hipoglicemia grave (OR= 3,45; p valor= 0,00), polifagia (OR= 4,25; p valor= 0,00), poliúria (OR= 2,82; p valor= 0,00), nefropatia (OR= 1,32.; p valor= 0,03)

As rendas familiares mais baixas (até dois salários mínimos) estiveram associadas como fator de risco para a neuropatia sensorial (OR= 1,80; p valor= 0,02), em contrapartida, rendas familiares acima de dois salários mínimos apresentaram-se como fator protetor para a neuropatia sensorial (OR= 0,62; p valor= 0,05).

Em relação à história familiar, mãe (OR=4,25; p valor=0,03), bisavó materna (OR= 2,70; p valor=0,01) e tios paternos (OR=3,00; p valor=0,01) com diabetes tipo 1 ou 2 aumentam o risco de neuropatia sensorial.

Na Tabela 4 observamos as associações entre as variáveis clínicas e laboratoriais e suas associações com a neuropatia sensorial.

Tabela 4 - Variáveis clínicas e laboratoriais e suas associações com neuropatia sensorial

Variáveis Clínicas e Laboratoriais	Média (dp) NS / SEM NS	P valor
Idade (anos)	13,65 (2,83) / 13,71 (3,10)	0,74
Tempo de diabetes (anos)	9,80 (2,80) / 9,27 (3,13)	0,24
Hemoglobina glicada* (%)	8,54 (1,72) / 7,84 (1,08)	0,00
Peso (Kg/m ²)	52,97 (16,59) / 51,58 (15,67)	0,54
Altura (cm)	1,55 (0,16) / 1,56 (0,15)	0,96
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	21,19 (4,07) / 20,94 (4,19)	0,67
Pressão arterial sistólica (mmHg)	105,69 (12,21) / 105,17 (11,65)	0,76
Pressão arterial diastólica (mmHg)	67,40 (9,47) / 66,49 (9,01)	0,49
Albuminúria (g/dL)	8,11 (7,80) / 10,64 (14,18)	0,19
HDL colesterol (mg/dL)	60,84 (16,63) / 60,28 (16,36)	0,81
LDL colesterol (mg/dL)	100,58 (34,00) / 86,68 (24,08)	0,00
Triglicerídeos (mg/dL)	93,44 (53,49) / 68,08 (29,25)	0,00
Colesterol total (mg/dL)	178,42 (41,49) / 159,92 (31,95)	0,00
VLDL (mg/dL)	21,12 (10,80) / 14,06 (6,51)	0,00

Nota: *foram analisadas as médias de oito medidas para cada paciente; dp (desvio padrão; NS (neuropatia sensorial).

O risco de neuropatia sensorial é 1,72 vezes menor em meninas do que em meninos (OR=1,72; IC95%= 1,31-3,03; p valor=0,03). O sexo feminino não se apresentou, isoladamente, associado à neuropatia sensorial em nenhuma variável clínica e laboratorial.

Foram fortemente associados ao risco de neuropatia sensorial, uma história materna de diabetes tipo 1 ou tipo 2 do bisavô (OR=2,31; IC95%=1,16-4,58; p valor=0,07) e tio avô (OR=2,70; IC95%=1,10-6,91; p valor=0,01). Crianças com mãe com diabetes tipo 1 apresentaram um risco quatro vezes maior de ter neuropatia sensorial do que crianças sem histórico materno (OR= 4,01; IC95%= 1,34-19,37; p valor= 0,03).

Três avaliações clínicas utilizadas para classificar a PSD foram altamente associadas à neuropatia sensorial (classificadas através do NSS): sensibilidade térmica (OR=2,82; IC95%=1,17-5,65; p valor=0,01), reflexo patelar (OR=3,35; IC95%=1,36-8,28; p valor=0,00) e reflexo aquileu (OR=4,47; IC95%=1,27-15,74; p valor=0,00).

6.4 Exame de Condução Nervosa

Setenta participantes foram submetidos ao ECN do nervo sural e suas médias são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros do exame de condução nervosa ajustada por gênero

Parâmetro Avaliado	Média (dp)	Média* (dp) Meninas / Meninos	P valor
Sural - Amplitude Direita (mV)	15,11 (6,80)	17,18 (6,89) / 12,91 (6,07)	0,01
Sural – Amplitude Esquerda (mV)	14,88 (6,85)	16,87 (7,50) / 12,76 (5,45)	0,02
Sural – Velocidade Direita (m/s)	51,04 (5,37)	50,89 (5,15) / 51,21 (5,68)	0,81
Sural – Velocidade Esquerda (m/s)	51,29 (5,25)	50,77 (5,97) / 51,85 (4,40)	0,43

Nota: dp (desvio padrão); Média* (ajustada por gênero)

A prevalência da PSD – de acordo com alterações da amplitude e ou velocidade de condução nervosa do nervo sural – foi de 15,71%.

A amplitude da VCN foi associada à altura, participantes mais altos tiveram amplitudes mais baixas (p=0,00) e ao tempo de diagnóstico (p=0,00). Também observamos associação ao gênero, nesse sentido, meninas apresentaram amplitudes maiores do que os meninos, tanto no sural direito quanto no esquerdo (p=0,01; 0,02, respectivamente) (Tabela 5). A alteração dos parâmetros de amplitude e velocidade da condução nervosa não apresentaram associação com idade e com o tempo de diagnóstico (p valor=0,70; 0,84, respectivamente). Na Tabela 6 observamos as associações entre amplitude do ECN e provável PSD e neuropatia sensorial.

Tabela 6 – Média dos parâmetros avaliados no ECN do nervo sural e suas associações com PSD e neuropatia sensorial (NS)

Parâmetro Avaliado	Com PSD Média (dp)	Sem PSD Média (dp)	Com NS Média (dp)	Sem NS Média (dp)	P valor PSD - NS
Amplitude Direita (mV)	11,00 (10,19)	15,66 (6,15)	12,35 (7,63)	16,50 (5,97)	0,04 – 0,02
Amplitude Esquerda (mV)	10,82 (6,85)	15,42 (6,46)	13,97 (8,31)	15,34 (6,06)	0,05 – 0,37
Velocidade Direita (m/s)	48,24 (7,92)	51,41 (4,92)	51,62 (6,50)	50,75 (4,76)	0,14 – 0,52
Velocidade Esquerda (m/s)	49,21 (6,41)	51,56 (5,08)	52,51 (5,40)	50,68 (5,13)	0,27 – 0,19

Nota: PSD (polineuropatia simétrica distal); ECN (exame de condução nervosa); dp (desvio padrão); NS (neuropatia sensorial)

Um médico neurologista e expert conduziu o ECN e classificou os participantes com e sem PSD. O diagnóstico foi comparado com a outra avaliadora, que utilizou avaliação física e dois escores de avaliação. A concordância do diagnóstico provável de PSD e do ECN foi de 89,9% e o teste de Kappa mostrou uma confiabilidade substancial entre os observadores ($K=0,697$; p valor= 0,00).

Na Figura 11 observamos a frequência do diagnóstico da PSD e da NS em cada instrumento e também a partir dos critérios diagnósticos utilizados no estudo para prever a provável PSD. Dos dois participantes com diagnóstico de PSD pelos critérios do DNE, um deles apresentava neuropatia sensorial. Dos 11 participantes diagnosticados pelo ECN, nove apresentavam neuropatia sensorial (um foi classificado pelos critérios do DNE e o outro não foi diagnosticado por nenhum dos testes clínicos apresentado acima).

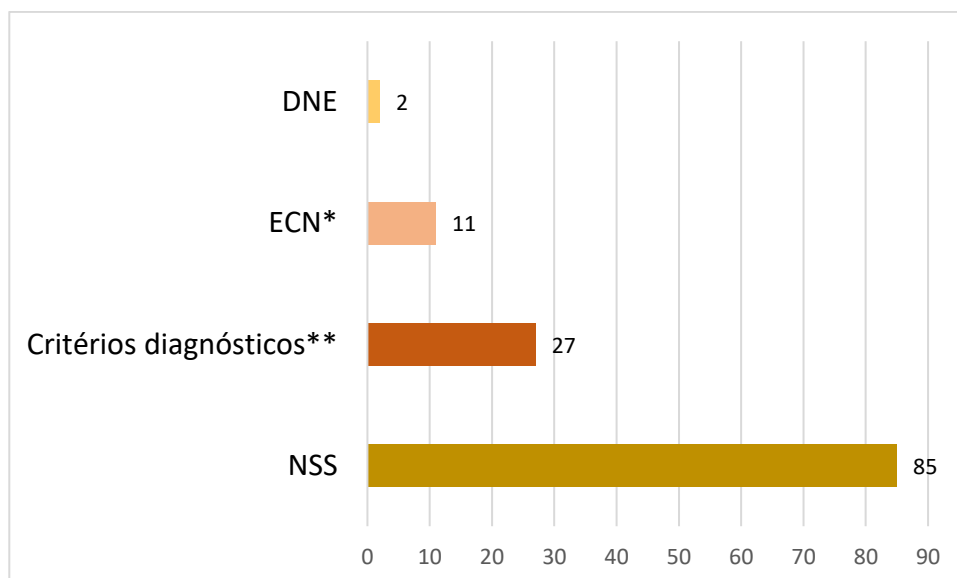


Figura 11 – Quantidade de participantes diagnosticados, segundo os instrumentos e critérios utilizados

Nota: (*) Avaliados apenas em 70 participantes; (**) combinação de sinais e sintomas de neuropatia incluindo dois ou mais achados. DNE (*Diabetic Neuropathy Examination*); ECN (Exame de Condução Nervosa); NSS (*Neuropathy Symptom Score*)

6.5 Interleucina-4 (*IL-4*)

O genótipo A1A1 foi mais frequente na amostra estudada (108 participantes ou 54,78%); seguidos do A3 (81 participantes ou 40,70%) e de A2 (9 participantes ou 4,52%). A frequência do alelo A1 e A2 foi 68% e 32%.

Tabela 7 - Genótipos da *IL4* entre pessoas com e sem provável PSD

Polimorfismos	% Participantes Com PSD	% Participantes Sem PSD	P valor
A1A1	13,08	86,92	0,41
A1A2	14,81	85,19	0,33
A2A2	11,11	88,89	0,45
Alelo A1	13,83	86,17	0,36
Alelo A2	14,44	85,56	0,37

Nota: PSD (polineuropatia simétrica distal); *IL4* (interleucina 4); PSD (polineuropatia simétrica distal); A1A1 (homozigoto do tipo selvagem); A1A2 (heterozigoto); A2A2 (variante homozigota).

Na Tabela 7 observamos a frequência dos genótipos e alelos entre os participantes com e sem PSD.

Alteração de força do quadríceps femoral apresentou-se associado ao polimorfismo A1A2 (OR= 1,79; p valor=0,01) e no polimorfismo A1A1 o OR da variável

foi abaixo de 1 (OR=0,24) o que sugere fator de proteção, mas, apesar do nível de confiança estar entre 95%, o p valor apresentou-se um pouco acima dos 5% (p valor=0,08) (Tabela 8).

Os alelos A1 e A2 também não se apresentaram associados a neuropatia sensorial (p valor=0,34 e 0,43).

Tabela 8 – Associação entre *IL4* e parâmetros utilizados para classificar provável PSD e a neuropatia sensorial

Parâmetros	Interleucina-4		
	A1A1 OR (IC95%; p valor)	A1A2 OR (IC95%; p valor)	A2A2 OR (IC95%; p valor)
DNE			
Alteração de força do quadríceps femoral	0,24 (0,06-0,88; 0,08)	1,79 (1,20-2,68; 0,01)	1,78 (0,24-13,23; 0,28)
Alteração de força do tibial anterior	0,92 (0,34-2,49; 0,44)	0,60 (0,11-3,35; 0,29)	6,09 (0,97-37,91; 0,09)
Alteração do reflexo patelar	1,07 (0,72-1,59; 0,37)	1,05 (0,62-1,79; 0,41)	*
Alteração da sensibilidade dolorosa do 2º dedo	1,87 (1,65-2,14; 0,14)	*	*
Alteração da sensibilidade dolorosa do hálux	1,88 (1,65-2,15; 0,07)	*	*
Alteração da sensibilidade ao toque do hálux	1,87 (1,64-2,13; 0,26)	*	*
Alteração da sensibilidade vibratória do hálux	1,40 (0,78-2,51; 0,22)	0,61 (0,11-3,35; 0,29)	*
Alteração da percepção articular do hálux	1,86 (1,64-2,13; 0,26)	*	*
NSS			
Alteração Leve	1,12 (0,83-1,51; 0,23)	0,85 (0,54-1,35; 0,25)	1,72 (0,25-5,42; 0,40)
Alteração Moderada	0,95 (0,65-1,37; 0,39)	1,04 (0,65-1,62; 0,43)	0,67 (0,08-5,22; 0,39)
Alteração Grave	0,80 (0,45-1,41; 0,20)	1,42 (0,89-2,23; 0,10)	*
Sensibilidade térmica	1,24 (0,89-1,73; 0,12)	0,71 (0,45-1,10; 0,09)	4,97 (1,80-8,13; 0,20)
Sensibilidade protetora dos pés	1,11 (0,54-2,23; 0,40)	0,98 (0,33-2,91; 0,49)	*
Alteração do reflexo aquileu	1,15 (0,73-1,81; 0,29)	0,94 (0,46-1,91; 0,44)	*

Nota: (*) não apresentaram frequências para todos os dados na tabela de contingência; DNE (*Diabetic Neuropathy Examination*); NSS (*Neuropathy Symptom Score*); A1A1 (homozigoto de tipo selvagem); A1A2 (heterozigoto); A2A2 (variante homozigota); OR (odds ratio); IC (intervalo de confiança).

As O genótipo A1A1 apresentou a maior quantidade de associações, comparado a A1A2, e o A2A2 não apresentou associação com variáveis clínicas e laboratoriais avaliadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Associação dos polimorfismos da *IL-4* com provável PSD

Variáveis Clínicas e Laboratoriais (Com PSD/ Sem PSD)	Interleucina-4 (média/desvio padrão)			P valor		
	Polimorfismo A1A1	Polimorfismo A1A2	Polimorfismo A2A2	A1A1	A1A2	A2A2
Idade (anos)	14,92 (2,20)	14,67 (3,31)	14,00 (0,00)	0,12	0,12	0,83
	13,58 (3,15)	13,26 (2,76)	14,12 (3,27)			
Tempo de diabetes (anos)	11,07 (2,40)	10,92 (3,34)	7,00 (0,00)	0,04	0,04	0,24
	9,50 (3,11)	8,97 (3,05)	9,62 (2,32)			
Hemoglobina glicada (%)	9,06 (2,14)	9,35 (2,40)	8,80 (0,00)	0,01	0,00	0,43
	7,94 (1,31)	8,01 (1,10)	8,13 (1,15)			
Peso (Kg/m ²)	66,52 (14,85)	52,53 (16,64)	58,60 (0,00)	0,00	0,53	1,00
	51,69 (15,48)	49,48 (15,57)	53,47 (19,76)			
Altura (cm)	1,65 (0,12)	1,55 (0,16)	1,68 (0,00)	0,02	0,93	0,55
	1,55 (0,15)	1,54 (0,16)	1,57 (0,18)			
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	24,00 (2,62)	21,51 (3,77)	20,60 (0,00)	0,00	0,56	1,00
	20,83 (3,85)	20,69 (4,60)	20,84 (5,00)			
Pressão arterial sistólica (mmHg)	106,21 (11,92)	108,33 (10,30)	125,00 (0,00)	0,77	0,36	0,11
	105,25 (11,67)	104,77 (12,73)	102,25 (7,20)			
Pressão arterial diastólica (mmHg)	68,57 (8,64)	69,17 (7,93)	65,00 (0,00)	0,46	0,34	0,35
	66,62 (9,21)	66,28 (9,94)	67,25 (5,12)			
Albuminúria (g/dL)	9,13 (6,48)	7,09 (4,46)	12,80 (0,00)	0,57	0,93	0,38
	11,97 (16,23)	7,26 (5,87)	7,22 (6,43)			
HDL colesterol (mg/dL)	56,07 (15,28)	64,58 (15,59)	52,00 (0,00)	0,23	0,44	0,43
	61,37 (15,33)	60,18 (18,80)	59,37 (12,69)			
LDL colesterol (mg/dL)	128,07 (43,64)	87,25 (30,67)	82,00 (0,00)	0,00	0,67	1,00
	90,37 (26,52)	90,79 (26,08)	83,25 (28,89)			
Triglicerídeos (mg/dL)	142,43 (66,99)	83,25 (28,44)	54,00 (0,00)	0,00	0,23	0,70
	76,06 (40,07)	71,42 (32,10)	49,25 (10,69)			
Colesterol total (mg/dL)	211,64 (57,18)	161,92 (32,81)	145,00 (0,00)	0,00	0,87	0,44
	166,72 (35,27)	163,53 (32,13)	154,25 (29,10)			
VLDL (mg/dL)	37,28 (10,98)	15,75 (6,23)	*	0,00	0,68	**
	15,82 (7,21)	14,74 (6,19)	10,00 (1,73)			

Nota: PSD (polineuropatia simétrica distal); (*) Não há participante com PSD (**) Sem possibilidade de empregar teste estatístico por não haver participante com PSD; A1A1 (homozigoto de tipo selvagem); A1A2 (heterozigoto); A2A2 (variante homozigota).

As associações dos polimorfismos da *IL4* com a neuropatia sensorial são apresentadas na Tabela 12. A hemoglobina glicada apresentou-se associada aos três polimorfismos estudados. LDL colesterol e colesterol total apresentaram-se associados tanto ao polimorfismo A1A1 quanto ao A1A2 (Tabela 10).

Tabela 10 – Associação dos polimorfismos da *IL-4* com neuropatia sensorial

Variáveis Clínicas e Laboratoriais (Com NS/ Sem NS)	Interleucina-4 (Média/DP)			P valor		
	Polimorfismo A1A1	Polimorfismo A1A2	Polimorfismo A2A2	A1A1	A1A2	A2A2
Idade (anos)	13,68 (2,63) 13,81 (3,37)	13,44 (2,99) 13,49 (2,80)	14,00 (4,00) 14,17 (2,92)	0,84	0,94	0,94
Tempo de diabetes (anos)	10,00 (2,83) 9,49 (3,23)	9,53 (3,25) 9,04 (3,09)	9,00 (2,65) 9,50 (2,43)	0,40	0,49	0,78
Hemoglobina glicada (%)	8,65 (1,92) 7,90 (1,00)	8,44 (1,54) 7,73 (1,23)	8,60 (0,98) 7,71 (0,23)	0,01	0,02	0,06
Peso (Kg/m ²)	54,88 (16,67) 52,73 (15,80)	50,35 (16,26) 49,59 (15,35)	53,20 (23,96) 54,47 (17,92)	0,50	0,83	0,93
Altura (cm)	1,57 (0,15) 1,56 (0,16)	1,54 (0,18) 1,55 (0,15)	1,57 (0,23) 1,59 (0,15)	0,86	0,81	0,86
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	21,74 (4,08) 20,89 (3,67)	20,56 (4,10) 21,00 (4,79)	20,53 (4,50) 20,95 (5,19)	0,26	0,66	0,90
Pressão arterial sistólica (mmHg)	104,82 (11,70) 105,79 (11,69)	106,41 (12,64) 104,40 (12,28)	105,00 (18,03) 104,67 (5,89)	0,67	0,47	0,96
Pressão arterial diastólica (mmHg)	68,18 (9,48) 65,95 (8,83)	66,30 (9,70) 95,16 (9,75)	65,00 (5,00) 68,00 (4,90)	0,22	0,73	0,42
Albuminúria (g/dL)	9,13 (6,48) 11,97 (16,23)	6,71 (5,75) 7,63 (5,61)	9,67 (8,07) 6,63 (4,87)	0,57	0,51	0,61
HDL colesterol (mg/dL)	59,37 (13,82) 61,55 (16,40)	62,80 (19,67) 59,23 (17,23)	64,33 (16,44) 55,67 (8,85)	0,48	0,38	0,34
LDL colesterol (mg/dL)	103,43 (38,29) 89,61 (24,95)	99,39 (29,25) 82,79 (21,92)	75,00 (15,72) 87,17 (31,79)	0,02	0,00	0,56
Triglicerídeos (mg/dL)	106,27 (61,85) 69,51 (30,89)	78,78 (34,75) 68,63 (28,56)	48,67 (10,12) 50,33 (11,04)	0,02	0,15	0,83
Colesterol total (mg/dL)	183,66 (48,18) 164,82 (34,17)	174,53 (33,25) 154,09 (28,15)	149,00 (5,29) 153,33 (24,26)	0,02	0,00	0,77
VLDL (mg/dL)	24,80 (12,26) 14,91 (7,50)	16,60 (6,69) 13,48 (5,35)	* 10,00 (1,73)	0,00	0,09	**

Nota: NS (neuropatia sensorial); (*) Não há participante com NS; (**) Sem possibilidade de empregar teste estatístico por não haver participante com NS; A1A1 (homozigoto de tipo selvagem); A1A2 (heterozigoto); A2A2 (variante homozigota)

6.6 Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*)

Indivíduos do tipo selvagem (CC) foram os mais prevalentes na população (50,75%), seguidos dos heterozigotos (CT 40,70%) e das variantes homozigotas (TT 7,04%) e nenhum dos polimorfismos foram associados a PSD (Tabela 11). O alelo C foi frequente em 72% dos participantes e o T em 28% e suas associações estão apresentadas na Tabela 11.

A alteração da sensibilidade térmica apresentou resultados antagônicos, foi associado ao polimorfismo CC como fator de proteção (OR=0,65; p valor= 0,05) e como fator de risco com o polimorfismo CT (OR=1,73; p valor=0,00) (Tabela 12).

Tabela 11 – Genótipos do *MTHFR* entre participantes com e sem provável PSD

Polimorfismos	% Participantes Com PSD	% Participantes Sem PSD	P valor
CC	16,83	83,17	0,10
CT	12,35	87,65	0,31
TT	0	100	0,11
Alelo C	14,84	85,16	0,08
Alelo T	10,53	89,47	0,12

Nota: PSD (polineuropatia simétrica distal); CC (indivíduos homocigotos do tipo selvagem); CT (indivíduos heterocigotos); TT (indivíduos homocigotos)

Nenhum dos genótipos do gene *MTHFR* apresentou associação com a PSD e com a neuropatia sensorial, mesmo após ajustado por sexo.

Tabela 12 – Associação entre polimorfismos da *MTHFR* e parâmetros utilizados para classificar a provável PSD e a neuropatia

Parâmetros	<i>MTHFR</i>		
	CC OR (IC95%; p valor)	CT OR (IC95%; p valor)	TT OR (IC95%; p valor)
DNE			
Alteração de força do quadríceps femural	1,06 (0,63-1,79; 0,41)	0,74 (0,32-1,70; 0,23)	2,38 (0,59-9,54; 0,14)
Alteração de força do tibial anterior	0,98 (0,36-2,64; 0,48)	1,23 (0,45-3,33; 0,36)	0,00 (0,00-15,43; 0,37)
Alteração do reflexo patelar	1,36 (0,97-1,91; 0,06)	0,67 (0,33-1,36; 0,12)	0,00 (0,00-11,39; 0,34)
Alteração da sensibilidade dolorosa do 2º dedo	0,98 (0,24-3,96; 0,49)	1,23 (0,30-4,97; 0,40)	0,00 (0,00-47,05; 0,43)
Alteração da sensibilidade dolorosa do hálux	0,65 (0,13-3,25; 0,30)	1,65 (0,72-3,74; 0,21)	0,00 (0,00-23,56; 0,40)
Alteração da sensibilidade ao toque do hálux	1,98 (1,72-2,27; 0,25)	0,00 (0,00-27,67; 0,29)	0,00 (0,00-251,07; 0,46)
Alteração da sensibilidade vibratória do hálux	1,49 (0,83-2,67; 0,19)	0,60 (0,11-3,35; 0,29)	0,00 (0,00-15,43; 0,37)
Alteração da percepção articular do hálux	1,98 (1,72-2,27; 0,25)	0,00 (0,00-27,67; 0,29)	0,00 (0,00-251,07; 0,46)
NSS			
Alteração Leve	1,10 (0,50-2,06; 0,47)	1,01 (0,71-1,42; 0,47)	2,27 (0,80-6,42; 0,07)
Alteração Moderada	1,17 (0,83-1,64; 0,19)	0,85 (0,51-1,41; 0,26)	0,41 (0,05-3,07; 0,20)
Alteração Grave	1,25 (0,83-1,88; 0,17)	0,91 (0,47-1,76; 0,40)	0,00 (0,00-2,76; 0,14)
Sensibilidade térmica	0,65 (0,36-0,91; 0,05)	1,73 (1,23-2,24; 0,00)	0,00 (0,00-1,80; 0,08)
Sensibilidade protetora dos pés	1,18 (0,57-2,46; 0,35)	0,98 (0,33-2,91; 0,49)	0,00 (0,00-11,39; 0,34)
Alteração do reflexo aquileu	1,74 (1,32-2,30; 0,00)	0,36 (0,10-1,31; 0,02)	1,10 (0,15-7,77; 0,42)

Nota: *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase); PSD (polineuropatia simétrica distal); DNE (*Diabetic Neuropathy Examination*); NSS (*Neuropathy Symptom Score*) CC (indivíduos homocigotos do tipo selvagem); CT (indivíduos heterocigotos); TT (indivíduos homocigotos); OR (odds ratio); IC (intervalo de confiança).

A média da idade, o tempo de diagnóstico, a hemoglobina glicada, peso, altura, IMC, LDL, colesterol total e VLDL foram mais altas em participantes com PSD e associadas ao polimorfismo CC (Tabela 13). O polimorfismo CT apresenta associações com hemoglobina glicada, LDL, triglicerídeos e colesterol total (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação dos polimorfismos da MTHFR com provável PSD

Variáveis Sociodemográficas	MTHFR (Média/desvio padrão)			P valor		
	Polimorfismo CC Com PSD/ Sem PSD	Polimorfismo CT Com PSD/ Sem PSD	Polimorfismo TT Com PSD/ Sem PSD	CC	CT	TT
Idade (anos)	15,23 (2,70)	14,00 (2,54)	*	0,05	0,55	*
	13,66 (3,07)	8,22 (2,87)	12,78 (3,04)			
Tempo de diabetes (anos)	11,35 (3,06)	10,00 (2,40)	*	0,02	0,41	*
	9,54 (3,03)	9,18 (2,94)	8,57 (3,71)			
Hemoglobina glicada (%)	8,99 (1,88)	9,24 (2,44)	*	0,02	0,00	*
	8,00 (1,35)	7,95 (1,18)	7,40 (0,53)			
Peso (Kg/m ²)	62,29 (14,61)	56,13 (19,80)	*	0,00	0,44	*
	50,77 (15,23)	51,91 (15,93)	47,00 (16,66)			
Altura (cm)	1,62 (0,13)	1,57 (0,17)	*	0,06	0,80	*
	1,55 (0,16)	1,56 (0,16)	1,49 (0,15)			
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	23,38 (2,91)	21,72 (3,91)	*	0,00	0,71	*
	20,57 (3,52)	21,14 (4,66)	20,50 (5,35)			
Pressão arterial sistólica (mmHg)	108,82 (10,53)	106,20 (13,03)	*	0,16	0,91	*
	104,02 (13,12)	105,81 (10,62)	104,28 (9,97)			
Pressão arterial diastólica (mmHg)	69,41 (8,99)	67,50 (6,34)	*	0,20	0,88	*
	66,00 (10,14)	67,08 (8,48)	66,78 (8,68)			
Albuminúria (g/dL)	8,21 (5,28)	8,63 (6,29)	*	0,72	0,68	*
	8,98 (7,92)	11,18 (17,33)	6,56 (7,28)			
HDL colesterol (mg/dL)	63,11 (16,57)	53,90 (12,06)	*	0,73	0,30	*
	61,57 (17,16)	59,45 (16,25)	60,41 (14,58)			
LDL colesterol (mg/dL)	107,94 (45,06)	108,70 (37,48)	*	0,02	0,03	*
	88,12 (29,05)	91,20 (21,88)	89,30 (16,43)			
Triglicerídeos (mg/dL)	101,88 (47,73)	131,50 (75,63)	*	0,00	0,00	*
	70,05 (36,96)	72,14 (30,43)	79,15 (33,84)			
Colesterol total (mg/dL)	186,53 (57,67)	188,00 (45,85)	*	0,02	0,02	*
	162,67 (35,93)	164,64 (27,29)	165,15 (23,77)			
VLDL (mg/dL)	22,54 (10,99)	34,75 (18,98)	*	0,01	0,00	*
	15,55 (6,98)	14,21 (5,86)	19,75 (10,30)			

Nota: *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase); PSD (polineuropatia simétrica distal); CC (indivíduos homocigotos do tipo selvagem); CT (indivíduos heterocigotos); TT (indivíduos homocigotos) (*) não haviam participantes PSD e com polimorfismo TT, impossibilitando avaliar associação estatística;

Nos participantes com genótipo CC, a neuropatia sensorial esteve associada à hemoglobina glicada (p valor=0,00) e ao LDL colesterol (0,04).

7 DISCUSSÃO

Este estudo foi inédito nos diversos aspectos que ele abordou: primeiro por se tratar de uma coorte bem definida de crianças e adolescentes em acompanhamento em um ambulatório de referência para diabetes tipo 1; segundo, por estimar a prevalência da PSD em parte de uma população pediátrica brasileira e por último, observar a associação da lesão nervosa com os polimorfismos estudados.

A prevalência da PSD – nesta amostra estudada – foi de 14% e observamos uma ampla variação da frequência na literatura (7% e 90%). Essa ampla variação, estimada entre crianças e adolescentes com DM1, pode estar relacionada à caracterização da lesão nervosa atribuída em cada estudo (grau de comprometimento, tipo lesão e pessoas assintomáticas e sintomáticas), bem como aos critérios e instrumentos diagnósticos (JAISWAL et al, 2017; MAH; PACAUD, 2014). Na Eslováquia foi realizado um estudo com 114 pessoas com DM1 e a prevalência da PSD foi de 29,8% (idade e tempo de diagnóstico médio 17,8 e 10 anos, respectivamente) (SNAHNICANOVA et al, 2018). Em 2022, uma revisão sistemática observou que a prevalência da provável PSD em crianças e adolescentes com DM1 variou entre 13,5 e 62%, forma subclínica da PSD entre 22 e 88%; e a PSD confirmada entre 2,6 e 11% (FRANCESCHI et al, 2022). Não encontramos, no Brasil, estudos que objetivassem estimar a prevalência da PSD em crianças e adolescentes com DM1.

Com relação à triagem e aos instrumentos para diagnosticar a PSD em crianças e adolescentes com DM1, Neu et al (2013) recomendaram a triagem anual a partir dos 11 anos de idade ou com cinco anos ou mais de diagnóstico da DM1, o que se daria por meio da avaliação da sensibilidade vibratória (utilizando o diapasão 128 Hz) e da investigação dos reflexos. A ADA (2017) considera exame anual do pé para adolescente, no início da puberdade ou aos 10 anos de idade, abrangendo a avaliação dos reflexos patelar e aquileu, a avaliação dos sintomas neuropáticos, da proprioceptiva articular e das sensibilidades vibratória e protetora dos pés (este último com monofilamento de 10 g) (CHIANG et al, 2018). No entanto, as recomendações acima estão relacionadas à investigação do envolvimento das fibras grossas, mas as fibras finas, normalmente, são as primeiras a apresentarem alterações e o diagnóstico precoce tem impacto na qualidade de vida (ASSOCIATION, 2022).

A lesão das fibras finas, fibras nervosas C e A δ pouco ou não mielinizadas, são responsáveis pela sensibilidade térmica e percepção à dor e consideradas como

fatores importantes para a prevenção da ulceração plantar (ZIEGLER et al, 2022). A biópsia de pele é o padrão ouro para quantificar a densidade das fibras nervosas intraepidérmicas e diagnosticar a lesão das fibras finas (BURGESS et al, 2021). Por outro lado, Nebuchennykh et al (2009) conduziram um estudo com 210 pessoas com sinais e sintomas de neuropatia e observaram que a biópsia da pele e a avaliação da sensibilidade térmica podem ser complementares e obtiveram sensibilidades próximas para a detecção de anormalidade em fibras nervosas finas.

Já o envolvimento das fibras grossas, normalmente está relacionado à alteração das sensibilidades protetora dos pés, tátil, vibratória e da percepção articular e às alterações dos reflexos patelar e aquileu (ANANDHANARAYANAN et al, 2022). Estas alterações foram as menos frequentes apresentadas entre os participantes da amostra estudada (5%, 1%, 4%, 1%, 21% e 13%, respectivamente).

Há muitos escores e instrumentos para avaliações disponíveis na literatura, incluindo a triagem de sintomas e a avaliação física, tanto para diagnosticar a PSD quanto para avaliar a sua progressão, com o objetivo de identificar o comprometimento tanto em fibras finas quanto em fibras grossas (ZIEGLER et al, 2022). Combinações de mais de um teste têm 87% de sensibilidade na detecção da PSD (VINIK et al, 1995).

A prevalência da PSD confirmada (diagnosticada através do ECN) foi de 15,7%, um pouco acima da prevalência observada através dos critérios estabelecidos no estudo (14%). Não há um consenso com relação a qual nervo periférico oferece maior sensibilidade e especificidade para a detecção da PSD (WEISMAN et al, 2013). Alguns estudos sugerem a avaliação de nervos motores e outros recomendam nervos sensoriais, no entanto, as fibras sensoriais mais distais são frequentemente as primeiras a serem afetadas; e Karacayir, Varol e Utku (2005) observaram que o nervo sural (avaliado próximo ao maléolo lateral do pé) serve como parâmetro confiável para identificar, precocemente, a PSD. Assim como em nosso estudo, eles também observaram que as amplitudes foram reduzidas e associadas à PSD; também observamos esta associação com a neuropatia sensorial. Em nosso estudo, avaliamos apenas o nervo sural (referência no maléolo lateral) e não foi possível avaliar estas relações. A anormalidade predominante do ECN é a perda de axônios o que, eletrofisiologicamente, significa a redução nas amplitudes e não nas velocidades de condução nervosa e, por isto, as alterações observadas podem não ser a melhor

estratégia para monitorar a progressão da lesão neural (ANANDHANARAYANAN et al, 2022).

As alterações dos ECN estão relacionadas à idade e ao tempo de diagnóstico, mas, no presente estudo, não observamos a associação estatística (p valor=0,70; 0,84, respectivamente) (ANANDHANARAYANAN et al, 2022).

Apenas 35% da amostra estudada aceitou realizar o ECN e a concordância entre os avaliadores foi considerada substancial ($k=0,697$). Acreditamos que a amostra baixa interferiu nesta relação, mas a alta prevalência de participantes com neuropatia sensorial (42,71% diagnosticado através do NSS) nos leva a acreditar que a biópsia de pele (considerado padrão ouro para diagnosticar lesões em fibras finas) poderia ter aumentado esta prevalência. Assim, ter analisado melhor a concordância, a sensibilidade e a especificidade dos instrumentos e escores utilizados. Fibras finas nervosas não mielinizadas são afetadas no início do DM1 e não são avaliadas em ECN. Tanto o ECN quanto a biópsia de pele (fibras nervosas intraepidérmicas) são caros, requerem profissionais habilitados, são demorados e trabalhosos, tornando-os impraticáveis para a rotina clínica (WEISMAN et al, 2013).

Utilizamos o NSS para estimar a neuropatia sensorial, avaliamos a alteração da temperatura térmica e investigamos os sintomas sensoriais – e estes são exames simples e que podem ser utilizados na prática clínica, inclusive em crianças. Consideramos esta possibilidade devido à metodologia empregada e observamos que, quando perguntávamos se a criança apresentava alguma sensação desagradável nos membros inferiores, o relato destas sensações só poderia ser dito por quem, de fato, a experienciasse. A alteração da sensibilidade térmica foi frequente em 23% e 54% relataram sintomas sensoriais relacionados à dor. Através do NSS observamos que 42,71% das crianças e adolescentes tinham neuropatia sensorial. A neuropatia sensorial está relacionada ao mau controle glicêmico e observamos uma associação estatística nesta relação (p valor=0,00). Foi relatado ser predominante no sexo masculino, tanto no DM1 quanto no DM2 (ANANDHANARAYANAN et al, 2022) e observamos que ser menina é um fator protetor para a neuropatia sensorial. Embora ainda não se conheça exatamente a plausibilidade biológica para a neuropatia sensorial, uma hipótese sugere que alterações no fluxo de glicose no sangue produzam alterações no fluxo sanguíneo epineural, levando à isquemia; também foram sugeridas que citocinas pró-inflamatórias da ativação da micróglia também corroboram nesta relação (ANANDHANARAYANAN et al, 2022).

A hemoglobina glicada foi associada à PSD, tanto nas meninas quanto nos meninos, e suas relações já foram difundidas em grandes estudos com DM1 (SVENSSON, IBFELT, CARSTENSEN et al, 2022; ALBERS et al, 2010). A hiperglicemia induz duas vias responsáveis pelo dano neural: via metabólica e isquêmica e estas estão intimamente relacionadas. A ativação destas vias desencadeia sucessivos processos inflamatórios e isquêmicos que culminam em comprometimento da condução nervosa, na disfunção neurovascular, apoptose e *déficits* sensoriais (BURGESS et al, 2021).

Com relação ao perfil lipídico, postula-se que há uma relação linear entre concentrações de lipídios e alterações microvasculares e, apesar de termos parâmetros de concentrações para classificá-los, as pessoas se beneficiam ao atingirem níveis mais baixos (REH et al, 2011). A dislipidemia é multifatorial, mas ela está relacionada ao mal controle glicêmico, à resistência à insulina e à suscetibilidade genética (BULUT; DEMIREL; METIN, 2017). Homma et al (2015) realizaram um estudo no Brasil e observaram uma prevalência de dislipidemia de 72,5%. No entanto, Bulut, Demirel e Metin (2017) realizaram um estudo com crianças turcas e com DM1 e encontraram uma prevalência de 26,2%, ou seja, uma variação considerável que pode ser devida aos diferentes perfis da população (fatores étnicos, hábitos alimentares, sociais e critérios de inclusão). O hipotireoidismo é uma condição que pode influenciar o perfil lipídico, mas hipotireoidismo foi critério de exclusão no nosso estudo. Não classificamos o perfil lipídico da amostra estudada, mas observamos que os níveis séricos do triglicerídeo, LDL colesterol e VLDL colesterol foram mais altos nos participantes com PSD. Níveis baixos do HDL têm efeitos protetores (inibição da inflamação, oxidação, trombose e da vasodilatação), eles também participam na remoção de lipídios das células periféricas através do transporte reverso do colesterol, o que, potencialmente, melhora a inflamação e o controle glicêmico. Apesar de observamos níveis mais baixos nos participantes com PSD, HDL colesterol não apresentou associação, como fator de risco ou proteção, com PSD e neuropatia sensorial. Os níveis mais baixos, nesta população, podem estar relacionados à frequência da prática da atividade física (34%) e ao sobrepeso (35%).

A PSD também se mostrou associada aos fatores de risco bem estabelecidos na literatura, tais como: a idade, o tempo de diagnóstico, IMC, peso e altura (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012). A altura está relacionada porque axônios mais longos são mais susceptíveis ao dano celular (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2008).

As complicações microvasculares nos jovens com DM1 diferem por apresentarem quadros clínicos menos graves e com manifestações mais sutis, quando comparados aos adultos. Isto porque os diabéticos jovens apresentam sinais e sintomas subclínicos e isso poderia explicar a diminuição da sensibilidade de algumas ferramentas de triagem para complicações microvasculares em diabetes de início juvenil (ZIEGLER et al, 1998; TOMMERDAHL et al, 2021). Jende et al (2018) observaram que a PSD também é diferente entre pessoas com DM1 e DM2. No DM1 as lesões estão relacionadas com o mal controle glicêmico e com a perda da condução nervosa, enquanto na DM2 elas estão associadas ao metabolismo lipídico. No entanto, essas diferenças precisam ser melhor elucidadas em crianças e adolescentes com DM1 e DM2 (TOMMERDAHL et al, 2021).

As complicações microvasculares têm sido mais prevalentes em meninas adolescentes em comparação com meninos (DONAGHUE et al, 2018; AABERG et al, 2008). Nós observamos que, nesta amostra ser menina apresentou um risco 1,72 vezes maior para a neuropatia sensorial do que os meninos (p valor=0,03), mas não observamos esta associação com a PSD (p valor=0,36).

Evidências sugerem que a suscetibilidade genética exerça influência na disfunção microvascular (MONTI et al, 2007; WITZEL et al, 2015). A neuropatia sensorial apresentou uma associação com a história materna de diabetes (mãe e bisavô) e a história paterna do tio avô. Não observamos esta associação com PSD para nenhuma relação familiar investigada, tanto de forma isolada quanto agrupada. Um estudo realizado na China nos adultos com DM1 e DM2 investigou a relação entre complicações do pé diabético e no histórico familiar se observou uma associação com o histórico materno de DM. Apesar do estudo não ser relacionado diretamente à PSD, a classificação do pé diabético considera a PSD e a vasculopatia como critério. Também observaram associação da PSD com o fato de se ter mais de um membro da família com DM, no entanto, eles apenas analisaram o histórico familiar de mãe, pai e irmão (XIONG et al, 2020).

Jaiswal et al (2017) sugerem que as diferentes etnias entre jovens e adultos com DM1 e as suas relações com as complicações microvasculares precisam ser melhores compreendidas, no entanto, nós não avaliamos o fenótipo e a sua correlação com complicações microvasculares e suas possíveis relações com a PSD.

A autoimunidade também tem sido sugerida como mecanismo patogênico para a PSD (STROKOV et al, 2003). A *IL-4* desempenha um papel fundamental na

autoimunidade e age como um anti-inflamatório (BURACZYNSKA et al, 2017). A inflamação do endotélio é um grande precursor da lesão neural, portanto, a *IL-4*, como uma citocina anti-inflamatória, pode favorecer a PSD (BASOL et al, 2013). Não observamos associações dos polimorfismos do intron 3 VNTR com a PSD e com a neuropatia sensorial. *IL-4* regula o metabolismo de lipídios e glicose (ARABABADI, 2010; ALI et al, 2018) e o alelo A1, comparado ao A2, apresenta menor efeito deletério (KASZNICKI et al, 2012). No entanto, observamos fortes associações com vários fatores de risco, relacionados à PSD, entre os que apresentavam genótipo A1A1 (tempo de diabetes, hemoglobina glicada, peso, altura, IMC, triglicerídeos, colesterol VLDL e total). Curiosamente, o alelo A1 não se apresentou associado à PSD e à neuropatia sensorial.

Estudos que analisaram a associação destes polimorfismos com a PSD também os correlacionaram fortemente com as doenças cardiovasculares que são, em sua maioria, mais frequentes em adultos (SOBTI et al, 2010; BURACZYNSKA et al, 2017). Isto nos faz pensar que o fato desta população de estudo ser constituída de crianças e adolescentes, talvez aponte para o fato de que os efeitos deletérios estejam relacionados ao tempo de exposição, ou seja, à idade. Não encontramos estudos que analisassem crianças e adolescentes com DM1.

O gene *MTHFR* é uma variante termolábil que reduz a atividade e o aumento dos níveis de homocisteína. Heterozigotos para mutação (CT) têm cerca de 60% da sua atividade enzimática, quando comparados com homozigotos (CC); e os homozigotos para mutação (TT) apresentam apenas 30% da atividade (CHANGO et al, 2000). O aumento dos níveis de homocisteína pode afetar a função nervosa por efeitos citotóxicos diretos ou por dano oxidativo das células endoteliais, levando a uma arteriosclerose oclusiva em pequenos vasos (JIANBO et al, 2011). O alelo T foi frequente em 28% e o alelo C em 72% da amostra estudada. A frequência do alelo T difere entre os países e etnias, mas, nos indígenas americanos foi a mais alta observada (65%) (CONTRERAS-CUBAS et al, 2016).

A prevalência dos polimorfismos C677T está relacionada à etnia; e no Brasil a sua origem é extremamente heterogênea, caracterizando uma complexa miscigenação étnica. Arruda et al (1998) realizaram um estudo para determinar a prevalência da mutação C677T entre diferentes grupos étnicos e observaram que em 10% dos caucasianos, 1,45% dos pretos e 1,2% dos indígenas eram homozigotos variantes. Em nosso estudo, a frequência foi de 7,04%, mas não registramos a etnia

para considerar a influência étnica. Crianças e adolescentes heterozigotas representaram 40,70% e homozigotas 72%. No estudo de Arruda et al (1998) a frequência da homozigose foi maior entre pretos e indígenas (78,5% e 61,3%, respectivamente).

Encontramos oito estudos que tiveram como objetivo avaliar a associação do polimorfismo C677T com a PSD e os resultados foram divergentes (WU et al, 2016). Considerando o tipo de DM e o ciclo de vida, todos estudaram adultos e avaliaram DM2 (AMBROSCH et al, 2001; COSTACOU et al, 2006; YIGIT, KARAKUS, INANIR, 2013; MOLINA et al, 2013; SETTIN et al, 2014; RUSSO et al, 2015; JIMÉNEZ-RAMÍREZ et al, 2017; HAMIDI; RADFAR; AMOLI, 2018). As nacionalidades também diferiram (Turquia, Pensilvânia, Iraque, Egito, Porto Rico, China, Alemanha, Espanha). Um dos estudos não seguia a definição de critérios recomendados para classificar a PSD e utilizou apenas o monofilamento de 10 g (MOLINA et al, 2013). Com relação à amostra, uma delas foi considerada muito pequena e referiu esta limitação em seu estudo (AMBROSCH et al, 2001); e outro trabalhou com uma série histórica de 1950 a 1980 (COSTACOU et al, 2006); a série histórica está sujeita aos vieses de informação e detecção. A associação entre o polimorfismo C677T e PSD foi observada em cinco estudos (AMBROSCH et al, 2001; YIGIT, KARAKUS, INANIR, 2013; MOLINA et al 2013; SETTIN et al; HAMIDI; RADFAR; AMOLI, 2018); entretanto, três não observaram esta associação (COSTACOU et al, 2006; RUSSO et al, 2015; JIMÉNEZ-RAMÍREZ et al, 2017). Nosso estudo não encontrou associação estatística significativa para nenhum genótipo analisado, mesmo após ajuste de possíveis variáveis confundidoras. Contudo, o genótipo CC mostrou-se associado como fator de proteção para uma alteração da sensibilidade térmica (OR=0,65; IC95%= 0,36-0,91; p valor= 0,05) e, por outro lado, o genótipo CT apresentou-se como fator de risco (OR=1,73; IC95%= 1,23-2,24; p valor= 0,00). O número reduzido de indivíduos TT e a ausência deste classificado como provável PSD impediu que pudéssemos analisar possíveis interações, tanto com a condição quanto para os sinais e sintomas avaliados. Indivíduos homozigotos (CC), mesmo tendo melhor atividade enzimática quando comparados com os heterozigotos (CT) e com a variante homozigota (TT) foram mais associados aos fatores de risco para a PSD (idade, tempo de diagnóstico, HbA1c, peso, IMC, triglicerídeos, VLDL e os colesterolídeos LDL e total).

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A ausência de participante com a variante homozigota, principalmente entre os participantes com PSD, impossibilitou a análise de suas associações. Isto porque indivíduos com genótipo TT têm uma produção mais alta de homocisteína. Além disso, a ausência de informações com relação à etnia da população impossibilitou avaliar a relação entre frequência dos alelos e polimorfismos, bem como de suas relações com a lesão neural. Consideramos que a falta de informação sobre etnia possa ter gerado um fator de confusão, que poderia ser perfeitamente controlada na análise estatística, possibilitando olhar o seu efeito.

Jaiswal et al (2017) sugerem que as diferentes etnias entre jovens e adultos com DM1 e as suas relações com as complicações microvasculares precisam ser melhores compreendidas, no entanto, nós não avaliamos o fenótipo e a sua correlação com complicações microvasculares e suas possíveis relações com a PSD.

A expressão gênica também é influenciada por mecanismos epigenéticos (influenciados por fatores genéticos e ambientais). Mas, apesar de termos coletado variáveis clínicas e laboratoriais, acreditamos que possa ter outro mecanismo que esclareça sobre uma possível interferência funcional do polimorfismo.

Outro ponto importante é que a variante genética C677T do gene *MTHFR* foi associada a indivíduos com DM2, predispondo a redução da atividade enzimática (hiperhomocisteína) e níveis mais baixos de folato, vitaminas B6 e B12 (ZHONG et al, 2013). Acredita-se que grande parte da variação dos níveis de homocisteína seja causada pelos níveis de folato e vitamina B12 e, portanto, a introdução de vitaminas e minerais na rotina dietética possa minimizar a deficiência enzimática causada pelo polimorfismo C677T (COPPOLA et al, 2000). Como não avaliamos a ingestão destes componentes na amostra do estudo, não pudemos analisar os efeitos confundidores desta relação.

O uso da metformina tem sido associado à deficiência da vitamina B12 e, neste estudo, excluimos indivíduos em uso de metformina e/ou com deficiência da B12 (WEI et al, 2022).

A detecção precoce necessita estar alinhada à educação em saúde desta população com relação aos efeitos do descontrole glicêmico, principalmente porque há evidências de que o controle rigoroso da glicemia previne a neuropatia no DM1. Enfatizamos dois testes simples, fáceis e que foram perfeitamente compreendidos

pela população do estudo: o teste para avaliar a sensibilidade térmica (usando tubos de ensaio). Ainda assim, chamamos a atenção para a importância das investigações, principalmente em relação à neuropatia sensorial. A detecção nos estágios iniciais é fundamental para possibilitar uma janela de oportunidade para o tratamento multifatorial e para limitar a progressão da PSD. Isto se deve ao fato de a degeneração das fibras finas possuírem maior potencial à lesão, mas, em contrapartida, ao fato de elas terem maior capacidade regenerativa.

8 CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar uma amostra de crianças e adolescentes com DM1 do Brasil, acompanhadas sistematicamente por um ambulatório de referência, em um hospital universitário. Apesar da concordância dos instrumentos utilizados e o ECN não ter sido ótima, abordamos as possíveis interações que possam ter ocorrido.

Este estudo também possibilitou a análise de muitas variáveis clínicas e laboratoriais associadas a fatores de risco microvasculares.

Não encontramos associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o polimorfismo I3VNTR do gene *IL4*. No entanto, o estudo fornece outras associações e sugere possíveis implicações para esses achados. A falta de associação observada entre os polimorfismos investigados e a PSD podem ter sido influenciados pela falta de informações étnicas ou pela característica da população (crianças e adolescentes).

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com relação a amostra do estudo, consideramos o tamanho amostral satisfatório para estimar a prevalência da PSD porque não tivemos recusa ou desistência para participação na pesquisa e os participantes eram acompanhados rotineiramente em um ambulatório de referência em DM1. No entanto, consideramos ressaltar que pesquisas futuras analisem a associação dos polimorfismos com a PSD a partir do estudo observacional do tipo caso controle aninhado ao estudo seccional. Isto porque polimorfismos são, comumente, eventos raros portanto sugerimos que o desenho da pesquisa seja estudo observacional analítico do tipo caso controle aninhado ao seccional. Neste caso, o tamanho amostral do estudo seccional deverá ser maior para permitir a identificação dos casos (crianças e adolescentes com polimorfismos).

A interleucina 13 (*IL13*) apresenta semelhanças na organização interna com a *IL4* (sítios de ligação para fatores transcricionais comuns), com cerca de 25% de similaridade de sequência, apresentando 4 exons e 3 introns e levantando a hipótese de que estes dois genes tenham surgido a partir de um evento único de duplicação (CHEN et al, 2004). Seus polimorfismos apresentam características importantes para a sinalização do receptor *IL4/13*, regulando a susceptibilidade e gravidade da doença. Tanto a *IL4* quanto a *IL13* provocam inflamação tipo 2 potencialmente patogênica. A interação das citocinas com seus receptores é complexa e é importante analisar como as variações individuais de um gene modificam a atividade comum de uma certa proteína que age em uma mesma via potencializando, assim, seu efeito (MCCORMICK; HELLER, 2015). Sugerimos que novos estudos possam analisar o efeito combinado da *IL4* e da *IL13* na lesão neural.

Com relação ao gene *MTHFR*, a medição dos níveis de homocisteína é uma estratégia para analisar o seu efeito sobre a lesão neural (GOLBAHAR et al, 2015), portanto, sugerimos que esta relação poderá ser melhor avaliada em futuros estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABERG, Melanie L.; BURCH, Draion M.; HUD, Zarinah R.; ZACHARIAS, Michael P.. Gender differences in the onset of diabetic neuropathy. **Journal Of Diabetes And Its Complications**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 83-87, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.06.009>.

ACHENBACH, Peter; BONIFACIO, Ezio; ZIEGLER, Anette-G.. Predicting type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 98-103, mar. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-005-0035-y>.

AIDAR, Marisi; LINE, Sergio Roberto Peres. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 148-152, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-64402007000200012>.

ALASSAF, Abeer; GHARAIBEH, Lobna; IBRAHIM, Sarah; ALKHALAILEH, Shatha; ODEH, Rasha. Effect on Glycemic Control of an Early Intensive Dietary Structured Education Program for Newly Diagnosed Children with Type 1 Diabetes in Jordan. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 2023, p. 1-11, 28 abr. 2023. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2023/7258136>.

ALBERS, James W.; HERMAN, William H.; POP-BUSUI, Rodica; FELDMAN, Eva L.; MARTIN, Catherine L.; CLEARLY, Patricia A.; WABERSKI, Barbara H.; LACHIN, John M.. Effect of Prior Intensive Insulin Treatment During the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on Peripheral Neuropathy in Type 1 Diabetes During the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 1090-1096, 11 fev. 2010. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc09-1941>.

ALI, R.; EL-SAID, A.; EL-BAZ, H.; SETTIN, A.. Ethnic variation of *IL-4* intron 3 VNTR gene polymorphism; its association with type 2 diabetes mellitus and its complication (neuropathy) in Egyptian subjects. **American Journal Of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, [S.L.], v. 177, n. 7, p. 635-640, out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32647>.

AMBROSCH, A.; DIERKES, J.; LOBMANN, R.; KÜHNE, W.; KÖNIG, W.; LULEY, C.; LEHNERT, H. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 18, n. 3, p. 185–192, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2001.00445.x>

ANANDHANARAYANAN, A.; TEH, K.; GOONOO M.; TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Diabetic Neuropathies. [Updated 2022 Mar 15]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. **Endotext [Internet]**. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279175/>

APELQVIST, J.; BAKKER, K.; VAN HOUTUM, W. H.; SCHAPER, N. C.. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic

foot. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 181-187, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.848>.

ARABABADI, K.M. Interleukin-4 gene polymorphisms in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Iranian journal of kidney diseases**, v. 4, n. 4, p. 302-306, oct. 2010. PMID: 20852371.

ARMSTRONG, David G; A LAVERY, Lawrence; HARKLESS, Lawrence B. Validation of a Diabetic Wound Classification System: the contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 855-859, 1 maio 1998. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.21.5.855>.

ARRUDA, Valder R.; SIQUEIRA, Lucia H.; GONÇALVES, Marilda S.; VON ZUBEN, Paula M.; SOARES, Manoel C.P.; MENEZES, Raimundo; ANNICHINO-BIZZACCHI, Joyce M.; COSTA, Fernando F.. Prevalence of the mutation C677 ? T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **American Journal Of Medical Genetics**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 332-335, 24 jul. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19980724\)78:43.0.co;2-n](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19980724)78:43.0.co;2-n).

ASKARI, Gholamreza; MOTTAGHI, Tayebbeh; KHORVASH, Fariborz; KHEIRROLLAHI, Majid; MARACY, Mohammadreza. The MTHFR C677T polymorphism influences the efficacy of folic acid supplementation on the nerve conduction studies in patients with diabetic polyneuropathy; A randomized, double blind, placebo-controlled study. **Journal Of Research In Medical Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 36, 2019. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/jrms.jrms_774_18.

ASSOCIATION, American Diabetes. 10. Microvascular Complications and Foot Care. **Diabetes care**, v. 40, Supplement 1, p. 88–98, 2017. <https://doi.org/10.2337/dc17-S013>

ASSOCIATION, American Diabetes. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. **Diabetes Care**, v. 44, Supplement 1, p.15–33, 2021. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>

ASSOCIATION, American Diabetes. Microvascular Complications and Foot Care. **Diabetes Care**. v. 39, Supple 1 p. 72-80, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-S012>

ASSOCIATION, American Diabetes. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2022 **Diabetes Care**, v. 45, supplement 1, p. 185-194, jan. 2022. <http://dx.doi.org/10.2337/dc22-S012>.

ASSOCIATION, American Diabetes. Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers. **Clinical Diabetes**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 10-38, 1 jan. 2022. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/cd22-as01>.

BALCI, Kemal; KARACAYIR, Semra; VAROL, Gamze; UTKU, Ufuk. Utility of dorsal sural nerve in early determination of diabetic polyneuropathy. **Journal Of The Peripheral Nervous System**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 342-343, set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1085-9489.2005.10314.x>.

BARAT, P.; VALADE, A.; BROSELIN, P.; ALBERTI, C.; MAURICE-TISON, S.; LÉVY-MARCHAL, C.. The growing incidence of type 1 diabetes in children: the 17-year french experience in aquitaine. **Diabetes & Metabolism**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 601-605, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2008.06.002>.

BASOL, Nursah; INANIR, Ahmet; YIGIT, Serbulent; KARAKUS, Nevin; KAYA, Suheyila Uzun. High Association of *IL-4* Gene Intron 3 VNTR Polymorphism with Diabetic Peripheral Neuropathy. **Journal Of Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 437-441, 16 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-0048-y>.

BELL, Ronny A.; MAYER-DAVIS, Elizabeth J.; BEYER, Jennifer W.; D'AGOSTINO, Ralph B.; LAWRENCE, Jean M.; LINDER, Barbara; LIU, Lenna L.; MARCOVINA, Santica M.; RODRIGUEZ, Beatriz L.; WILLIAMS, Desmond. Diabetes in Non-Hispanic White Youth. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 102-111, 1 mar. 2009. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc09-s202>.

BOGHDADY, Noha Ahmed El; BADR, Gamal Ali. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy. **Cell Biochemistry And Function**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 328-334, 7 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.2808>.

BOULTON, A.J.M.; GRIES, F.A.; JERVELL, J.A.. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetic Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 508-514, jun. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9136\(199806\)15:63.0.co;2-l](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9136(199806)15:63.0.co;2-l).

BOULTON, Andrew J. M.; VALENSI, Paul; TESFAYE, Solomon. International Neuropathy Workshop of 2009: introduction to the final reports. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 7, p. 617-619, out. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1228>.

BOULTON, Andrew J.M.; VINIK, Arthur I.; AREZZO, Joseph C.; BRIL, Vera; FELDMAN, Eva L.; FREEMAN, Roy; MALIK, Rayaz A.; MASER, Raelene E.; SOSENKO, Jay M.; ZIEGLER, Dan. Diabetic Neuropathies. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 956-962, 1 abr. 2005. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.28.4.956>.

BULUT, T.; DEMIREL, F.; METIN, A. The prevalence of dyslipidemia and associated factors in children and adolescents with type 1 diabetes. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 181-187, feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.1515/jpem-2016-011>.

BURACZYNSKA, Monika; BURACZYNSKA, Kinga; ZUKOWSKI, Pawel; KSIAZEK, Andrzej. Interleukin-4 Gene Intron 3 VNTR Polymorphism in Type 2 Diabetes Patients with Peripheral Neuropathy. **Immunological Investigations**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 146-153, 28 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08820139.2017.1407334>.

BURGESS, Jamie; FRANK, Bernhard; MARSHALL, Andrew; KHALIL, Rashaad S.; PONIRAKIS, Georgios; PETROPOULOS, Ioannis N.; CUTHBERTSON, Daniel J.; MALIK, Rayaz A.; ALAM, Uazman. Early Detection of Diabetic Peripheral Neuropathy: a focus on small nerve fibres. **Diagnostics**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 165, 24 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11020165>.

CAMPBELL, W.W; BAROHN, R.J. DeJong - O exame neurológico. 7^o ed. **Editora Guanabara koogan**, 2014.

CASHMAN, Christopher R.; HÖKE, Ahmet. Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 596, p. 33-50, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.048>.

CHANGO, A.; CHANGO, A.; BOISSON, F.; BARBÉ, F.; QUILLIOT, D.; DROESCH, S.; PFISTER, M.; FILLON-EMERY, N.; LAMBERT, D.; FRÉMONT, S.. The effect of 677C → T and 1298A → C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 593-596, jun. 2000. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114500000751>.

CHEN, Weiguo; ERICKSEN, Mark B.; LEVIN, Linda S.; HERSHEY, Gurjit K. Khurana. Functional effect of the R110Q IL13 genetic variant alone and in combination with IL4RA genetic variants☆. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 553-560, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.04.044>.

CHIANG, Jane L.; MAAHS, David M.; GARVEY, Katharine C.; HOOD, Korey K.; LAFFEL, Lori M.; WEINZIMER, Stuart A.; WOLFSDORF, Joseph I.; SCHATZ, Desmond. Type 1 Diabetes in Children and Adolescents: a position statement by the american diabetes association. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 2026-2044, 13 ago. 2018. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dci18-0023>.

CONTRERAS-CUBAS, Cecilia; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Beatriz E.; GARCÍA-ORTIZ, Humberto; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, Angélica; BARAJAS-OLMOS, Francisco; CID, Miguel; MENDOZA-CAAMAL, Elvia C.; CENTENO-CRUZ, Federico; ORTIZ-CRUZ, Gabriela; JIMÉNEZ-LÓPEZ, José Concepción. Heterogenous Distribution of MTHFR Gene Variants among Mestizos and Diverse Amerindian Groups from Mexico. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 0163248, 20 set. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0163248>.

CORRÊA-GIANNELLA, Maria Lúcia; VIEIRA, Suzana Maria. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 375-386, mar. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302008000200026>.

COSTACOU, Tina; CHANG, Yuefang; FERRELL, Robert E.; ORCHARD, Trevor J.. Identifying Genetic Susceptibilities to Diabetes-related Complications among Individuals at Low Risk of Complications: an application of tree-structured survival analysis. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 164, n. 9, p. 862-872, 23 ago. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwj287>.

CRAIG, Maria e; JEFFERIES, Craig; DABELEA, Dana; BALDE, Naby; SETH, Anju; DONAGHUE, Kim C. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 15, n. 20, p. 4-17, set. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/pedi.12186>.

CUMMINS, Robert A. The domains of life satisfaction: an attempt to order chaos. **Social Indicators Research**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 303-328, 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00292050>.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group, NATHAN, D.M; GENUTH, S.; LACHIN, J.; CLEARY, P.; CROFFORD, O.; DAVIS, M.; RAND, L.; SIEBERT, C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n.14, p. 977-986, 1993. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>.

Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group; LACHIN, J.M.; GENUTH, S.; CLEARY, P.; DAVIS, M.D.; NATHAN, D.M. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. **The New England Journal of Medicine**, v.342, n. 6, p. 381-389,10 feb. 2000. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200002103420603>. Erratum in: **The New England Journal of Medicine**, v.342, n. 6, p. 381-389, 4 may 2000.

Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020. Disponível em: < <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>>. Acesso em 22 de agosto de 2022

DONAGHUE, Kim C.; MARCOVECCHIO, M. Loredana; WADWA, R. P.; CHEW, Emily Y.; WONG, Tien Y.; CALLIARI, Luis Eduardo; ZABEEN, Bedowra; SALEM, Mona A.; CRAIG, Maria E. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: microvascular and macrovascular complications in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 19, p. 262-274, out. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/pedi.12742>.

DYCK, Peter J.; ALBERS, James W.; ANDERSEN, Henning; AREZZO, Joseph C.; BIESSELS, Geert-Jan; BRIL, Vera; FELDMAN, Eva L.; LITCHY, William J.; O'BRIEN, Peter C.; RUSSELL, James W.. Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 7, p. 620-628, out. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1226>.

DYCK, Peter James. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 21-32, jan. 1988. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880110106>

ELSAYED, Nuha A.; ALEPPO, Grazia; ARODA, Vanita R.; BANNURU, Raveendhara R.; BROWN, Florence M.; BRUEMMER, Dennis; COLLINS, Billy S.; HILLIARD, Marisa E.; ISAACS, Diana; JOHNSON, Eric L.. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:

standards of care in diabetes.:2023. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 19-40, 12 dez. 2022. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc23-s002>.

ENGLAND, J. D.; GRONSETH, G. S.; FRANKLIN, G.; MILLER, R. G.; ASBURY, A. K.; CARTER, G. T.; COHEN, J. A.; FISHER, M. A.; HOWARD, J. F.; KINSELLA, L. J.. Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research. **Neurology**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 199-207, 24 jan. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000149522.32823.ea>.

FELDMAN, E.L.; CALLAGHAN, B.C.; POP-BUSUI, R.; ZOCHODNE, D.W.; WRIGHT, D.E; BENNET, D.L.; ÓCULOS, V.; RUSSEL, J.W.; VISWANATHAN, V. Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 41, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>

FRANCESCHI, Roberto; MOZZILLO, Enza; CANDIA, Francesca di; ROSANIO, Francesco Maria; LEONARDI, Letizia; LIGUORI, Alice; MICHELI, Francesca; CAUVIN, Vittoria; FRANZESE, Adriana; PIONA, Claudia Anita. A systematic review of the prevalence, risk factors and screening tools for autonomic and diabetic peripheral neuropathy in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes. **Acta Diabetologica**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 293-308, 28 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-022-01850-x>.

GOLBAHAR, Jamal; HAMIDI, Afshin; AMINZADEH, Mohammad A.; OMRANI, Gholamhossein R. Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. **Bone**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 760-765, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2004.04.018>

HAJAS, Gabriel; KISSOVA, Viera; TIRPAKOVA, Anna. A 10-yr follow-up study for the detection of peripheral neuropathy in young patients with type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 632-641, 29 mar. 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/pedi.12382>.

HAMIDI, Armita Kakavand; RADFAR, Mania; AMOLI, Mahsa M.. Association between MTHFR variant and diabetic neuropathy. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 1-5, fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.04.017>.

HICKS, C.W.; WANG, D.; WINDHAM, B.G.; MATSUSHITA, K.; SELVIN, E. Prevalence of peripheral neuropathy defined by monofilament insensitivity in middle-aged and older adults in two US cohorts. **Scientific Reports**, v. 11, n. 19159, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98565-w>

HOMMA, Thaís Kataoka; ENDO, Camila Matsuura; SARUHASHI, Tatiana; MORI, Ana Paula Ivata; NORONHA, Renata Maria de; MONTE, Osmar; CALLIARI, Luis Eduardo Procópio. Dyslipidemia in young patients with type 1 diabetes mellitus. **Archives Of Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 215-219, jun. 2015. Archives of Endocrinology and Metabolism. <http://dx.doi.org/10.1590/2359-3997000000040>.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas Reports. 10th edition, 2021. Disponível em: < [https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF Atlas 10th Edition 2021.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF%20Atlas%2010th%20Edition%202021.pdf)>. Acesso em 1 de maio de 2023.

INZUCCHI, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BUSE, J. B.; DIAMANT, M.; FERRANNINI, E.; NAUCK, M.; PETERS, A. L.; TSAPAS, A.; WENDER, R.; MATTHEWS, D. R.. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetologia**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 1577-1596, 20 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2534-0>.

JAISWAL, Mamta; DIVERS, Jasmin; DABELEA, Dana; ISOM, Scott; BELL, Ronny A.; MARTIN, Catherine L.; PETTITT, David J.; SAYDAH, Sharon; PIHOKER, Catherine; STANDIFORD, Debra A.. Prevalence of and Risk Factors for Diabetic Peripheral Neuropathy in Youth With Type 1 and Type 2 Diabetes: search for diabetes in youth study. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 40, n. 9, p. 1226-1232, 3 jul. 2017. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc17-0179>.

JANKOVIC, Milena; NOVAKOVIC, Ivana; NIKOLIC, Dejan; MAKSIC, Jasmina Mitrovic; BRANKOVIC, Slavko; PETRONIC, Ivana; CIROVIC, Dragana; DUCIC, Sinisa; GRAJIC, Mirko; BOGICEVIC, Dragana. Genetic and Epigenomic Modifiers of Diabetic Neuropathy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4887, 5 may 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094887>.

JENDE, Johann M. E.; GROENER, Jan B.; OIKONOMOU, Dimitrios; HEILAND, Sabine; KOPF, Stefan; PHAM, Mirko; NAWROTH, Peter; BENDSZUS, Martin; KURZ, Felix T.. Diabetic neuropathy differs between type 1 and type 2 diabetes: insights from magnetic resonance neurography. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 588-598, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.25182>.

JENSEN, V. F. H.; MØLCK, A.-M.; BØGH, I. B.; LYKKESFELDT, J. Effect of Insulin-Induced Hypoglycaemia on the Peripheral Nervous System: focus on adaptive mechanisms, pathogenesis and histopathological changes. **Journal Of Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 482-496, 22 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jne.12170>.

JIANBO, Li; YUCHE, Cheng; MING, Shi; JINGRONG, Tang; QING, Dai; YU, Zhang; JIAWEI, Chen; HONGXING, Wang. Association of homocysteine with peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Research And Clinical Practice**, [S.L.], v. 93, n. 1, p. 38-42, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.03.020>.

JIMÉNEZ-RAMÍREZ, F.J.; CASTRO, L.M.; ORTIZ, C.; CONCEPCIÓN, J.; RENTA, J.Y.; MORALES-BORGES, R.H.; MIRANDA-MASSARI, J.R.; DUCONGE, J. Role of treatment-modifying MTHFR677C>T and 1298A>C polymorphisms in metformin-treated Puerto Rican patients with type-2 diabetes mellitus and peripheral neuropathy. **Drug metabolism and personalized therapy**, v. 32, n. 1, p. 23–32, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2016-0039>.

JIN, Heung Yong; PARK, Tae Sun. Role of inflammatory biomarkers in diabetic peripheral neuropathy. **Journal Of Diabetes Investigation**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1016-1018, 22 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jdi.12794>.

KARL, Florian M.; WINKLER, Christiane; ZIEGLER, Anette-Gabriele; LAXY, Michael; ACHENBACH, Peter. Costs of Public Health Screening of Children for Presymptomatic Type 1 Diabetes in Bavaria, Germany. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 837-844, 14 fev. 2022. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc21-1648>.

KAKU, M.; VINIK, A.; SIMPSON, D.M. Pathways in the diagnosis and management of diabetic polyneuropathy. **Current Diabetes Reports**, v.15, n. 6, p.609, 2015. <http://dx.doi:10.1007/s11892-015-0609-2>.

KASZNICKI, Jacek; KOSMALSKI, Marcin; SLIWINSKA, Agnieszka; MROWICKA, Malgorzata; STANCZYK, Malgorzata; MAJSTEREK, Ireneusz; DRZEWOSKI, Jozef. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 8669-8678, 21 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1722-9>.

KAZEMI, A.M. Interleukin-4 gene polymorphisms in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 4, n. 4, p. 302-306, Oct. 2010. PMID: 20852371.

KHALIL, H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v.11, Supplement 1, p.133-139, 2017 <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2016.12.022>

KUNZ, J. Aktuelles zur diabetischen Makroangiopathie. **Der Pathologe**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 192-204, maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00292-011-1554-8>.

LI, Tsai-Chung; KARDIA, Sharon L.R.; LI, Chia-Ing; CHEN, Ching-Chu; LIU, Chiu-Shong; YANG, Sing-Yu; MUO, Chin-Shin; PEYSER, Patricia A.; LIN, Cheng-Chieh. Glycemic control paradox: poor glycemic control associated with higher one-year and eight-year risks of all-cause hospitalization but lower one-year risk of hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, [S.L.], v. 64, n. 9, p. 1013-1021, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.004>.

MAH, Jean K.; PACAUD, Danièle. Diabetic neuropathy in children. **Diabetes And The Nervous System**, [S.L.], p. 123-143, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00010-2>.

MAK, Tak W.; SAUNDERS, Mary E.. Cytokines and Cytokine Receptors. **The Immune Response**, [S.L.], p. 463-516, 2006. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012088451-3.50019-3>.

MANTOVANI, R.M.; PUÑALES, M.; CHEN, S.V.; GABBAY, M.A.L. Peculiaridades do tratamento da criança com DM1. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023. ISBN: 978-65-5941-622-6. Disponível em: <

<https://diretriz.diabetes.org.br/peculiaridades-do-tratamento-da-crianca-com-dm1/#citacao>>. Acesso em 8 de junho de 2023.

MARATHE, Payal H.; GAO, Helen X.; CLOSE, Kelly L.. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2017. **Journal Of Diabetes**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 320-324, 13 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1753-0407.12524>.

MCCORMICK, Sarah M.; HELLER, Nicola M.. Commentary: il-4 and il-13 receptors and signaling. **Cytokine**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 38-50, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.023>.

MEIJER, J W; VAN SONDEREN, E; BLAAUWWIEKEL, E e; SMIT, A J; GROOTHOFF, J W; EISMA, W H; LINKS, T P. Diabetic neuropathy examination: a hierarchical scoring system to diagnose distal polyneuropathy in diabetes.. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 750-753, 1 jun. 2000. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.23.6.750>.

MIESSE, A. M.; WILLEY, J. S.; BATEMAN, T. A. Potential role of proinflammatory cytokines in nerve damage related bone loss. **Biomedical sciences instrumentation**, v. 40, p. 266–271, 2004. PMID: 15133969.

MIRANDA-MASSARI, Jorge R.; GONZALEZ, Michael J.; JIMENEZ, Francisco J.; ALLENDE-VIGO, Myriam Z.; DUCONGE, Jorge. Metabolic Correction in the Management of Diabetic Peripheral Neuropathy: improving clinical results beyond symptom control. **Current Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 260-273, 1 nov. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157488411798375967>.

MOLINA, Mercedes; GONZALEZ, Ricardo; FOLGADO, José; REAL, José T.; MARTÍNEZ-HERVÁS, Sergio; PRIEGO, Antonia; LORENTE, Rosario; CHAVES, F. Javier; ASCASO, Juan F. Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína y la polineuropatía diabética evaluada con la prueba del monofilamento de Semmes-Weinstein en pacientes con diabetes tipo 2. **Medicina Clínica**, [S.L.], v. 141, n. 9, p. 382-386, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2012.09.042>.

MOLL, S.; VARGA, E.A. Varga. Homocysteine and MTHFR **Mutations**. **Circulation**, v. 132, n. 1, p. e6-e9, 2015. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311>.

MONNIER, Louis; MAS, Emilie; GINET, Christine; MICHEL, Françoise; VILLON, Laetitia; CRISTOL, Jean-Paul; COLETTE, Claude. Activation of Oxidative Stress by Acute Glucose Fluctuations Compared With Sustained Chronic Hyperglycemia in Patients With Type 2 Diabetes. **Jama**, [S.L.], v. 295, n. 14, p. 1681, 12 abr. 2006. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.14.1681>.

MONTI, Maria C.; LONSDALE, John T.; MONTOMOLI, Cristina; MONTROSS, Rebecca; SCHLAG, Erin; GREENBERG, David A.. Familial Risk Factors for Microvascular Complications and Differential Male-Female Risk in a Large Cohort of American Families with Type 1 Diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology &**

Metabolism, [S.L.], v. 92, n. 12, p. 4650-4655, 1 dez. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1185>.

MOREIRA, Rodrigo O.; CASTRO, Alessandra P.; PAPELBAUM, Marcelo; APPOLINÁRIO, José C.; ELLINGER, Vivian C.M.; COUTINHO, Waldir F.; ZAGURY, Leão. Tradução para o português e avaliação da confiabilidade de uma escala para diagnóstico da polineuropatia distal diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 49, n. 6, p. 944-950, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302005000600014>.

NEBUCHENNYKH, Maria; LØSETH, Sissel; LINDAL, Sigurd; MELLGREN, Svein Ivar. The value of skin biopsy with recording of intraepidermal nerve fiber density and quantitative sensory testing in the assessment of small fiber involvement in patients with different causes of polyneuropathy. **Journal Of Neurology**, [S.L.], v. 256, n. 7, p. 1067-1075, 1 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-009-5065-y>.

NEU, A.; BEYER, P.; BÜRGER-BÜSING, J.; DANNE, T.; ETSPÜLER, J.; HEIDTMANN, B.; HOLL, R.; KARGES, B.; KIESS, W.; KNERR, I.. Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter. **Diabetologie Und Stoffwechsel**, [S.L.], v. 8, n. 02, p. 189-199, 11 nov. 2013. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350564>.

NEUROLOGY, American Academy of. Consensus statement: Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. American Diabetes Association. **Diabetes care**, v. 11, n. 7, p. 592-597, 1998. <https://doi.org/10.2337/diacare.11.7.592>.

OGLE, G.D; WANG, F; GREGORY, G.A. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Atlas Reports. Type 1 diabetes estimate in children and adults. 2022. Disponível em: < <https://diabetesatlas.org/atlas/t1d-index-2022/>> Acesso em 24 de abril de 2022.

PEDROSA, H.C; NERY, E.S; SENA, F.V; NOVAES, C; FELDKIRCHER, T.C; DIAS, M.S.O; LEME, L.A.P; MIZIARA, M; ASSIS, M.A; KALUMA, C.O. O desafio do projeto Salvando o Pé Diabético. Terapêutica em Diabetes. **Boletim Médico do Centro B-D de Educação em Diabetes**, v. 4, n. 19, p. 1-10, 1998.

PETERSON, M.; PINGEL, R.; LAGALI, N.; DAHLIN, L. B.; ROLANDSSON, O.. Association between HbA1c and peripheral neuropathy in a 10-year follow-up study of people with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 1756-1764, 18 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/dme.13514>.

POLITI, Cristina; CICCACCI, Cinzia; D'AMATO, Cinzia; NOVELLI, Giuseppe; BORGIANI, Paola; SPALLONE, Vincenza. Recent advances in exploring the genetic susceptibility to diabetic neuropathy. **Diabetes Research And Clinical Practice**, [S.L.], v. 120, p. 198-208, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2016.08.006>.

POP-BUSUI, Rodica; BOULTON, Andrew J.M.; FELDMAN, Eva L.; BRIL, Vera; FREEMAN, Roy; MALIK, Rayaz A.; SOSENKO, Jay M.; ZIEGLER, Dan. Diabetic Neuropathy: a position statement by the american diabetes association. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 136-154, jan. 2017. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-2042>.

PRIMAVERA, M; GIANNINI, C; CHIARELLI, F. Prediction and Prevention of Type 1 Diabetes. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, n 248 p. 1-9, 2 jun. 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00248>.

REH, Christina M Southern; MITTELMAN, Steven D; WEE, Choo-Phei; SHAH, Avni C; KAUFMAN, Francine R; WOOD, Jamie R. A longitudinal assessment of lipids in youth with type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 12, n. 42, p. 365-371, 11 mar. 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00733.x>.

REIS, R.C.P.DOS, DUNCAN, B.B; MALTA, D.C; ISER, B.P.M; SCHMIDT, M.I. Evolution of diabetes in Brazil: prevalence data from the 2013 and 2019 Brazilian National Health Survey. **Cadernos de Saúde Pública**, v.38, p. e00149321, 6 May 2022. <http://dx.doi:10.1590/0102-311X00149321>

REIS, R.C.P.DOS, DUNCAN, B.B; MALTA, D.C; ISER, B.P.M; SCHMIDT, M.I. Evolution of diabetes in Brazil: prevalence data from the 2013 and 2019 Brazilian National Health Survey. **Cadernos de Saúde Pública**, v.38, p. e00149321, 6 May 2022. <http://dx.doi:10.1590/0102-311X00149321>

Resolução n 466 de 12 de dezembro de 2012: diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília (DF): MS; 2012. Brasil. Disponível em: < <https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>> Acesso em 15 de janeiro de 2017.

RODACKI M.; TELES, M.; GABBAY, M.; MONTENEGRO, R.; BERTOLUCI, M. Classificação do diabetes. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022. <https://doi.org/10.29327/557753.2022-1>.

RUSSO, G. T.; GIANDALIA, A.; ROMEO, E. L.; SCARCELLA, C.; GAMBADORO, N.; ZINGALE, R.; FORTE, F.; PERDICHIZZI, G.; ALIBRANDI, A.; CUCINOTTA, D.. Diabetic neuropathy is not associated with homocysteine, folate, vitamin B12 levels, and MTHFR C677T mutation in type 2 diabetic outpatients taking metformin. **Journal Of Endocrinological Investigation**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 305-314, 2 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40618-015-0365-9>.

SCHLÜSSEL, Elke; PREIBISCH, Gudrun; PIITTER, S.; ELSTNER, E. F.. Homocysteine-Induced Oxidative Damage: mechanisms and possible roles in neurodegenerative and atherogenic processes. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [S.L.], v. 50, n. 9-10, p. 699-707, 1 out. 1995. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-1995-9-1017>.

SETTIN, Ahmad; EL-BAZ, Rizk; ISMAEEL, Azza; TOLBA, Wafaa; A ALLAH, Wafaa. Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus:

susceptibility and complications. **Journal Of The Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 838-843, 22 jan. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1177/1470320313516172>.

SHEN, Z; JIANG, H; HUANG, R; ZHOU, Y; LI, Q; MA J. Association of glycemic variability and hypoglycemia with distal symmetrical polyneuropathy in adults with type 1 diabetes. **Scientific reports**, v.11, n.1, p. 22875, 24 nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-02258-3>.

SILLER, Alejandro F.; TOSUR, Mustafa; RELAN, Shilpi; ASTUDILLO, Marcela; MCKAY, Siripoom; DABELEA, Dana; REDONDO, Maria J.. Challenges in the diagnosis of diabetes type in pediatrics. **Pediatric Diabetes**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 1064-1073, 23 jul. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/pedi.13070>.

SNAHNICANOVA, Zuzana; MENDELOVA, Andrea; GRENDAR, Marian; HOLUBEKOVA, Veronika; KOSTKOVA, Martina; POZORCIAKOVA, Katarina; JANCINOVA, Maria; KASUBOVA, Ivana; VOJTKOVA, Jarmila; DURDIK, Peter. Association of Polymorphisms inCYBA,SOD1, andCATGenes with Type 1 Diabetes and Diabetic Peripheral Neuropathy in Children and Adolescents. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 413-419, jul. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/gtmb.2018.0018>.

SOBTI, R. C.; MAITHIL, Nishi; THAKUR, Hitender; SHARMA, Yashpaul; TALWAR, K. K.. VEGF and *IL-4* gene variability and its association with the risk of coronary heart disease in north Indian population. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 341, n. 1-2, p. 139-148, 4 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0445-2>.

SOUZA, Ary; NERY, Caio Augusto de Souza; MARCIANO, Lúcia Helena Soares Camargo; GARBINO, José Antonio. Avaliação da neuropatia periférica: correlação entre a sensibilidade cutânea dos pés, achados clínicos e eletroneuromiográficos. **Acta Fisiátrica**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 87-93, 9 dez. 2005. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2317-0190.v12i3a102530>.

STEVENS, Martin; SHAKHER, Jayadave. Update on the management of diabetic polyneuropathies. **Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity: Targets and Therapy**, [S.L.], p. 289, jul. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dmso.s11324>.

STROJEK, K. Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. **Acta diabetologica**, v. 40 Supplement 2, p. 334–337, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00592-003-0115-x>.

STROKOV, I. A.; BURSA, T. R.; DREPA, O. I.; ZOTOVA, E. V.; NOSIKOV, V. V.; AMETOV, A. S.. Predisposing genetic factors for diabetic polyneuropathy in patients with type 1 diabetes: a population-based case-control study. **Acta Diabetologica**, [S.L.], v. 40, p. 375-379, 1 dez. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-003-0123-x>.

SVENSSON, J.; IBFELT, E. H.; CARSTENSEN, B.; NEU, A.; CINEK, O.; SKRIVARHAUG, T.; RAMI-MERHAR, B.; FELTBOWER, R. G.; CASTELL, C.; KONRAD, D.; GILLESPIE, K.; JAROSZ-CHOBOT, P.; MARČIULIONYTĖ, D.; ROSENBAUER, J.; BRATINA, N.; IONESCU-TIRGOVISTE, C.; GORUS, F.; KOCOVA, M.; de BEAUFORT, C.; PATTERSON, C. C. Age-period-cohort modelling of type 1 diabetes incidence rates among children included in the EURODIAB 25-year follow-up study. **Acta diabetologica**, v. 60 n.1, p. 73–82, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00592-022-01977-x>

TESFAYE, Solomon; BOULTON, Andrew J.M.; DYCK, Peter J.; FREEMAN, Roy; HOROWITZ, Michael; KEMPLER, Peter; LAURIA, Giuseppe; MALIK, Rayaz A.; SPALLONE, Vincenza; VINIK, Aaron. Diabetic Neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 2285-2293, 1 out. 2010. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc10-1303>.

TESFAYE, Solomon; SELVARAJAH, Dinesh. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**, [S.L.], v. 28, p. 8-14, 23 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2239>.

TOMMERDAHL, Kalie L.; SHAPIRO, Allison L. B.; NEHUS, Edward J.; BJORNSTAD, Petter. Early microvascular complications in type 1 and type 2 diabetes: recent developments and updates. **Pediatric Nephrology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 79-93, 14 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-021-05050-7>.

TONG, Y.-Q.; YE, J.-J.; WANG, Z.-H.; ZHANG, Y.-W.; ZHAN, F.-X.; GUAN, X.-H.; GENG, Y.-J.; HOU, S.-Y.; LI, Y.; CHENG, J.-Q.. Association of variable number of tandem repeat polymorphism in the *IL-4* gene with ischemic stroke in the Chinese Uyghur population. **Genetics And Molecular Research**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 2423-2431, 2013. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.may.13.2>.

VACCARO, O; PERNA, A; MANCINI, F. Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 10, p.297-304, 2000. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/11302003>>. Acesso em 27 de abril de 2023.

VACCARO, O; PERNA, A; MANCINI, F. Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 10, p.297-304, 2000. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/11302003>>. Acesso em 27 de abril de 2023.

VINCENT, Andrea M.; RUSSELL, James W.; LOW, Phillip; FELDMAN, Eva L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 612-628, 1 ago. 2004. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0019>.

VINIK, Aaron I.; NEVORET, Marie-Laure; CASELLINI, Carolina; PARSON, Henri. Diabetic Neuropathy. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 747-787, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2013.06.001>.

VINIK, Aaron I.; SUWANWALAIKORN, Sompongse; STANSBERRY, Kevin B.; HOLLAND, Marie T.; MCNITT, Patricia M.; COLEN, Lawrence E.. Quantitative measurement of cutaneous perception in diabetic neuropathy. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 574-584, jun. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880180603>.

VINIK, Aaron I.; SUWANWALAIKORN, Sompongse; STANSBERRY, Kevin B.; HOLLAND, Marie T.; MCNITT, Patricia M.; COLEN, Lawrence E.. Quantitative measurement of cutaneous perception in diabetic neuropathy. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 574-584, jun. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880180603>.

VINIK, Aaron; ULLAL, Jagdeesh; PARSON, Henri K; CASELLINI, Carolina M. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 269-281, maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0142>.

WANG, Haidong; ABAJOBIR, Amanuel Alemu; ABATE, Kalkidan Hassen; ABBAFATI, Cristiana; ABBAS, Kaja M; ABD-ALLAH, Foad; ABERA, Semaw Ferede; ABRAHA, Haftom Niguse; ABU-RADDAD, Laith J; ABU-RMEILEH, Niveen M e. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. **The Lancet**, [S.L.], v. 390, n. 10100, p. 1084-1150, set. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31833-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31833-0).

WEI, Juechun; WEI, Yanling; HUANG, Meiyang; WANG, Peng; JIA, Shushan. Is metformin a possible treatment for diabetic neuropathy? **Journal Of Diabetes**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 658-669, 18 set. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1753-0407.13310>.

WEISMAN, Alanna; BRIL, Vera; NGO, Mylan; LOVBLOM, Leif E.; HALPERN, Elise M.; ORSZAG, Andrej; PERKINS, Bruce A.. Identification and Prediction of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy Using Individual and Simple Combinations of Nerve Conduction Study Parameters. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 58783, 22 mar. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058783>.

WHITE, Neil H.; SUN, Wanjie; CLEARLY, Patricia A.; TAMBORLANE, William V.; DANIS, Ronald P.; HAINSWORTH, Dean P.; DAVIS, Matthew D.. Effect of Prior Intensive Therapy in Type 1 Diabetes on 10-Year Progression of Retinopathy in the DCCT/EDIC: comparison of adults and adolescents. **Diabetes**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 1244-1253, 11 fev. 2010. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1216>.

WITZEL, I.I.; JELINEK, H.F.; KHALAF, K.; LEE, S.; KHANDOKER, A.H.; ALSAFAR, H. Identifying Common Genetic Risk Factors of Diabetic Neuropathies. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 6, n. 88, 28 May, 2015. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00088>.

WU, Shuai; HAN, Yan; HU, Qiang; ZHANG, Xiaojie; CUI, Guangcheng; LI, Zezhi; GUAN, Yangtai. Effects of Common Polymorphisms in the MTHFR and ACE Genes on Diabetic Peripheral Neuropathy Progression: a meta-analysis. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 2435-2444, 12 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9823-4>.

XIONG, X.F.; WEI, L.; XIAO, Y.; HAN, Y.C.; YANG, J.; ZHAO, H.; YANG, M.; SUN, L. Family history of diabetes is associated with diabetic foot complications in type 2 diabetes. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 13 oct. 2020. <http://doi.org10.1038/s41598-020-74071-3>.

YI, Lian; SWENSEN, Adam C.; QIAN, Wei-Jun. Serum biomarkers for diagnosis and prediction of type 1 diabetes. **Translational Research**, [S.L.], v. 201, p. 13-25, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.009>.

YIGIT, S.; KARAKUS, N.; INANIR, A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. **Molecular Vision**, v.19, p. 1626-30, 25 jul. 2013. PMID: PMC3724957.

ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B.. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 88-98, 8 dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>.

ZIEGLER, D.; CICMIR, I.; MAYER, P.; WIEFELS, K.; GRIES, F.A. Somatic and autonomic nerve function during the first year after diagnosis of type 1 (insulin-dependent) diabetes. **Diabetes Research**, v. 7, n. 3, p. 123-127, mar, 1998. PMID: 3046819.

ZIEGLER, D.. Diabetic polyneuropathy. **Der Internist**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 243-253, 21 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00108-020-00770-8>.

ZIEGLER, Dan; TESFAYE, Solomon; SPALLONE, Vincenza; GURIEVA, Irina; KAABI, Juma Al; MANKOVSKY, Boris; MARTINKA, Emil; RADULIAN, Gabriela; NGUYEN, Khue Thy; STIRBAN, Alin O. Screening, diagnosis and management of diabetic sensorimotor polyneuropathy in clinical practice: international expert consensus recommendations. **Diabetes Research And Clinical Practice**, [S.L.], v. 186, p. 109063, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109063>.

APÊNDICE 1 – Ficha de Avaliação

AVALIAÇÃO DE NEUROPATIA DIABÉTICA

I – IDENTIFICAÇÃO	
Ficha nº __ __ __ Prontuário nº __ __ __ __ __ __ __ Data : __ __ / __ __ / __ __ Entrevistador _____ Idade: _____ Sexo: __ Bairro: _____	Escolaridade: Sem escolaridade __ alfabetizado __ de 2 a 5 anos estudados __ de 6 a 9 anos __ de 10 a 13 anos __ Renda familiar: __ < 1 salário mínimo; __ 1 salário mínimo até 2 salários; __ > 2 salários até 3 salários; __ > 3 salários até 4 salários; __ > 4 salário até 5 salários; __ > 5 até 6 salários; __ > 6 salários até 7 salários; __ > 7 salários até 8 salários; __ > 9 salários até 10 salários; __ > 10 salários mínimos.
II – INVESTIGAÇÃO CLÍNICA	
2.1. Tipo de diabetes mellitus 1 - DMI	__
2.2. Tempo de diagnóstico em anos	__
2.3. História Familiar de Diabetes	__ pai __ mãe __ irmão (ã) __ tios (as) __ primos (as) __ avôs (ós) __ bisavôs (ós)
2.4. Hipoglicemia interconsulta (1- sintomático; 2- assintomático)	__
2.5. Hipoglicemia grave no último ano (1- sim; 2- não)	__
2.6. Cetoacidose no último ano (1- sim; 2- não)	__
2.7. Poliúria (1- sim; 2- não)	__
2.8. Polidipsia (1- sim; 2- não)	__
2.9. Polifagia inter consulta (1- sim; 2- não)	__
2.10. Emagrecimento interconsulta (1- sim; 2- não)	__
2.11. Nefropatia (1- sim; 2- não)	__
2.12. Retinopatia (1- sim; 2- não)	__
2.13. Úlcera previa (1- sim; 2- não)	__
2.14. Úlcera atual (1- sim; 2- não)	__
2.15. Calorias na alimentação (quantidade)	_____ cal
2.16. Doenças Associadas ao Diabetes	_____ _____
2.17. Tipo de alimentação (1- quantidade; 2- contagem)	__
2.18. Atividade física (1- orientada; 2- não orientada; 3- sem atividade)	__
2.19. Peso (dia da avaliação)	_____ Kg
2.20. Altura (dia da avaliação)	_____ cm
2.21. IMC (dia da avaliação)	_____
2.22. Conservação da insulina (1 – satisfatória; 2 – não satisfatória)	__
2.23. Pressão arterial sistêmica (mais próxima da avaliação)	_____ x _____ mmHg
Uso de Insulina	
2.24. Usa aparelho de Bomba de Insulina (1 – sim; 2 – não)	__
2.25. Qual a insulina que está usando no momento (1 – NPH; 2 – Glargina; 3 – Detemir; 4 – Outra)	__ Outra: _____
2.26. Dose da insulina lenta que está usando no momento	A. Dose U/dia _____ B. Dose U/kg _____
2.27. Número de aplicações por dia da insulina lenta que está usando no momento (1 – uma vez; 2 – duas vezes; 3- três vezes; 4 – quatro vezes; 5 - não sabe; 6 – sistema de infusão contínua)	__
2.28. Faz uso no momento de insulina de ação rápida (1 - Sim, regularmente; 2- Sim, mas irregularmente (quando tenho); 3- Não uso; 4- Não sabe)	__
2.29. Qual a insulina de ação rápida que está usando no momento (1 – Regular; 2 – Lispro; 3 – Aspart; 4 – Outra)	__ Outra: _____
2.30. Dose de insulina de ação rápida que está usando no momento (exemplo ontem)	A. Dose U/dia _____ B. Dose U/kg _____
2.31. Número de aplicações por dia de insulina de ação rápida que está usando no momento (1 – uma vez; 2 – duas vezes; 3- três vezes; 4 – quatro vezes; 5 - não sabe)	__

2.32. Faz automonitorização da glicemia em casa no momento. Se não, pular para o item 2.32. (1 – sim; 2 – não)	_	
2.33. Número de medições da glicemia por dia (Colocar o número de medições por dia)	_	
2.34. Hemoglobina Glicada	1° _ _ / _ _ / _ _ 3° _ _	
	2° _ _ / _ _ / _ _ 4° _ _	
2.34. Lipidograma	Colesterol total _ _ LDL colesterol _ _ HDL colesterol _ _ Triglicerídeos _ _	
2.35. Albuminúria	_ _	
2.36. Classificação de Tanner	_ I _ II _ III _ IV _ V	
2.37. Polimorfismo do gene VEGF (1 – sim; 2 – não)	_	
Neuropatia Diabética		
Perda da sensibilidade protetora (1 – sim; 2 – Não)	D1 _ D2 _ D3 _ D4 _ E1 _ E2 _ E3 _ E4 _	
Sinal da prece (1 – positivo; 2 – negativo)	_	
Teste de Aquiescência (1 – Alterado; 2 – Normal)	_	
Escore de Sintomas Sensoriais Você tem experimentado dor ou desconforto nas pernas?	() Se NÃO, interromper a avaliação () Se SIM, continuar a avaliação	
Que tipo de sensação mais te incomoda? (Descrever os sintomas se o paciente não citar nenhum destes)	() Queimação, dormência ou formigamento. () Fadiga, câimbras ou prurido	2 pts 1 pts
Qual a localização mais frequente desse (a)? (sintoma descrito)	() Pés () Panturrilha () Outra localização	2 pts 1 pt 0 pt
Existe alguma hora do dia em que este (a) (sintoma descrito) aumenta a intensidade?	() Durante a noite () Durante o dia e a noite () Apenas durante o dia	2 pts 1 pt 0 pt
Este (a) (sintoma descrito) já o (a) acordou durante a noite?	() Sim () Não	1 pt 0 pt
Alguma manobra que você realiza é capaz de diminuir este (a) (sintoma descrito)? (Descrever as manobras para o paciente se ele não citar nenhuma delas)	() Andar () Ficar de pé () Sentar ou deitar	2 pts 1 pt 0 pt
Classificação: Leve/ Moderado/Grave. Um escore de 3-4 implica em sintoma leve. 5-6 sintomas moderados e 7-9 sintomas graves.	Escore Total	
Sinais negativos (1 – sim; 2 – não)	Formigamento _ Dormência _	
Sinais positivos (Dor) (1 – sim; 2 – não)	Queimação _ Pontada _ Choque _ Agulhada _ Punhalada _ Outra _	
Sensibilidade Térmica (1 – Alterado ou ausente; 2 – Normal)	Pé direito - Água fria _ Pé direito - Água quente _ Pé esquerdo – Água fria _ Pé esquerdo – Água quente _	
Escore de Força Muscular - Somente a perna e o pé direito são testados - Escore entre 0-2 onde; 0= Normal 1= Debilidade Suave/Moderada: Força muscular: MRC 3-4 Reflexo: pouco, mas presente. Sensação: pouca, mas presente. 2= Gravemente interrompido/Ausente: Força muscular: MRC 0-2 Reflexo: ausente Sensação: ausente - Escore máximo: 16 pontos	3.8.1 - quadríceps femural: Extensão de Joelho _ 3.8.2 - tibial anterior: dorsiflexão _ Reflexo 3.8.3 - tríceps sural _ Sensibilidade do segundo dedo 3.8.4 - sensibilidade à picada de agulha _ Sensibilidade do Hálux 3.8.5 - sensibilidade à picada de agulha _ 3.8.6 - sensibilidade ao toque _ 3.8.7 - percepção de vibração _ 3.8.8 – percepção articular _ EFM _	
Polimorfismos IL4 criança	_ A1A1 _ A1A2 _ A2A2	
Polimorfismos MTHPR criança	_ CC _ CT _ TT	

ECN	VCND _____ VCNE _____ AmpliD _____ AmpliE _____
Observações: _____ _____ _____ _____ _____	

APÊNDICE 2 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis de crianças e adolescentes com diabetes mellitus

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Protocolo nº 60302816.7.0000.5264 Versão 3

(de acordo com as Normas da Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde de 12 de dezembro de 2012).

Número do Centro: _____ Número do estudo: 1.910.920

Seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa, cujo tema é “Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em uma coorte de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1”. O objetivo do estudo é estimar a prevalência de neuropatia diabética e investigar a associação de polimorfismos com a neuropatia, em crianças com diabetes, além de atuar com educação em saúde para diminuir o impacto desta doença no ambulatório de diabetes. Portanto, sua colaboração é importante para a pesquisa em saúde.

A neuropatia é uma lesão nos nervos, normalmente nas pernas e frequente em diabéticos, que causa dor e dificuldade para andar. Seu filho (a) será examinado pelos pesquisadores. A participação no estudo consiste em responder a um questionário, ter pernas, pés, força e sensibilidade como fatores avaliados no dia da consulta regular. Também será feita pesquisa no prontuário médico para coleta de informações relacionadas ao diabetes. Caso seja diagnosticada a neuropatia, daremos toda informação necessária quanto aos cuidados. Coletaremos amostra de saliva para análise de DNA, com o objetivo de verificar a presença de genes relacionados à inflamação dos nervos (VEGF e RAAS). A coleta é gratuita e colhida no IPPMG e poderá ser obtida a partir de bochechamento de um pequeno volume de água com açúcar. Todo material coletado será encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular Humana do UERJ e após a análise o material coletado será descartado. Uma vez que seu filho (a) apresente um destes genes, isso não implica, necessariamente, no desenvolvimento da lesão nervosa. Se futuramente as pesquisas confirmarem que este gene está envolvido no desenvolvimento da lesão nervosa, ainda assim ele não será o fator mais importante. Hoje, o controle glicêmico é o fator mais importante para prevenir a neuropatia. Se seu filho (a) ou o (a) Sr (a) quiser solicitar acompanhamento psicológico após o resultado do exame é só solicitar a um pesquisador. O(A) Senhor(a) terá acesso aos resultados de todas as avaliações e dos exames que seu (sua) filho(a) realizar. As informações obtidas, através dessa pesquisa, serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados serão divulgados de forma a não possibilitar a sua identificação. Os resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins científicos ou educativos.

A participação do seu filho (a) não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores e nem com qualquer setor deste hospital.

Participar desta pesquisa **não** implicará nenhum custo para você, e, como voluntário, você também não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação.

Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ), formado por um grupo que se reúne para avaliar os projetos e assegurar que os mesmos não tragam nenhum dano aos participantes da pesquisa. Esta pesquisa recebeu parecer favorável do CEP na reunião realizada em 07/02/17. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP localizado na R. Bruno Lobo, n.º 50 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - 3º andar – CEP: 21941-912 ou pelo telefone 2590-3842, de segunda a sexta-feira, das 9 às 15 horas.

Os pesquisadores estarão à disposição para qualquer esclarecimento sobre o estudo no ambulatório de diabetes do IPPMG (3º, 5º e 6º feira das 8 às 16 horas) ou pelos contatos anexados no final deste TCLE.

Eu, _____, responsável pelo menor _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o(a) pesquisador(a), sobre a minha decisão em aceitar que meu filho (a) participe deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com os pesquisadores desta pesquisa. Deverei guardar uma cópia deste TCLE para meu próprio registro. Dou minha permissão a essas pessoas para que tenham acesso a meus registros.

Além disso, estou ciente de que eu (representante legal do menor) e o(a) pesquisador(a) deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Data ____/____/____ _____

Responsável legal pelo participante da pesquisa

Nome do pesquisador

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Pesquisadores:

Jorge Luiz Luescher (21) 99661-5537 / luescher@hotmail.com

Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (21) 99917-8069 / lunarc1@hotmail.com

Raquel Garcia Rocco da Silva – (21) 99196-0123 / raquel.rocco@ifrj.edu.br

Márcia Gonçalves Ribeiro – (21) 2590-4891/ marciargen@yahoo.com.br

Marcelo Costa Lima (21) – 2334-0309 / marceloacostalima@gmail.com

Cláudia de Melo Moura (21) 2334-0309 / clauemeloura@yahoo.com.br

APÊNDICE 3 - Termo de assentimento para crianças e adolescentes com diabetes mellitus

Termo de Assentimento

Protocolo nº 60302816.7.0000.5264 Versão 3

(de acordo com as Normas da Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde de 12 de dezembro de 2012).

Número do Centro: _____ Número do estudo: 1.910.920

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa chamada "Associação entre polimorfismos genéticos, variáveis clínicas e sociodemográficas com diagnóstico de provável polineuropatia simétrica distal em uma coorte de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1". Antes de decidir se quer participar, é importante que você entenda porque o estudo está sendo feito e o que ele envolverá. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você participar da pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte da pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem. Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado(a) ou preocupado(a). Nesse caso, por favor, peça que pare a qualquer momento e eu explicarei. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não participar deste estudo.

O objetivo do estudo é estimar a prevalência de neuropatia diabética e investigar a associação de polimorfismos com a neuropatia, em crianças com diabetes, além de atuar com educação em saúde para diminuir o impacto desta doença no ambulatório de diabetes. Portanto, a sua colaboração é importante para a pesquisa em saúde.

A neuropatia é uma lesão nos nervos, normalmente nas pernas e frequente em diabéticos, que causa dor e dificuldade para andar. Você será examinado pelos pesquisadores. A participação no estudo consiste em responder a um questionário, ter pernas, pés, força e sensibilidade avaliadas no dia da consulta regular. Também será feita pesquisa no prontuário médico para a coleta de informações relacionadas ao diabetes. Caso seja diagnosticada neuropatia, daremos toda informação necessária quanto aos cuidados. Coletaremos amostra de saliva para análise de DNA com o objetivo de verificar a presença de genes relacionados à inflamação dos nervos (VEGF e RAAS). A coleta é gratuita e colhida no IPPMG e poderá ser obtida a partir de bochechamento de um pequeno volume de água com açúcar. Todo material coletado será encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular Humana do UERJ e após a análise o material coletado será descartado. Uma vez você apresentando um destes genes não implica, necessariamente, no desenvolvimento da lesão nervosa. Se futuramente as pesquisas confirmarem que este gene está envolvido no desenvolvimento da lesão nervosa, ainda assim ele não será o fator mais importante. Hoje, o controle glicêmico é o fator mais importante para prevenir a neuropatia. Se você quiser solicitar acompanhamento psicológico após o resultado do exame é só solicitar a um pesquisador. Você terá acesso aos resultados de todas as avaliações e de todos os exames que fizer. As informações obtidas, através dessa pesquisa, serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Os resultados serão divulgados em apresentações ou publicações com fins científicos ou educativos.

Participar desta pesquisa **não** implicará em nenhum custo para seus pais, e, como voluntário, você ou seus pais ou responsáveis não receberão qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação. Você é quem decide se quer participar ou não deste estudo. Se decidir participar, você receberá esta folha de informações para guardar e deverá assinar

um termo de consentimento. Você não tem que estar nesta pesquisa. Ninguém estará furioso ou desapontado com você disser não, a escolha é sua. Você pode pensar nisso e falar depois se quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem. Isto não afetará os cuidados que você recebe.

Este estudo foi revisado pelo seguinte Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ), formado por um grupo que se reúne para avaliar os projetos e assegurar que os mesmos não tragam nenhum dano aos participantes da pesquisa. Esta pesquisa recebeu parecer favorável do CEP na reunião realizada em 07/02/17. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP localizado na R. Bruno Lobo, n.º 50 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - 3º andar – CEP: 21941-912 ou pelo telefone 2590-3842, de segunda a sexta-feira, das 9 às 15 horas.

Os pesquisadores estarão à disposição para qualquer esclarecimento sobre o estudo no ambulatório de diabetes do IPPMG (3º, 5º e 6º feira das 8 às 16 horas) ou pelos contatos anexados no final deste Termo de Assentimento (TA).

Eu, _____, entendi os objetivos da pesquisa e fui suficientemente informado a respeito do estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o(a) pesquisador(a), sobre a minha decisão em aceitar participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de sigilo e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação não tem custos financeiros e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse TA e a outra ficará com os pesquisadores desta pesquisa. Deverei guardar uma cópia deste TA para meu próprio registro. Dou minha permissão a essas pessoas para que tenham acesso a meus registros.

Além disso, sei que eu e o(a) pesquisador(a) deveremos rubricar todas as folhas desse TA e assinar na última folha.

Data ____/____/____

Assinatura da criança/adolescente

Nome do responsável legal

Responsável legal pelo participante da pesquisa

Nome do pesquisador

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Pesquisadores:

Jorge Luiz Luescher (21) 99661-5537 / luescher@hotmail.com

Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (21) 99917-8069 / lunarc1@hotmail.com

Raquel Garcia Rocco da Silva – (21) 99196-0123 / raquel.rocco@ifrj.edu.br

Márcia Gonçalves Ribeiro – (21) 2590-4891/ marciargen@yahoo.com.br

Marcelo Costa Lima (21) – 2334-0309 / marceloacostalima@gmail.com

Cláudia de Melo Moura (21) 2334-0309 / claumeloura@yahoo.com.br

APÊNDICE 4 – Resumo submetido ao 18º Congresso Nacional de Pediatria em Portugal

HISTÓRIA FAMILIAR DE DIABETES E RISCO DE NEUROPATIA SENSORIAL

Autores: Márcia Gonçalves Ribeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Raquel Garcia Rocco da Silva (Instituto Federal do Rio de Janeiro); Marcelo A. Costa Lima (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Eduardo Jorge Rosa Damaso (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Jorge Luiz Luescher (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Claudia de Melo Moura (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

INTRODUÇÃO: Fatores familiares podem aumentar a susceptibilidade a complicações em pessoas com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), como o risco de neuropatia. **OBJETIVO:** Analisar a história familiar (HF) e variáveis clínicas *versus* a neuropatia sensorial (NS). **MÉTODOS:** Estudo seccional com 167 crianças/adolescentes com DM1 acompanhados na UFRJ, de março a julho/2017. Uso do Escore de Sintomas Neuropáticos (NSS) para diagnosticar a neuropatia sensorial (NS) e a análise de variância para comparar as médias. A significância estatística foi avaliada com o teste quiquadrado para proporções e Kruskal Wallis para médias. Os dados foram analisados através do pacote estatístico EPI-Info. **RESULTADOS:** A NS foi prevalente em 42,5% da população de estudo e associada ao sexo feminino (OR=2,4; p=0,00). Em relação à HF materna, ter uma mãe (OR=9,25; p=0,02), bisavó (OR=3,01; p=0,00) e tios (OR=3,68; p=0,01) com diabetes tipo 1 ou 2 aumentam o risco de NS. Ter tios paternos com diabetes aumenta o risco em 5,43 vezes de ter NS (p=0,00). As médias da hemoglobina glicada foram maiores na população com NS (p=0,01). A dislipidemia também se mostrou associada à NS (p<0,01). Peso, altura e idade não apresentaram associação com NS. A câimbra (37,3%) e o formigamento (31,7%) foram os sintomas mais frequentes. **CONCLUSÃO:** Os sintomas neuropáticos podem ser percebidos desde os estágios iniciais da lesão nervosa, o que permite o uso da NSS na população pediátrica no diagnóstico da NS. O controle glicêmico e a duração do diabetes são considerados fatores importantes para o desenvolvimento da neuropatia, todavia, observa-se que a velocidade de progressão dos danos no tecido nervoso apresenta diferenças individuais possivelmente relacionados à HF e epigenética.

APÊNDICE 5 – Resumo submetido ao 18º Congresso Nacional de Pediatria em Portugal

VARIÁVEIS CLÍNICAS ASSOCIADAS À POLINEUROPATIA SIMÉTRICA DISTAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DIABÉTICAS

Autores: Márcia Gonçalves Ribeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Raquel Garcia Rocco da Silva (Instituto Federal do Rio de Janeiro); Marcelo A. Costa Lima (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Eduardo Jorge Rosa Damaso (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Jorge Luiz Luescher (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Claudia de Melo Moura (Universidade Estadual do Rio de Janeiro).

INTRODUÇÃO: A polineuropatia simétrica distal (PSD) é uma complicação importante e contribui para a morbidade no diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e o início na infância determina maior exposição aos distúrbios metabólicos, quando comparado ao adulto.

OBJETIVO: Analisar a associação entre variáveis clínicas e a PSD. **METODOLOGIA:** Estudo seccional com 167 crianças e adolescentes com DM1, de março a julho/2017. Foi utilizado questionário estruturado com informações clínicas e dois protocolos de avaliação da neuropatia diabética: Escore de Sintomas Neuropáticos e *Diabetic Neuropathy Examination*. Análise de variância para comparar médias. Significância estatística avaliada pelo teste quiquadrado para proporções e Kruskal Wallis para médias. Dados analisados através do pacote estatístico EPI-Info. **RESULTADOS:** A PSD foi prevalente em 46,2% e associada à hipoglicemia grave (OR=3,19; p=0,00) e cetoacidose (OR=8,09; p=0,00) no último ano. O risco de ter PSD foi maior na presença de emagrecimento (OR=2,74; p=0,03), polidipsia (OR=2,03; p=0,04), poliúria (OR=2,13; p=0,01) e polifagia (OR=4,80; P=0,01) entre consultas. Não houve associação com peso, altura, idade e índice de massa corporal mesmo depois de ajustado por gênero. A hemoglobina glicada apresentou médias maiores nos participantes com PSD (p=0,00) e o tempo de diagnóstico do DM1 foi associado à PSD após o ajuste por gênero (p=0,03). A albuminúria foi maior nos participantes com PSD, sem significância estatística. **CONCLUSÃO:** A identificação de variáveis clínicas associadas ao maior risco para PSD podem ajudar na identificação de indivíduos suscetíveis e permitir a implementação de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes na redução de seu desenvolvimento e/ou progressão.

APÊNDICE 6 – Resumo apresentado no XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica

VARIÁVEIS CLÍNICAS E *MTHFR* ASSOCIADAS À NEUROPATIA DIABÉTICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Autores: Marcelo A. Costa Lima (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Márcia Gonçalves Ribeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Raquel Garcia Rocco da Silva (Instituto Federal do Rio de Janeiro); Claudia de Melo Moura (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Jorge Luiz Luescher (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Eduardo Jorge Rosa Damaso (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

INTRODUÇÃO: A neuropatia diabética (ND) é uma complicação importante e contribui para a morbidade no diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e o início na infância determina maior exposição aos distúrbios metabólicos, quando comparado ao adulto. Diversos estudos sugerem o envolvimento de fatores genéticos na ND, associando uma provável relação entre polimorfismo de nucleotídeos únicos em vários genes, incluindo a *MTHFR*. A enzima *MTHFR* é responsável pela remetilação da homocisteína à metionina e sua atividade reduzida pode levar à hiperhomocisteinemia. **OBJETIVOS:** Investigar o papel do polimorfismo 677 C>T do gene *MTHFR* na ocorrência de ND e analisar a associação entre variáveis clínicas e a ND. **METODOLOGIA:** Estudo seccional com 198 crianças e adolescentes com DM1. Foi utilizado questionário com informações clínicas e dois protocolos de avaliação da neuropatia diabética: Escore de Sintomas Neuropáticos e *Diabetic Neuropathy Examination*. Amostras de DNA foram genotipadas através de PCR-RFLP (222 controles). Análise de variância para comparar médias. Significância estatística avaliada pelo teste quiquadrado para proporções e Kruskal Wallis para médias. **RESULTADOS:** A ND foi prevalente em 11,3% da população e esteve associada com idade, tempo de diagnóstico, hemoglobina glicada, peso, dislipidemia e poliúria. Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre ND e hipoglicemia ($p=0,49$), hipoglicemia grave ($p=0,11$), cetoacidose ($p=0,55$), polidipsia ($p=0,59$), polifagia ($p=0,08$) e emagrecimento ($p=0,41$). Também não encontramos associações de ND com sedentarismo ($p=0,45$). A neuropatia puramente sensorial foi prevalente em 40% da população e associada ao sexo feminino (OR= 1,91; p valor=0,01). A câimbra (35%) e o formigamento (31%) foram os sintomas mais frequentes. Não foi observada associação do polimorfismo 677 C>T com a ocorrência de ND na amostra analisada (OR 0,87; IC 95% 0,60-1,27/ $P = 0,52$). **CONCLUSÃO:** A identificação de variáveis clínicas associadas ao maior risco para ND podem ajudar na identificação de indivíduos suscetíveis e permitir a implementação de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes na redução de seu desenvolvimento e/ou progressão.

APÊNDICE 7 – Resumo apresentado no III Congresso de Neurogenética 2021

POLIMORFISMOS NO GENE INTERLEUCINA 4 ASSOCIADOS A NEUROPATIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIABETES TIPO 1

Raquel Garcia Rocco da Silva (Instituto Federal do Rio de Janeiro); Márcia Gonçalves Ribeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Marcelo A. Costa Lima (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Claudia de Melo Moura (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Jorge Luiz Luescher (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Introdução: Embora a neuropatia diabética (ND) apresente a hiperglicemia como seu principal fator de risco, fatores genéticos contribuem para a suscetibilidade da lesão nervosa em pessoas com diabetes tipo 1. O gene interleucina 4 (IL-4) é uma citocina importante que regula o metabolismo lipídico e glicêmico. **Objetivos:** Investigar a distribuição do polimorfismo VNTR do intron 3 de *IL-4* e sua associação com a ND. **Metodologia:** Estudo seccional com 198 crianças e adolescentes com DM1. Utilizado questionário com informações clínicas e dois protocolos de avaliação da ND: *Score de Sintomas Neuropáticos* e *Diabetic Neuropathy Examination*. Utilizou-se o monofilamento de 10g *Semmes-Weinstein* para avaliar a sensibilidade protetora dos pés. Análise de variância para comparar médias, Qui-quadrado para proporções e Kruskal Wallis para médias. Genotipagem *IL-4* através de PCR-SSLP e avaliação da distribuição de genótipos (3 repetições de 70 pb= A1; 2 repetições de pb= A2; 4 repetições de pb=A3). **Resultados:** ND foi prevalente em 14,6% e a neuropatia puramente sensorial (NS) foi observada em 44,9% da população e associada ao sexo feminino ($p=0,00$). A frequência dos polimorfismos A1, A2 e A3 foram 0,54; 0,41 e 0,05 e não foram observadas associações estatísticas com ND ($p=0,09$; $p=0,12$; $p=0,42$) e com a NS ($p=0,20$; $p=0,34$ e $p=0,08$), respectivamente. Foram observadas associações da ND com hiperglicemia ($p=0,00$) e dislipidemia ($p=0,03$). **Conclusão:** Investigar a suscetibilidade genética pode ajudar na compreensão dos mecanismos patogênicos para o dano neural em diabéticos tipo 1, além de identificar biomarcadores de predição de risco e resposta à intervenção terapêutica.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Neuropatias diabéticas. Avaliação. Crianças. Adolescente.

APÊNDICE 8 – Resumo apresentado no III Congresso de Neurogenética 2021**ASSOCIAÇÃO ENTRE SINAIS E SINTOMAS DE LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA EM DIABÉTICOS TIPO1 E O POLIMORFISMO *MTHFR* 677 C>T**

Raquel Garcia Rocco da Silva (Instituto Federal do Rio de Janeiro); Márcia Gonçalves Ribeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Marcelo A. Costa Lima (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Claudia de Melo Moura (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); Jorge Luiz Luescher (Universidade Federal do Rio de Janeiro); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Introdução: Lesões nervosas periféricas (LNP) são comuns em pessoas com diabetes tipo 1 (DM1) e sinais e sintomas podem evidenciar o estágio e gravidade da lesão. Estudos recentes correlacionam polimorfismos em *MTHFR* com diminuição da atividade enzimática e subseqüentes alterações na estrutura e função vascular. **Objetivos:** Analisar a associação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e a ocorrência de LNP em 198 crianças e adolescentes com DM1. **Metodologia:** Informações clínicas foram coletados em questionário. Estimado RR com intervalo de confiança de 95%, Qui-quadrado para proporções e Kruskal Wallis para médias. Genotipagem foi realizada através de PCR-RFLP. **Resultados:** Foi observada associação entre o genótipo CT e alteração térmica dos pés (RR=2,75; p=0,01). Genótipo CT também se apresentou associado como fator de proteção aos sintomas de câimbra (RR=0,62; p=0,01) e formigamento (RR=0,67; p=0,03) bem como diminuição da força dos flexores plantares (RR=0,57; p=0,05). Alteração do reflexo aquileu (RR=3,16; p=0,02), diminuição da força dos músculos flexores plantares (RR=1,83; p=0,04) e sintoma de câimbra (RR=2,0; p=0,00) foram associados ao genótipo CC como fator de risco. **Conclusão:** Nosso estudo sugere que o polimorfismo *MTHFR* 677C>T participa do componente genético que contribui para modular o risco de lesão nervosa periférica em pessoas com DM1. As explicações em relação a este efeito, invariavelmente, estão associadas ao aumento nos níveis de homocisteína plasmática, já que há perda de atividade da enzima tanto no estado heterozigoto quanto no homozigoto mutante. Controvérsias nos resultados em diferentes populações e direções (proteção x risco) levantam a possibilidade de ação concomitante de fatores epigenéticos.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Neuropatias diabéticas. Avaliação. Criança. Adolescente.

APÊNDICE 9 - ARTIGO

Título: Association of Interleukin 4 and *MTHFR* polymorphisms with distal symmetrical polyneuropathy in young diabetics

Título: Associação de polimorfismos da Interleucina 4 e da *MTHFR* com polineuropatia simétrica distal em jovens diabéticos

Short Title: Polymorphisms in distal symmetrical polyneuropathy.

Authors: Raquel Garcia Rocco da Silva^{1/2} (ORCID 0000-0002-5650-68150); Marcelo A. Costa Lima³ (ORCID 0000.0002.9629.6138); Claudia de Melo Moura³ (ORCID 009-006-2743-6041); Jorge Luiz Luescher¹ (ORCID 0000-0003-4272-6160); Ludmila Nascimento Rodrigues Campos¹ (ORCID 0009-0002-5301-1590); Daniel de Souza e Silva (ORCID 0000-0002-0196-3250)⁴ and Márcia Gonçalves Ribeiro¹ (ORCID 0000.0001.8906.0189).

Affiliation:

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Instituto Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Genética Molecular Humana, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Medicina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Corresponding Author:

Raquel Garcia Rocco da Silva

Rua: Maestro José Botelho, 166 apartamento 402

CEP: 24230-410

Phone : +55 (21) 99196-0123 Email: raquel.rocco@ifrj.edu.br

Declaration of Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

The source of funding

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the development of this work.

Indication of the authors' contributions

The authors have made relevant contributions to this manuscript, are fully aware of its content, and agree with the version submitted for publication. The individual contributions at each stage of the research and preparation of the article were: Conceptualization (Raquel G. R. da Silva and Márcia G. Ribeiro), Data Curation (Raquel G. R. da Silva, Marcelo A. C. Lima, Claudia de M. Moura and Daniel de S. e Silva), Formal Analysis (Raquel G. R. da Silva and Marcelo A. C. Lima), Funding Acquisition (Márcia G. Ribeiro and Marcelo A. C. Lima), Investigation (Raquel G. R. da Silva, Marcelo A. C. Lima, Daniel de S. e Silva, Jorge L. Luescher, Ludmila N. R. Campos and Claudia de M. Moura), Methodology (all authors), Project Administration (all authors), Resources (Raquel G. R. da Silva, Márcia G. Ribeiro and Marcelo A. C. Lima), Software (Raquel G. R. da Silva), Supervision (Raquel G. R. da Silva and Márcia G. Ribeiro), Validation (Raquel G. R. da Silva, Marcelo A. C. Lima and Claudia de M. Moura), Visualization, Writing – original draft and Writing – review and editing (all authors).

ABSTRACT

BACKGROUND: It is believed that genetic factors play a role in the development and severity of neural injury among people with distal symmetrical polyneuropathy (DSP), because some genes are involved in specific biological pathways, acting in different ways of the pathogenic process. **OBJECTIVE:** To identify potential associations between the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T) and interleukin 4 (*IL4* I3VNTR) polymorphisms with DSP in the scientific sample. **METHODS:** Seventy children and adolescents with type 1 diabetes underwent evaluation and nerve conduction studies (NCS) of the sural nerve. Saliva samples were collected for DNA extraction and genotyping of the polymorphisms *MTHFR* C677T and *IL4* I3VNTR. **RESULTS:** The prevalence of DSP was 15.71%. NCS amplitudes were lower in individuals with DSP ($p=0.00$). Glycated hemoglobin, triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol showed higher means in participants with smaller NCS amplitudes ($p>0.05$). The mean NCS velocity was lower in people with the A1A1 genotype ($p=0.02$). Maternal and paternal history of diabetes in great-grandparents were associated with DSP ($p=0.04$ and 0.02 , respectively). Glycated hemoglobin and impaired Achilles reflex were associated with *MTHFR* CC genotype ($p=0.04$ and 0.05 , respectively) and the HDL-cholesterol was associated to *MTHFR* CT genotype ($p=0.05$). We found no association between the investigated polymorphisms and DSP. **CONCLUSIONS:** In this study, we found no association between both the *MTHFR* C677T and *IL4* I3VNTR polymorphisms and DSP. However, the study provides other associations and suggests possible implications for these findings.

KEY WORDS: diabetic neuropathy, child, adolescent, genetic polymorphism, interleukin 4 and methylenetetrahydrofolate reductase.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Acredita-se que fatores genéticos desempenhem um papel no desenvolvimento e na gravidade da lesão neural em pessoas com polineuropatia simétrica distal (PSD), pois alguns genes estão envolvidos em vias biológicas específicas, atuando em diferentes formas no processo patogênico. **OBJETIVO:** Identificar possíveis associações entre os polimorfismos 5,10-metileno tetrahydrofolato redutase (*MTHFR* C677T) e a interleucina 4 (*IL4* I3VNTR) com a PSD na amostra estudada. **MÉTODOS:** Setenta crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 foram submetidos ao estudo de condução neural (ECN) do nervo sural. Amostras de saliva foram coletadas para extração de DNA e genotipagem dos polimorfismos *MTHFR* C677T e *IL4* I3VNTR. **RESULTADOS:** A prevalência de PSD foi de 15,71%. As amplitudes do ECN foram menores nos indivíduos com PSD ($p=0,00$). Hemoglobina glicada, triglicerídeos e colesterol total, LDL e HDL apresentaram médias maiores nos participantes com menores amplitudes do ECN ($p>0,05$). A média da velocidade do ECN foi menor nas pessoas com genótipo A1A1 ($p=0,02$). História materna e paterna de diabetes nas bisavós esteve associada à PSD ($p=0,04$ e $0,02$, respectivamente). Não encontramos associação entre os genótipos investigados com PSD. A hemoglobina glicada e a diminuição do reflexo aquileu foram associados ao genótipo *MTHFR* CC ($p=0,04$ e $0,05$, respectivamente) e o colesterol HDL foi associado ao genótipo *MTHFR* CT ($p=0,05$). **CONCLUSÃO:** Neste estudo, não encontramos associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o polimorfismo I3VNTR do gene *IL4*. No entanto, o estudo fornece outras associações e sugere possíveis implicações para esses achados.

PALAVRAS-CHAVE: neuropatia diabética, criança, adolescente, polimorfismogenético, interleucina 4 e metilenotetrahydrofolatoredutase.

INTRODUCTION

The clinical manifestations of type 1 diabetes (T1DM) are polymorphous and vary considerably between individuals. The microvascular repercussions are based on diabetic triopathy – retinopathy, nephropathy, and neuropathy – and constitute an important health problem, resulting in morbidity and mortality and significantly worsening the quality of life due to disability and reduced survival ¹.

Neuropathic involvement is usually early and encompasses a wide spectrum of abnormalities, affecting various types of sensory, motor, and autonomic fibers, occurring both in type 1 and type 2 diabetes, as well as in acquired forms of diabetes, with distal symmetrical polyneuropathy (DSP) being the most common and known form of neuropathy².

The prevalence and incidence of DSP in individuals with T1DM vary considerably but the estimates are that, after 20 years of disease duration, 20% of patients develop DSP³.

Despite glycemic control and the duration of diabetes being considered important factors for the development of DSP, it is observed that the speed of progression and involvement of the nervous tissue present great individual differences⁴. There is evidence that genetic predisposition plays a role in susceptibility to nerve damage. With the insertion of molecular biology analysis in different areas, some polymorphisms have been identified, possibly related to complications of T1DM ^{5_6_7_9}.

The genes responsible for favoring an inflammatory response are important candidates associated with neural damage⁵. Interleukin-4 (IL-4) is a cytokine secreted by type 2 T cells, eosinophils, and macrophages and plays an important role in the formation of the endothelial cell inflammatory response. Several polymorphisms have been described, and an intronic VNTR (variable number of tandem repeats) is associated with inflammatory diseases and a deficiency in the regulation and production of IL-4^{6_7}.

Hyperhomocysteine is also linked to impaired nerve function due to oxidative stress. Methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) catalyzes the transformation of homocysteine into methionine through the remethylation pathway; however, a decrease in *MTHFR* activity due to mutation increases the chances of hyperhomocysteinemia^{8_9_10_11}.

Given the above, the present study aimed to identify, in the studied sample, a potential association between C677T polymorphisms of the *MTHFR* gene and intron 3 VNTR polymorphisms of the *IL4* gene and distal symmetrical polyneuropathy.

METHODOLOGY

Definition of the Case and Universe of the Study

This is a cross-sectional observational study of 70 children and adolescents with T1DM. The inclusion criteria were: children and adolescents of both sexes; T1DM diagnosis five years ago or more; ability to understand the exam; passing the Compliance Test – identifies the tendency to agree; literate children up to 18 years old. Exclusion criteria were: associated disease similar to neuropathic; using metformin¹²; vitamin B12 deficiency¹²; hypothyroidism, all recorded in the medical records; and asymmetric sensory and motor deficits². A content-structured questionnaire was applied.

Neurological Assessment

The clinical evaluation consisted of muscle strength (quadriceps femoris and tibialis anterior), reflex (triceps surae and patellar), and sensitivity (painful sensitivity in these condfinger and in the hallux, sensitivity to touch in the hallux, vibratory perception of the hallux, joint perception of the hallux, protective sensitivity, and thermal sensitivity of the dorsum of the foot).

Samples, DNA Extraction, and Molecular Genotyping

All provided salivary material to obtain genomic DNA. The samples were obtained by swishing 3 mL of sucrose solution at 3%, and stored at -20°C until *MTHFR* C677T (rs1801133) and *IL-4* I3 VNTR genotyping.

The *MTHFR* C677T polymorphism was analyzed by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism. The amplification conditions consisted of 5 min at 94°C; followed by 35 cycles of 30s at 94°C, 30s at 61°C, and 30s at 72°C; with a final elongation step of 5 min at 72°C. PCR was performed in a 25 µl reaction containing 100 ng of DNA, 2.5 µl of 10X PCR buffer, 200 µM of dNTPs, 10 pM of each primer (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' and 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), and 1 U Taq DNA polymerase. After amplification, the PCR product was digested in 15 µl of reaction solution containing 10 µl of PCR product, 1.5 µl of 10X buffer and 2U HinfI at 37°C, and the products were resolved on 3% agarose gels and visualized under UV after ethidium bromide staining.

Wild type C allele is a single 198bp fragment, while mutant T allele is cleaved into 175 and 23bp fragments.

The *IL-4* intron 3 VNTR polymorphism was analyzed by Polymerase Chain Reaction - Simple Sequence Length Polymorphism. Amplification was performed in a 25µl reaction containing 3 µl of DNA, 10 µl PCR reaction buffer, 2 µl of each primers (5'-GTAAATAGGCTGAAAGGGGAAA-3 and 5'-CATCTTTTCCTCCCCTGTATCTT-3') primers and 1 U Taq DNA polymerase. The amplification conditions consisted of 2 min at 95°C; followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 56°C, and 30s at 72°C; with a final elongation step of 5 min at 72°C. The PCR products were electrophoresed on 2.5% agarose gels and visualized after ethidium bromide staining under UV light. The wild-type allele contain three VNTR repeats (3R – named A1) and appears as a 342bp fragment while the rare allele containing two VNTR repeats (2R - named A2) is visualized as a 272bp fragment. The genotypes are represented by A1A1 (homozygous wild-type), A1A2 (heterozygous), and A2A2 (homozygous variant).

Parameters and Evaluation of Nerve Conduction

After the children and adolescents were evaluated at the diabetes clinic, they were invited to attend the Pedro Ernesto University Hospital for nerve conduction studies (NCS) using the Counterpoint instrument (Medtronic). Surface electrodes were positioned on the lateral edge of the foot, close to the fifth toe, with the stimulus site posterior to the lateral malleolus, and the cathode located approximately 100mm proximal to the recording electrode. The evaluation occurred bilaterally, i.e., the right and left foot. A normal reference record for the electrophysiological study was considered: action potential amplitude (µV) >6 and conduction velocity (m/s) >39¹⁵.

Statistical analysis

The prevalence of DSP and its 95% CI (p value=0.05) were estimated, and the odds ratio (OR) for the investigated variables. The analysis of variance was used to compare the means. Data were analyzed using the Epi-Info statistical package, version 7.2. Statistical significance was assessed using the chi-square (χ^2) test for proportions; and Student's t or Kruskal–Wallis test for means. A logistic regression model was fitted to identify the independent factors associated with DSP.

This project was approved by the Research Ethics Committee of IPPMG/UFRJ under number 1.910.920 (CAAE 60302816.7.0000.5264). Written informed consent was obtained from all the patients.

RESULTS

Seventy children and/or adolescents underwent NCS of the sural nerve (Figure 1). The prevalence of DSP was 15.71% (27.27% girls and 72.73% boys), and the statistical association with gender was at a significance level of 10%. ($p=0.07$). Table 1 shows the mean amplitudes and velocities of the NCS.

Figure 1 - Children and adolescents taking part in the study

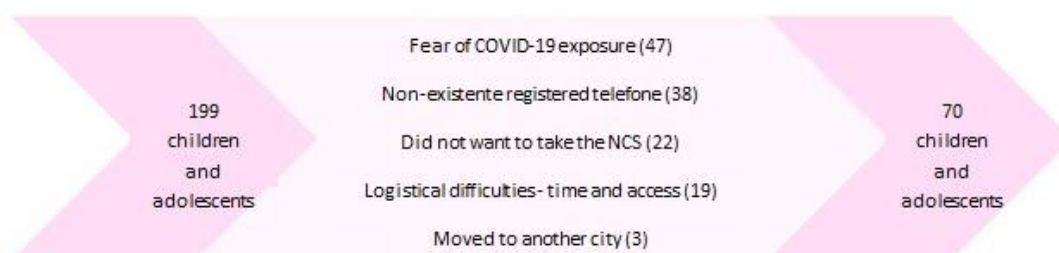


Table 1 – Mean of the parameters evaluated of the NCS in the sural nerve and their associations with DSP

Parameter	DSP Mean (sd)	Without DSP Mean (sd)	P value
Sural –RightAmplitude (mV)	5.52 (2.99)	16.81 (5.80)	0.00
Sural – LeftAmplitude (mV)	6.26(3.23)	16.40 (6.17)	0.00
Sural – Right NCV* (m/s)	52.44 (8.06)	50.79 (4.81)	0.40
Sural – Left NCV* (m/s)	51.44 (5.41)	51.26 (5.27)	0.92

Note: *NCS – nerve conduction studies; sd (standard deviation); DSP (distal symmetrical polyneuropathy)

Many laboratory and clinical variables investigated showed higher means in patients with smaller NCS amplitudes with a statistically significant association, $p>0.05$ (glycated hemoglobin, time of diagnosis, weight, height, body mass index, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, microalbuminuria, triglycerides and total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and VLDL-cholesterol. The exception was age ($p=0.47$). We also observed an association with gender, in this sense, boys had smaller amplitudes than girls, both in the right and left sural ($p=0.01$; 0.02, respectively).

In Table 2, we the observe statistical significance clinical and laboratory variables and their associations with DSP, before and after stratification by sex.

Table 2 - Clinical and Laboratory Variables and their associations with DSP

Clinical Variables and Laboratories	Mean (sd)	P Valor	Mean (sd)	P * valor	Mean (sd)	P * value
	DSP (Without DSP)		girls* DSP (Without DSP)		boys* DSP (Without DSP)	
Age (years)	15.27 (2.61)	0.70	17.33 (1.52)	0.08	14.50 (2.56)	0.19
	15.57 (2.35)		15.25 (1.93)		15.92 (2.73)	
Diabetes diagnostic time (years)	11.45 (2.33)	0.98	12.33 (2.08)	0.33	11.12 (2.47)	0.44
	11.46 (2.68)		10.96 (2.34)		12.00 (2.95)	
Glycated hemoglobin** (%)	9.58 (3.40)	0.00	8.54 (1.12)	0.38	10.03 (4.01)	0.00
	7.95 (0.68)		8.18 (0.60)		7.69 (0.68)	
Weight (Kg/m ²)	62.02 (17.83)	0.54	69.00 (14.42)	0.12	59.41 (19.14)	0.83
	59.43 (11.86)		58.59 (10.60)		60.34 (13.21)	
Height (cm)	1.65 (0.15)	0.72	1.71 (0.04)	0.01	1.62 (0.16)	0.41
	1.64 (0.10)		1.60 (0.06)		1.67 (0.12)	
Body mass index (kg/m ²)	22.26 (3.71)	0.75	23.45 (4.38)	0.69	21.82 (3.66)	0.55
	21.95 (2.84)		22.67 (3.11)		21.19 (2.34)	
Systolic blood pressure (mmHg)	105.45 (14.39)	0.99	96.66 (5.77)	0.17	108.75 (15.52)	0.93
	105.42 (9.89)		102.62 (7.09)		108.32 (11.56)	
Diastolic blood pressure (mmHg)	65.45 (6.87)	0.60	63.33 (5.77)	0.63	66.25 (7.44)	0.54
	66.78 (8.04)		65.24 (6.62)		68.39 (9.13)	
Microalbuminúria (g/dl)	10.96 (8.09)	0.12	13.70 (10.55)	0.33	9.79 (7.45)	0.05
	7.21 (6.73)		8.83 (7.88)		5.22 (4.35)	
HDL cholesterol (mg/dl)	60.09 (15.74)	0.89	56.66 (19.50)	0.42	61.37 (15.44)	0.26
	59.39 (15.68)		64.03 (14.76)		54.42 (15.35)	
LDL cholesterol(mg/dl)	108.27 (47.70)	0.01	183.33 (91.62)	0.03	97.00 (17.88)	0.01
	84.55 (25.77)		92.96 (25.47)		75.53 (23.28)	
Triglycerides(mg/dl)	94.72 (58.08)	0.03	106.66 (74.23)	0.21	90.25 (56.22)	0.04
	66.82 (35.89)		74.70 (38.08)		58.39 (31.92)	
Total cholesterol(mg/dl)	187.18 (62.28)	0.02	216.33 (126.15)	0.10	176.25 (22.23)	0.00
	156.31 (35.71)		168.83 (35.91)		142.89 (30.78)	
VLDLcholesterol (mg/dl)	22.60 (11.99)	0.10	38.00 (0.00)	0.09	18.75 (9.63)	0.10
	14.90 (9.11)		17.18 (10.09)		12.46 (7.53)	

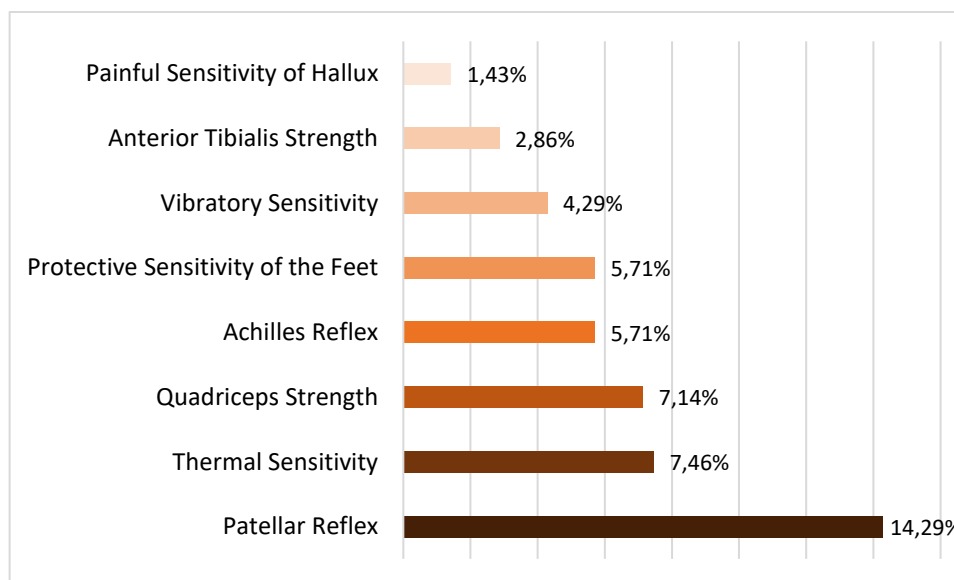
Note: (*) adjusted by sex; (**) means of eight measurements for each patient were analyzed; (sd) standard deviation; DSP (distal symmetrical polyneuropathy)

Regarding to maternal history, we observed a 3.26 higher risk of DSP in children and adolescents who had great-grandparents with T1DM (95%CI 1.12-9.45; p=0.04). Paternal history of great-grandparents with T1DM was also associated with DSP (OR=3.43; 95%CI=1.22-9.60; p=0.02).

The frequency of clinical signs evaluated is shown on Figure 2. Patients with DSP had a 4.87 times greater risk of having changes in thermal sensitivity than patients without DSP (95%CI 1.85-12.80; p value=0.01). The associations were also for changes in the Achilles reflex (OR=6.18; CI95%=2.61-14.64; p=0.00) and changes in the patellar reflex (OR=5.00; CI95%= 1.87-13.32; p=0.00). With the protective

sensitivity of the feet, despite the 95% CI being associated between 95%, the p value was above 0.05 (OR= 3.66; CI95%=1.15-11.61; p=0.06).

Figure 2 – Frequency of alterations observed in neurological evaluation



Note: The clinical signs presented are related to the frequency of changes in normality

The *IL-4 I3VNTR* A1A1 genotype was more frequent in the studied sample (61.40%); followed by A1A2 (35.09%) and A2A2 (3.51%). The frequencies of the A1 and A2 alleles were 69% and 31%. NCS velocity means were lower in individuals with the A1A1 genotype (50.01 vs 53.20), showing an association (p=0.02).

Homozygous wild-type *MTHFR* (CC) genotype was the most prevalent in the population (55.88%), followed by heterozygote (CT 39.71%) and homozygous variant (TT 4.41%). The C allele was present in 68% of the patients and the T allele in 32%. Table 3 shows the frequency of *IL4* and *MTHFR* genotypes and alleles between patients with and without DSP; no statistical associations were observed.

Table 3 - *IL4* and *MTHFR* genotypes between patients with and without DSP

Polymorphisms	% Individuals with DSP	% Individuals without DSP	P value
<i>IL4</i>			
A1A1	15.00	85.00	0.42
A1A2	19.05	80.95	0.31
A2A2	14.29	85.71	0.49
Allele A1	16.39	83.61	0.38
Allele A2	17.86	82.14	0.34
<i>MTHFR</i>			
CC	18.42	81.58	0.29
CT	14.81	85.19	0.41
TT	0.00	100.00	*
Allele C	16.92	83.08	0.20
Allele T	13.33	86.67	0.33

Note: *IL4* (interleukin 4); *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase); DSP (distal symmetrical polyneuropathy); CC (homozygous wild-type individuals); CT (heterozygous individuals); TT (homozygous individuals); A1A1 (homozygous wild-type); A1A2 (heterozygous); A2A2 (homozygous variant)

The investigated *IL4* and *MTHFR* genotypes were not associated with any clinical sign. The change in the Achilles reflex was associated with the *MTHFR* CC polymorphism (p value=0.04) (Table 4).

Table 4 - Clinical variables investigated and their associations with *IL4* and *MTHFR* genotypes

Clinical Variables*	<i>IL4</i> OR (p value)			<i>MTHFR</i> OR (p value)		
	A1A1	A1A2	A2A2	CC	CT	TT
Quadriceps femoris strength	0.68 (0.23)	2.16 (0.09)	*	1.48 (0.15)	0.48 (0.20)	*
Anterior tibialis strenght	1.78 (0.16)	*	*	0.89 (0.44)	1.26 (0.39)	*
Patelar reflex	1.05 (0.43)	1.41 (0.23)	*	1.08 (0.39)	0.72 (0.26)	2.90 (0.21)
Achillesreflex	1.33 (0.26)	0.82 (0.44)	*	1.88 (0.04)	*	*
Painful sensitivity of the 2 ^o finger	*	*	*	*	*	*
Painful sensation of the great toe	1.76 (0.28)	*	*	*	2.57 (0.19)	*
Hallux touch sensitivity	*	*	*	*	*	*
Hallux vibration sensitivity	1.17 (0.39)	1.11 (0.43)	*	1.20 (0.37)	0.83 (0.43)	*
Hallux joint perception	*	*	*	*	*	*
Thermal sensitivity	1.44 (0.16)	0.72 (0.14)	*	1.48 (0.15)	0.48 (0.20)	*
Protective foot sensitivity	1.33 (0.26)	0.82 (0.44)	*	0.88 (0.41)	1.28 (0.34)	*

Note: (*) Corresponds to changes in strength, reflexes and sensibilities; *IL4* (interleukin 4); *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase); OR (odds ratio); CC (homozygous wild-type individuals); CT (heterozygous individuals); TT (homozygous individuals); A1A1 (homozygous wild-type); A1A2 (heterozygous); A2A2 (homozygous variant)

Means of glycated hemoglobin were higher in patients with the *MTHFR* CC genotype (8.58 vs 7.78), showing a statistical association (p-value = 0.05). In the *MTHFR* CT genotype, HDL cholesterol showed lower means (55.15 vs 62.75) with statistical association (p-value= 0.05).

DISCUSSION

As far as we know, there are no studies carried out with Brazilian children and adolescents with T1DM aimed at the genetic investigation of DSP with the polymorphisms presented.

Knowledge of the prevalence of DSP is extremely important because it is a multifactorial disease related to genetic, environmental and ethnic risks. Therefore, its frequency corroborates actions related to education, promotion, and administration in health¹³. In this study, we were able to estimate the prevalence of DSP in a population of children and adolescents who are part of an outpatient clinic at an university hospital and are routinely followed, minimizing possible information biases. We observed that 15.71% of had DSP, and we did not find studies in Brazil that aimed to estimate this frequency in children and adolescents with T1DM.

In the literature, we observed a wide variation in frequency (7% to 90%), which may be related to the characterization of nerve injury attributed in each study, as well as to the criteria and instruments diagnoses¹⁴.

We use NCS to diagnose DSP. There is no consensus regarding which peripheral nerve offers greater sensitivity and specificity for detecting DSP². Some studies propose evaluation of motor nerves and others recommend sensory nerves, however, the most distal sensory fibers are often the first to be affected. Also, Balci et al. (2005)¹⁵ observed that the sural nerve serves as a reliable parameter for early identification of DSP. In our study, also observed that the amplitudes were reduced and associated with DSP. We evaluated only the sural nerve, and it was not possible to evaluate these relationships. The predominant abnormality of the NCS is the loss of axons, which, electrophysiologically, means a reduction in amplitudes and not in nerve conduction velocities and, therefore, the observed alterations may not be the best strategy to monitor the progression of neural injury¹⁶. NCS alterations are related to age and time of diagnosis, but in the present study, we did not observe a statistical association (p-values=0.70 and 0.84, respectively)¹⁶.

With regard to the lipid profile, it is postulated that there is a linear relationship between lipid concentrations and microvascular changes, and that reaching lower serum concentrations brings clinical benefits to the population¹⁷. We did not classify the lipid profile in the studied sample, but we observed that the serum levels of triglycerides, LDL and total cholesterol were higher in patients with DSP (p=0.01; 0.03; 0.02 respectively). Dyslipidemia is multifactorial, but it is related to poor glycemic control, insulin resistance and genetic susceptibility¹⁸. Glycated hemoglobin was associated with DSP in boys, and its relationships have already been disseminated in large studies on T1DM.³⁻¹⁹ Hyperglycemia induces two pathways responsible for neural damage: metabolic and ischemic pathways, which are closely related. The activation of these pathways triggers successive inflammatory and ischemic processes that culminate in impaired nerve conduction, neurovascular dysfunction, apoptosis, and sensory deficits²⁰.

Longer axons are more susceptible to cell damage²¹, and we observed an association between height and DSP in girls with DSP, age (p=0.00) and time since diagnosis (p=0.00) were related to a NCS amplitude decrease¹⁶.

Microvascular complications have been more prevalent in adolescent girls than in boys²², but in this sample although there was no statistical significance, the

association was below 10% ($p=0.07$). Although we did not observe an association between DSP and gender, we observed that boys had lower means of NCS amplitude with statistical association ($p=0.01$). After stratification by sex, microalbuminuria was associated with DSP in boys ($p=0.05$).

Evidence indicates that genetic susceptibility influences microvascular dysfunction¹³ and we observed both maternal and paternal diabetes history of great-grandparents ($p=0.04$ and 0.02 , respectively). We did not find any studies that had investigated diabetes history beyond the paternal and maternal relationship.

Autoimmunity has also been proposed as a pathogenic mechanism for DSP²³. IL-4 plays a key role in autoimmunity and acts as an anti-inflammatory⁷. Endothelial inflammation is a major precursor of neural injury, therefore, IL-4, as an anti-inflammatory cytokine, may favor DSP⁶. We did not observe associations between *IL-4* intron 3 VNTR polymorphisms and DSP, but observed lower mean NCS velocity in young with the A1A1 genotype ($p=0.02$), suggesting a possible risk factor. IL-4 regulates lipid and glucose metabolism²⁴⁻²⁵ and the A1 allele, compared with A2, has a lesser deleterious effect²⁶. However, we did not observe associations between *IL-4* genotypes and risk factors related to DSP.

The association of these polymorphisms with DSP also strongly correlated them with cardiovascular diseases, which are more frequent in adults⁷. This makes us think that the fact that our sample consists of children and adolescents, perhaps, points to the fact that the deleterious effects are related to the time of exposure, that is, to age. We did not find any studies that analyzed children and adolescents with T1DM.

The *MTHFR* C677T polymorphism produces a thermolabile variant that present a reduced activity and increases homocysteine levels. Heterozygous individuals (CT) have approximately 60% of the enzymatic activity compared to wild-type homozygotes (CC), while mutant homozygotes (TT) present only 30% of the enzymatic activity²⁷⁻²⁸. The T allele was frequent in 32% and the C allele in 68% of the studied sample. The frequency of the T allele differs between countries and ethnicities, but in American Indians, it was the highest observed (65%)²⁹.

We found studies that aimed to evaluate the association between C677T polymorphism and DSP, and the results were divergent⁸⁻³⁰⁻³¹⁻³²⁻³³⁻³⁴⁻³⁵⁻³⁶. We observed that the population samples differed considerably between studies regarding sample size, nationality, lifecycle, diagnostic criteria, and type of diabetes. In addition, no study has analyzed children and adolescents. The association between the *MTHFR*

C677T polymorphism and DSP was observed in five studies^{8_30_32_33_34}; however, three studies did not observe it^{31_35_36}. Our study found no statistically significant association for any genotype analyzed, even after adjusting for possible confounding variables. Wild-type homozygous individuals (CC) have better enzymatic activity than heterozygotes (CT) and the homozygous variant (TT). However, the CC genotype was associated as a risk factor for alteration of the Achilles reflex ($p=0.04$) and the CT genotype was associated with glycated hemoglobin ($p=0.05$). The CT genotype was also associated with HDL cholesterol ($p=0.05$).

Limitations and Suggestions

Jaiswal et al. (2017)¹⁴ suggested that the different tonicities among young people and adults with T1DM and their relationships with microvascular complications need to be better understood, however, we did not assess the phenotype and its possible relationships with DSP. Gene expression is also influenced by epigenetic mechanisms³⁷. Despite having collected clinical and laboratory variables, we believe that there may be another mechanism that sheds light on a possible functional interference of the polymorphism.

Arruda et al. (1998)³⁷ conducted a study to determine the prevalence of the C677T mutation among different ethnic groups and observed that 10% of Caucasians, 1.45% of Blacks, and 1.2% of Indians were variant homozygotes. The absence of participant with the homozygous variant, especially among with DSP, made it impossible to analyze their associations. In our study, the frequency of double mutants was 7.04% but we did not record ethnicity to consider this relationship. Heterozygous children and adolescents represented 39.71% and homozygous 60.29%. In the study by Arruda et al. (1998)³⁷, the frequency of homozygosity was higher among blacks and indigenous people (62.75% and 79.7%, respectively).

The prevalence of C677 polymorphism is related to ethnicity, and in Brazil, its origin is extremely heterogeneous³⁷. We believe that the lack of information on ethnicity may have generated a confounding factor, which could be perfectly controlled in the statistical analysis, making it impossible to assess the relationship between allele frequencies and polymorphisms, as well as their relationships with neural injury.

Another important point is that the genetic variant *MTHFR* C77T predisposes to reduced enzymatic activity (hyperhomocysteine) and lower levels of folate, vitamins B6 and B12³⁸. Therefore, the introduction of vitamins and minerals into the dietary routine can minimize the enzyme deficiency caused by the C677T polymorphism³⁹.

Because we did not assess the intake of these components, we could not analyze the confounding effects of this relationship. Measurement of homocysteine levels is a strategy to analyze its effect on neural injury⁴⁰.

CONCLUSION

Although we did not observe an association between the C677T polymorphism of the *MTHFR* gene and the I3VNTR polymorphism of the *IL4* gene, this study provides other associations and suggests possible implications for the findings. We observed some associations with the *MTHFR* CC genotype (glycated hemoglobin and Achilles reflex impairment) and with the *MTHFR* CT genotype (HDL cholesterol).

BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

- 1- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022; 45(Suppl 1):S185-S194.
- 2- Ziegler D, Tesfaye S, Spallone V, Gurieva I, Al Kaabi J, Mankovsky B, Martinka E, Radulian G, Nguyen KT, Stirban AO, Tankova T, Varkonyi T, Freeman R, Kempler P, Boulton AJ. Screening, diagnosis and management of diabetic sensorimotor polyneuropathy in clinical practice: International expert consensus recommendations. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022; 186:109063.
- 3- Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Feldman EL, Martin CL, Cleary PA, Waberski BH, Lachin JM; Diabetes Control and Complications Trial /Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of prior intensive insulin treatment during the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. *Diabetes Care*. 2010; 33(5):1090-6.
- 4- Jankovic M, Novakovic I, Nikolic D, Mitrovic Maksic J, Brankovic S, Petronic I, Cirovic D, Ducic S, Grajic M, Bogicevic D. Genetic and Epigenomic Modifiers of Diabetic Neuropathy. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(9):4887.
- 5- Miesse AM, Willey JS, Bateman TA. Potential role of proinflammatory cytokines in nerve damage related bone loss. *Biomed Sci Instrum*. 2004; 40:266-71.

- 6- Basol N, Inanir A, Yigit S, Karakus N, Kaya SU. High association of IL-4 gene intron 3 VNTR polymorphism with diabetic peripheral neuropathy. *J Mol Neurosci*. 2013 Oct;51(2):437-41. doi: 10.1007/s12031-013-0048-y. Epub 2013 Jun 16. PMID: 23771787.
- 7- Buraczynska M, Buraczynska K, Zukowski P, Ksiazek A. Interleukin-4 Gene Intron 3 VNTR Polymorphism in Type 2 Diabetes Patients with Peripheral Neuropathy. *Immunol Invest*. 2018; 47(2):146-153.
- 8- Kakavand Hamidi A, Radfar M, Amoli MM. Association between *MTHFR* variant and diabetic neuropathy. *Pharmacol Rep*. 2018 Feb;70(1):1-5.
- 9- Zhao Y, Zhu R, Wang D, Liu X. Genetics of diabetic neuropathy: Systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019; 6(10):1996-2013.
- 10-Schlüssel E, Preibisch G, Pütter S, Elstner EF. Homocysteine-induced oxidative damage: mechanisms and possible roles in neurodegenerative and atherogenic processes. *Z Naturforsch C J Biosci*. 1995; 50(9-10):699-707.
- 11-Moll S, Varga EA. Homocysteine and *MTHFR* Mutations. *Circulation*. 2015; 132(1):e6-9.
- 12-Wei J, Wei Y, Huang M, Wang P, Jia S. Is metformin a possible treatment for diabetic neuropathy? *J Diabetes*. 2022; 14(10):658-669.
- 13-Witzel II, Jelinek HF, Khalaf K, Lee S, Khandoker AH, Alsafar H. Identifying Common Genetic Risk Factors of Diabetic Neuropathies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 May 28;6:88. doi: 10.3389/fendo.2015.00088. PMID: 26074879; PMCID: PMC4447004.
- 14-Jaiswal M, Divers J, Dabelea D, Isom S, Bell RA, Martin CL, Pettitt DJ, Saydah S, Pihoker C, Standiford DA, Dolan LM, Marcovina S, Linder B, Liese AD, Pop-Busui R, Feldman EL. Prevalence of and Risk Factors for Diabetic Peripheral Neuropathy in Youth With Type 1 and Type 2 Diabetes: SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. 2017; 40(9):1226-1232.
- 15-Balci K, Karacayir S, Varol G, Utku U. Utility of dorsal sural nerve in early determination of diabetic polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2005; 10(3):342-3.
- 16-Anandhanarayanan A, Teh K, Goonoo M, Tesfaye S, Selvarajah D. Diabetic Neuropathies. 2022. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J,

- Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trence DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
- 17-Reh CM, Mittelman SD, Wee CP, Shah AC, Kaufman FR, Wood JR. A longitudinal assessment of lipids in youth with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2011; 12(4 Pt 2):365-71.
- 18-Bulut T, Demirel F, Metin A. The prevalence of dyslipidemia and associated factors in children and adolescents with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017; 30(2):181-187.
- 19-Svensson J, Ibfelt EH, Carstensen B, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, Rami-Merhar B, Feltbower RG, Castell C, Konrad D, Gillespie K, Jarosz-Chobot P, Marčiulionytė D, Rosenbauer J, Bratina N, Ionescu-Tirgoviste C, Gorus F, Kocova M, de Beaufort C, Patterson CC. Age-period-cohort modelling of type 1 diabetes incidence rates among children included in the EURODIAB 25-year follow-up study. *Acta Diabetol*. 2023; 60(1):73-82.
- 20-Burgess J, Frank B, Marshall A, Khalil RS, Ponirakis G, Petropoulos IN, Cuthbertson DJ, Malik RA, Alam U. Early Detection of Diabetic Peripheral Neuropathy: A Focus on Small Nerve Fibres. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(2):165.
- 21-Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2008; 52(2):375-386.
- 22-Donaghue KC, Marcovecchio ML, Wadwa RP, Chew EY, Wong TY, Calliari LE, Zabeen B, Salem MA, Craig ME. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19 Suppl 27(Suppl 27):262-274.
- 23-Strokov IA, Bursa TR, Drepa OI, Zotova EV, Nosikov VV, Ametov AS. Predisposing genetic factors for diabetic polyneuropathy in patients with type 1 diabetes: a population-based case-control study. *Acta Diabetol*. 2003; 40 Suppl 2:S375-9.

- 24-Kazemi Arababadi M. Interleukin-4 gene polymorphisms in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Iran J Kidney Dis.* 2010 Oct;4(4):302-6.
- 25-Ali R, El-Said A, El-Baz H, Settin A. Ethnic variation of IL-4 intron 3 VNTR gene polymorphism; its association with type 2 diabetes mellitus and its complication (neuropathy) in Egyptian subjects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2018; 177(7):635-640.
- 26-Kasznicki J, Kosmalski M, Sliwinska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, Drzewoski J. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(9):8669-78.
- 27-Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr.* 2000; 83(6):593-6.
- 28-Jianbo L, Yuche C, Ming S, Jingrong T, Qing D, Yu Z, Jiawei C, Hongxing W. Association of homocysteine with peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 93(1):38-42.
- 29-Contreras-Cubas C, Sánchez-Hernández BE, García-Ortiz H, Martínez-Hernández A, Barajas-Olmos F, Cid M, Mendoza-Caamal EC, Centeno-Cruz F, Ortiz-Cruz G, Jiménez-López JC, Córdova EJ, Salas-Bautista EG, Saldaña-Alvarez Y, Fernández-López JC, Mutchinick OM, Orozco L. Heterogenous Distribution of *MTHFR* Gene Variants among Mestizos and Diverse Amerindian Groups from Mexico. *PLoS One.* 2016; 11(9):e0163248.
- 30-Ambrosch A, Dierkes J, Lobmann R, Kühne W, König W, Luley C, Lehnert H. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001; 18(3):185-92.
- 31-Costacou T, Chang Y, Ferrell RE, Orchard TJ. Identifying genetic susceptibilities to diabetes-related complications among individuals at low risk of complications: An application of tree-structured survival analysis. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(9):862-72.
- 32-Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of *MTHFR* gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2013; 19:1626-30.

- 33-Molina M, Gonzalez R, Folgado J, Real JT, Martínez-Hervás S, Priego A, Lorente R, Chaves FJ, Ascaso JF. Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína y la polineuropatía diabética evaluada con la prueba del monofilamento de Semmes-Weinstein en pacientes con diabetes tipo 2 [Correlation between plasma concentrations of homocysteine and diabetic polyneuropathy evaluated with the Semmes-Weinstein monofilament test in patients with type 2 diabetes mellitus]. *Med Clin (Barc)*. 2013; 141(9):382-6.
- 34-Settin A, El-Baz R, Ismaeel A, Tolba W, Allah WA. Association of ACE and *MTHFR* genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: Susceptibility and complications. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015; 16(4):838-43.
- 35-Russo GT, Giandalia A, Romeo EL, Scarcella C, Gambadoro N, Zingale R, Forte F, Perdichizzi G, Alibrandi A, Cucinotta D. Diabetic neuropathy is not associated with homocysteine, folate, vitamin B12 levels, and *MTHFR* C677T mutation in type 2 diabetic outpatients taking metformin. *J Endocrinol Invest*. 2016; 39(3):305-14.
- 36-Jiménez-Ramírez FJ, Castro LM, Ortiz C, Concepción J, Renta JY, Morales-Borges RH, Miranda-Massari JR, Duconge J. Role of treatment-modifying *MTHFR*677C>T and 1298A>C polymorphisms in metformin-treated Puerto Rican patients with type-2 diabetes mellitus and peripheral neuropathy. *Drug Metab Pers Ther*. 2017; 32(1):23-32.
- 37-Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet*. 1998; 78(4):332-5.
- 38-Zhong JH, Rodríguez AC, Yang NN, Li LQ. Methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2013; 8(9):e74521.
- 39-D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, Fermo I, Pagano A, Mazzola G, Galli L, Cerbone AM. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylentetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thromb Haemost*. 2000; 83(4):563-70.

40-Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, Omrani GR. Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. *Bone*. 2004; 35(3):760-5.

21/02/2024, 15:18
ScholarOne Manuscripts

 **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**

[# Home](#)

[/ Author](#)

[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Arquivos de Neuro-Psiquiatria

Manuscript ID
ANP-2024-0054

Title
Association of Interleukin 4 and MTHFR polymorphisms with distal symmetrical polyneuropathy in young diabetics

Authors
da Silva, Raquel
Costa Lima, Marcelo
Moura, Claudia
Luescher, Jorge Luiz
Campos, Ludmila
e Silva, Daniel
Ribeiro, Márcia

Date Submitted
21-Feb-2024

[Author Dashboard](#)

<https://mc.manuscriptcentral.com/arp-acielo>
1/2

ANEXO 1 - TESTE DE AQUIESCÊNCIA

(Adaptado por Cummins 1997)

Procedimento:

Algumas pessoas com incapacidades podem desejar que um familiar ou um cuidador estejam presentes na avaliação para oferecer auxílio (aplicação assistida). Se esta pessoa estiver presente, ela deverá ser:

- Instruída a não responder em hipótese alguma às perguntas enquanto elas forem sendo lidas ao participante.
- Posicionada fora do campo de visão do participante (para evitar distrações ou dicas não-verbais).

Administração:

Verifique se o participante está confortável e pronto para responder. Leia cada pergunta em voz alta, com cuidado e devagar, e circule a resposta do participante.

Aponte para o relógio do participante (ou para uma jóia ou outro item que com certeza pertence a ele):

- | | | |
|--|-----|-----|
| 1. Esse (nomeie o item) pertence a você? | Sim | Não |
|--|-----|-----|

Então continue:

- | | | |
|---|-----|-----|
| 2. É você quem faz todas as suas roupas e sapatos? | Sim | Não |
| 3. Você já viu seus vizinhos (de casa ou de quarto)? | Sim | Não |
| 4. Foi você quem escolheu estas pessoas para serem seus vizinhos? | Sim | Não |

Pontuação:

Se o participante responder positivamente (sim) aos itens 2 e 4, ele NÃO deverá ser incluído no estudo, uma vez que isto sugere que a autoavaliação, preconizada no NSS, poderá não ser confiável.

Se o participante responder negativamente (não) aos itens 2 e 4, a avaliação poderá prosseguir.