

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

VANESSA POLYANA DE SOUSA BRITO

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs266729 DO GENE DA
ADIPONECTINA COM CONSUMO ALIMENTAR, PARÂMETROS
ANTROPOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS E DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM RETINOPATIA
DIABÉTICA**

JOÃO PESSOA

2020

VANESSA POLYANA DE SOUSA BRITO

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs266729 DO GENE DA
ADIPONECTINA COM CONSUMO ALIMENTAR, PARÂMETROS
ANTROPOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS E DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM RETINOPATIA
DIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Nutrição do Centro de
Ciências da Saúde, Universidade
Federal da Paraíba como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B862a Brito, Vanessa Polyana de Sousa.

Associação do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina com consumo alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em pacientes com retinopatia diabética / Vanessa Polyana de Sousa Brito. - JoãoPessoa, 2020.

74 f. : il.

Orientação: Darlene Camati Persuhn.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Retinopatia diabética.
3. Polimorfismo do gene rs2667. 4. Adiponectina. I. Persuhn,
Darlene Camati. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição



**Ata da 231ª (duo centésima trigésima primeira)
Sessão Pública de Defesa de Dissertação para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Nutrição, da discente Vanessa Polyana de Sousa
Brito.**

Aos vinte e nove dias do mês de setembro de dois mil e vinte (29/09/2020), às 14:00 horas, reuniram-se em cerimônia pública *on line* por meio da ferramenta <https://meet.google.com/irx-qndt-bcw>, os membros da Banca Examinadora e a mestranda Vanessa Polyana de Sousa Brito, candidata ao grau de Mestre em Ciências da Nutrição. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Drª Darlene Camati Persuhn (Presidente/Orientadora), Dr. Alexandre Sérgio Silva (Examinador Interno), Drª Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves (Examinadora Interna Suplente), Drª Naila Francis Paulo de Oliveira (Examinadora Externa) e Drª Cristina Wide Pissetti (Examinadora Externa Suplente). Dando início a sessão pública, a Profª Drª Darlene Camati Persuhn, convidou a mim, Carlos Fernando da Silva para secretariá-los comunicando o fim específico da reunião. A seguir, foi cedida a palavra à examinada, para que no prazo estabelecido por Regimento fizesse sua exposição de motivos e objetivos de sua dissertação, metodologia adotada, resultados encontrados, discussão e conclusão, trabalho esse sob o título “Associação do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina com consumo alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em pacientes com retinopatia diabética”. Concluída a exposição, a candidata em seguida foi arguida sucessivamente por cada membro da banca examinadora. Dando continuidade, os senhores membros foram inquiridos pela Srª Presidente se estavam aptos a proferir o julgamento e, recebendo respostas afirmativas, procederam com a deliberação da avaliação. Após certo espaço de tempo, a Srª Presidente proclamou como “APROVADA” a dissertação intitulada “Associação do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina com consumo alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo em pacientes com retinopatia diabética”. A seguir, preenchendo devidamente os mapas concernentes aos valores e conceitos, declarou que sua autora estava em condições de receber o grau de Mestre em Ciências da Nutrição, devendo a Universidade Federal da Paraíba, providenciar na forma da lei a expedição do respectivo Diploma. Nada mais havendo a ser tratado, eu, Carlos Fernando da Silva Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros da Banca Examinadora.

João Pessoa, 29 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por tudo que tem feito em minha vida, por me dar forças para chegar até aqui, mesmo diante das dificuldades Deus está presente, segurando em minhas mãos e me fazendo acreditar que tudo dará certo.

Agradeço a minha família: a minha mãe Maria Correia, mãe você é um ser humano iluminado, só Deus para recompensar tudo que fazes por mim. E também a meu pai Antonio Amaro e a minha irmã Shirley, por todo amor de vocês por mim, por estarem comigo durante todo esse tempo, me ajudando, me orientando no que for necessário. Agradeço a Deus por ter escolhido essa família maravilhosa para mim. Ao meu esposo José Luiz por todo amor, apoio durante todo esse período, pelo incentivo para tentar a seleção do mestrado, por toda dedicação a nossa família.

Ao meu filho Luiz que veio durante o período do mestrado, obrigada por me fazer conhecer o amor mais lindo que existe no mundo (o amor de mãe), te amo demais meu Luiz.

Um agradecimento muito especial aos 98 pacientes (voluntários) da Unidade da Visão do HULW, que mesmo em meio às dificuldades, condições de saúde, se propuseram a participar e colaborar com nossa pesquisa, com muito boa vontade, sem vocês a pesquisa não existiria.

A minha orientadora professora Darlene Persuhn, por todo ensinamento e dedicação ao longo ao logo de todo processo de orientação, por sempre me apoiar em todos os momentos e por acreditar que nosso projeto daria certo.

Aos professores membros da banca, pela disponibilidade, correções e sugestões que ajudaram no aperfeiçoamento do trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/UFPB pela oportunidade e atenção no decorrer do curso.

As minhas companheiras de pesquisa: Tainá, Mylenne no laboratório por toda colaboração as análises moleculares. Carol não palavras para expressar tamanha gratidão por tudo que fizestes por mim, te admiro como profissional e pelo ser humano maravilhoso que és.

Agradeço a minha turma de mestrado Larissa, Marília, Maria Paula, Lizandro e de forma especial Rúbia (por todo apoio, colaboração e disponibilidade em ajudar sempre que precisei), por todos os momentos que vivemos e por serem pessoas especiais que levarei sempre em meu coração. Muito obrigada.

RESUMO

Retinopatia diabética é uma condição progressiva com alterações microvasculares que levam à isquemia retiniana, permeabilidade retiniana, neovascularização retiniana e edema macular. Se não forem tratados, os pacientes com RD podem sofrer perda visual grave. O polimorfismo rs266729 (11377C>G), localizado na região promotora da adiponectina, tem sido relacionado ao maior risco de diabetes e possível associação com RD associado à insulino terapia. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo geral analisar a associação do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina sobre consumo alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo, além dos estágios da RD. Trata-se de um estudo epidemiológico do tipo transversal, conduzido por 98 indivíduos atendidos na Unidade da Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB). Foram incluídos pacientes com diagnóstico de RD com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de ambos os sexos, divididos em dois grupos de acordo com os genótipos do rs266729. Os genótipos foram determinados pela técnica de PCR-RFLP em DNA isolado a partir de leucócitos. Amostras de sangue foram utilizadas para exames bioquímicos (glicose, HbA1C, colesterol total e frações, creatinina, proteína C reativa), malondialdeído (MDA) e capacidade antioxidante total (CAT). Além disso foram avaliados a pressão arterial, dados antropométricos e consumo alimentar (recordatórios de 24h). A amputação de membros e a terapia com insulina foram mais frequentes nos indivíduos portadores do alelo G (grupo CG + GG) quando comparados com os indivíduos CC. No entanto, o consumo de gordura saturada foi maior no grupo GC + GG do que no grupo CC. Análises de regressão logística mostraram a presença de alelo G esteve associada a amputação de membros ($p < 0,05$). A ocorrência do polimorfismo do gene rs266729 da adiponectina, embora tenha contribuído para o aumento do consumo de ácidos graxos saturados, não tem impacto nas variáveis cardiometabólicas, inflamatórias e de estresse oxidativo em indivíduos com RD. Assim, o rs266729 pode não ser um marcador genético determinante de piora em marcadores cardiometabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo, contudo está associado à amputação de membros em pacientes com RD.

Palavras-chave: adiponectina, diabetes *mellitus* tipo 2, retinopatia diabética, polimorfismo do gene rs266729

ABSTRACT

Diabetic retinopathy is a progressive condition with microvascular changes that lead to retinal ischemia, retinal permeability, retinal neovascularization and macular edema. If left untreated, patients with RD can suffer severe visual loss. The rs266729 (11377C>G) polymorphism, located in the adiponectin promoting region, has been related to a higher risk of diabetes and possible association with RD associated with insulin therapy. In this sense, the present study aimed to analyze the influence of the rs266729 polymorphism of the adiponectin gene on food consumption, anthropometric, biochemical, inflammatory parameters and oxidative stress in addition to the RD stages. This is a cross-sectional epidemiological study, conducted by 98 individuals seen at the Vision Unit of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba (HULW / UFPB). Patients diagnosed with DR with type 2 diabetes mellitus (DM2) of both sexes were included, divided into two groups according to the rs266729 genotypes. The genotypes were determined by the PCR-RFLP technique in DNA isolated from leukocytes. Blood samples were used for biochemical tests (glucose, HbA1C, total cholesterol and fractions, creatinine, C-reactive protein), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (CAT). In addition, blood pressure, anthropometric data and food consumption (24-hour recalls) were evaluated. Limb amputation and insulin therapy were more frequent in individuals with the G allele (CG + GG group) when compared to CC individuals. However, the consumption of saturated fat was higher in the GC + GG group than in the CC group. Logistic regression analyzes showed the presence of G allele was associated with limb amputation ($p < 0.05$). The occurrence of the adiponectin rs266729 gene polymorphism, although it contributed to the increase in the consumption of saturated fatty acids, has no impact on the cardiometabolic, inflammatory and oxidative stress variables in individuals with RD. Thus, rs266729 may not be a genetic marker that determines worsening of cardiometabolic, inflammatory and oxidative stress markers, however it is associated with limb amputation in patients with RD.

Keywords: adiponectin, type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy, rs266729 gene polymorphism

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Avaliação das variáveis antropométricas, bioquímicas e clínicas em pacientes com retinopatia diabética sem (grupo CC) e com (grupo CG + GG) o polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina.....	62
Tabela 2. Avaliação do consumo alimentar em pacientes com retinopatia diabética sem (grupo CC) e com (grupo CG + GG) polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina.....	63
Tabela 3. Modelo de regressão logística binária avaliando a influência do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina na ingestão alimentar, variáveis antropométricas, bioquímicas e clínicas.....	64
Tabela 4. Modelo de regressão logística binária verificando a influência da amputação de membros na ingestão alimentar, variáveis antropométricas e bioquímicas.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da retinopatia diabética proliferativa mediada pelo estresse oxidativo.....	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ADIPOQ</i>	Gene da adiponectina
BHR	Barreira hemato-retiniana
CT	Colesterol Total
DCVs	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
ERG	Eletrorretinografia
EMD	Edema macular diabético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IRMAs	Alterações microvasculares intra-retinianas
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MAs	Circulação microvascular
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinaminda Adenina de Nucleotideo Fostato Oxidase
ND	Nefropatia diabética
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C-reativa
PKC	Proteína quinase C
SOD	Superóxido dismutase
TG	Triglicerídeos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 DIABETES MELLITUS	13
2.2 RETINOPATIA DIABÉTICA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS	14
2.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DA RETINOPATIA DIABÉTICA.....	18
2.4 A ADIPONECTINA.....	22
2.4.1 Polimorfismo rs266729 no gene da adiponectina	24
2.5 O CONSUMO ALIMENTAR NA RETINOPATIA DIABÉTICA	25
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA	27
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	27
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	27
3.3 AMOSTRAGEM	27
3.4 COLETA DE DADOS	28
3.4.1 Caracterização clínica	28
3.4.2 Avaliação do Estado Nutricional	28
3.4.3 Coleta de amostras biológicas e Determinações bioquímicas	29
3.5 ANÁLISE MOLECULAR	30
3.5.1 Coleta e Extração do DNA Genômico de leucócitos	30
3.5.2 Genotipagem para o rs266729 (variante do gene <i>ADIPOQ</i>).....	31
3.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	32
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS	34
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE A - ARTIGO.....	49
APÊNDICE B-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	70
APÊNDICE C - INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS	72
APÊNDICE D - RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24 HORAS	73
ANEXO A - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	74

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença crônica causada por deficiência hereditária e/ ou adquirida na produção de insulina pelas células beta pancreáticas ou pela ineficácia da insulina produzida. Tal deficiência resulta em concentrações aumentadas de glicose no sangue, que por sua vez contribuem para efeitos deletérios sobre vários órgãos e sistemas do corpo, em particular os vasos sanguíneos e nervos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A retinopatia diabética (RD) é uma das principais causas de perda visual irreversível no mundo, considerada a maior causa de cegueira na população entre 16 e 64 anos. Quanto maior o tempo de evolução do diabetes mellitus (DM), maior é o risco de RD que acomete cerca de 60% daqueles com DM tipo 2 após 20 anos de doença sistêmica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

De acordo com o “*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*” a RD pode ser classificada em retinopatia não proliferativa leve, moderada e severa ou em retinopatia proliferativa, decorrente do grau de severidade da RD (WILKINSON et al., 2003). Logo, é razoável inferir que o entendimento das principais alterações patofisiológicas nos diferentes estágios da RD se configura como essencial para o direcionamento de estratégias terapêuticas efetivas para os pacientes com RD.

O aumento de processos inflamatórios e o estresse oxidativo, compreendido por um déficit na capacidade antioxidante e elevação na produção de espécies reativas, das quais as mais importantes metabolicamente são as espécies reativas de oxigênio e radicais livres, que desempenham um papel fundamental na patogênese da RD (CALDERON et al., 2017). Adicionalmente, as adipocinas, em especial a adiponectina, constituem um grupo de moléculas bioativas derivadas do tecido adiposo, exercem um papel importante na regulação de diversos processos biológicos, tais como apetite, metabolismo, sensibilidade à insulina, inflamação e estresse oxidativo (KUO et al., 2015; AFARID et al., 2017; LI; SHEN, 2019).

Níveis elevados de adiponectina têm sido considerados como “antidiabético” em virtude da ação da adiponectina no aumento da sensibilidade à insulina e redução da inflamação e do estresse oxidativo (SPRANGER et al., 2003; LI; SHEN, 2019). Em

estudos epidemiológicos, os baixos níveis séricos de adiponectina e variações genéticas no gene da adiponectina previram o risco de 13% a mais de chances de desenvolver diabetes tipo 2 e evidências sugerem que podem afetar os níveis séricos de adipocinas e causar resistência à insulina (FUMERON et al., 2004; SUN et al., 2017).

O polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina parece reduzir a expressão do RNAm do gene da adiponectina e aumentar o risco de inflamação, estresse oxidativo, resistência à insulina e diabetes mellitus (FUMERON et al., 2004; PRIOR et al., 2009).

Embora a relação entre os polimorfismos no gene da adiponectina com níveis séricos da adiponectina, resistência à insulina, inflamação e estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 tenham avançado nos últimos anos, a função da adiponectina na patogênese da RD ainda é inconclusiva. Estudos prévios demonstraram que os níveis séricos de adiponectina são elevados em pacientes com RD e correlacionados positivamente com a severidade da RD, sugerindo que os níveis séricos de adiponectina poderiam ser utilizados como um mediador biológico importante na RD (KUO et al., 2015; LIAO et al., 2019). Em contrapartida, um estudo de base populacional desenvolvido na China com 372 pacientes com RD não encontrou relação entre quatro polimorfismos no gene adiponectina, a citar: rs266729, rs822394, rs2241766 e o rs1501299 com os níveis séricos de adiponectina e com RD (LI et al., 2014).

Embora os estudos supracitados atestem resultados discrepantes no tocante à RD, nenhum investigou se polimorfismos no gene da adiponectina estariam relacionados com o estágio da severidade da RD e com os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi analisar a associação do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina sobre consumo alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do estresse oxidativo, além dos estágios da RD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIABETES MELLITUS

Dados recentes mostram que aproximadamente 150 milhões de pessoas têm diabetes mellitus em todo o mundo e que este número pode dobrar até o ano 2025 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Diabetes mellitus (DM) é uma doença de importância epidemiológica indiscutível acometendo cerca de 463 milhões de adultos (20-79 anos) em todo o mundo, o que corresponde a 8,3% da população mundial. No Brasil, o número chega a 16,8 milhões, e o país se posiciona em 5º lugar no ranking mundial. Caso as tendências de crescimento e estilo de vida atual persistam, estima-se que em 2045 o número de diabéticos possa ser superior a 700 milhões em todo o mundo e em torno de 26 milhões no Brasil (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Grande parte deste aumento ocorrerá nos países em desenvolvimento e será devido ao crescimento populacional, envelhecimento, hábitos alimentares inadequados, obesidade e estilos de vida sedentários (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O Diabetes pode ser classificado em tipo 1 que ocorre devido à destruição auto-imune de células β , geralmente levando a deficiência de insulina; tipo 2 devido a uma perda progressiva de secreção de insulina de células β , frequentemente apresentando resistência à insulina; Diabetes mellitus gestacional (DMG) que é o tipo de diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez. Existem outros tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, síndromes monogênicas do diabetes (como diabetes neonatal e diabetes de início da maturidade dos jovens, doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite), e também o diabetes induzido por drogas ou produtos químicos como o uso de glicocorticóides, no tratamento HIV / AIDS, ou após o transplante de órgãos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

As complicações crônicas do DM são decorrentes principalmente do controle inadequado, do tempo de evolução e de fatores genéticos da doença. As complicações crônicas microvasculares englobam a nefropatia diabética (ND), a retinopatia diabética (RD) e a neuropatia diabética. As complicações crônicas macrovasculares são resultantes de alterações nos grandes vasos e causam infarto agudo do miocárdio,

acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. O risco relativo de morte devido a complicações vasculares é três vezes maior nos pacientes com DM do que na população restante com as doenças cardiovasculares (DCVs), sendo responsáveis por até 80% dos óbitos em portadores de DM (TSCHIEDEL, 2014).

2.2 RETINOPATIA DIABÉTICA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS

O olho é um dos principais órgãos vulneráveis aos efeitos nocivos da hiperglicemia no DM, sendo a RD uma das mais conhecidas complicações microvasculares relacionadas ao DM (HENRIQUES et al., 2015).

No Brasil, dados estimam que a RD afeta cerca de 35 a 40% dos pacientes com DM. Isso reflete que um número aproximado de 4 milhões de pessoas apresentam algum grau de comprometimento relacionado à RD (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

O edema macular diabético (EMD) é a principal alteração responsável por perda irreversível de acuidade visual, tendo prevalência de 7% na população com RD (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). O EMD resulta de danos crônicos às estruturas neurovasculares da retina. A fisiopatologia do dano retiniano permanece incerta, mas inclui insultos metabólicos e neuroinflamatórios. Esses mecanismos são direcionados pelo controle metabólico intensivo da doença sistêmica e pelo uso de agentes antiinflamatórios oculares, incluindo inibidores do fator de crescimento endotelial vascular e corticosteroides (COHEN; GARDNER, 2016).

O controle glicêmico é o fator de risco modificável associado com o desenvolvimento da RD. Há um consenso de que a duração da diabetes e da gravidade da hiperglicemia são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da patologia (GILOYAN et al., 2015; AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY RETINA, 2017; KELVIN et al., 2020). A hiperglicemia desempenha um papel proeminente em uma cascata de efeitos moleculares e celulares prejudiciais, como estresse oxidativo, ativação da via dos poliois, via da hexosamina, glicosilação anormal e inflamação, que podem contribuir para o desenvolvimento e a gravidade da RD (HAMPTON et al., 2015; SANTIAGO et al., 2018. Estudos epidemiológicos em grande

escala, como o Diabetes Control and Complications Trial e o United Kingdom Prospective Diabetes Project, revelaram a forte relação entre o controle glicêmico inadequado com o desenvolvimento e progressão da RD (ZHANG et al., 2001; HOLMAN et al., 2008). O mecanismo atualmente mais explorado no contexto da RD é o estresse oxidativo que tem relação direcionada ao dano endotelial (MAHAJAN et al., 2019).

Embora a incidência da RD esteja fortemente relacionada com a duração do diabetes, diversos outros fatores, oculares ou sistêmicos, podem de alguma forma, influenciar o aparecimento ou o curso natural dessa complicação. Estudos prospectivos demonstraram a importância do controle glicêmico na prevenção da RD: o controle terapêutico intensivo retarda a sua progressão e o risco se reduz em cinco ou mais vezes quando comparado ao tratamento convencional (BOSCO; GONÇALVES, 2004; HOLMAN et al., 2008). O grande problema é que o rígido controle da glicemia para evitar a complicação e sua progressão é difícil de ser conquistado e também de ser mantido.

A HbA1c, como um indicador bem estabelecido de controle glicêmico (MANLEY et al., 2003) foi reconhecida como um dos mais importantes fatores de risco modificáveis para complicações microvasculares, incluindo RD (YAU et al., 2012). Em vista da crescente prevalência de complicações diabéticas, organizações internacionais, como a American Diabetes Association, recomendaram uma HbA1c de <7% (53 mmol / mol) como a meta geral para o controle glicêmico para reduzir complicações entre pacientes com diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). A hiperglicemia crônica resulta em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e ativa vias metabólicas paralelas incluindo proteína quinase C (PKC), via dos poliois, via da hexosamina além de induzir a produção de mediadores inflamatórios (SANTIAGO et al., 2018). Contudo, o mecanismo atualmente mais explorado no contexto da RD é o estresse oxidativo que tem relação direcionada ao dano endotelial (MAHAJAN et al., 2019).

Clinicamente, as alterações que originam as lesões do fundo do olho na RD podem agrupar-se em três categorias: a) as alterações que resultam da lesão estrutural da parede dos vasos da circulação microvascular (MAs), b) as alterações que resultam do derrame da circulação microvascular da retina (hemorragias, exsudatos lipídicos e edema da retina), e c) os achados resultantes da isquemia com uma produção excessiva

anormal de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (exsudatos algodinosos, alterações microvasculares intra-retinianas (IRMAs), neovascularização pré-retiniana, proliferação fibrosa e hemorragia do vítreo (WONG, 2010). É importante avaliar o número das lesões e a área da retina envolvida por cada uma destas características clínicas de RD, porque dela depende a classificação da gravidade da RD.

Além disso, a hipertensão arterial exacerba a RD por alterações hemodinâmicas e vias dependentes de VEGF. O fluxo sanguíneo na artéria retiniana é regulado de forma estável por autoregulação em indivíduos saudáveis. No entanto, o fluxo retinal está aumentado em pacientes hipertensos com DM, sugerindo uma associação entre DM, hipertensão e fluxo sanguíneo retinal (YAMAZAKI et al., 2018).

A RD pré-clínica caracteriza-se pela ausência de lesões à oftalmoscopia, com existência de alterações histopatológicas iniciais de microangiopatia com proliferação endotelial nos capilares e vénulas, edema e degenerescência endotelial nas arteríolas de menor calibre, bem como das lesões dos pericitos e alterações neuronais funcionais, demonstradas na Eletroretinografia (ERG) multifocal, e alterações da visão cromática (CUNHA-VAZ et al., 2014).

Para a classificação da RD, a “*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*” desenvolveu uma escala clínica internacional de acordo com o grau de severidade da RD que representa uma versão reduzida da classificação da RD do *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)*, adotada em 2003 pela Academia Americana de Oftalmologia e usada em vários estudos clínicos. Ela descreve três estágios de retinopatia não proliferativa, um quarto estágio de retinopatia não proliferativa severa e um quinto estágio de retinopatia proliferativa:

- 1 Ausência de retinopatia: ausência de sinais aparentes de RD
- 2 Retinopatia diabética não proliferativa leve (RDNP leve): caracterizada pela presença de microaneurismas, apenas.
- 3 Retinopatia diabética não proliferativa moderada (RDNP moderada): caracterizada pela presença de exsudatos, hemorragias superficiais, hemorragias puntiformes (dot), hemorragias em borrão (blot) e alterações venosas (dilatação e tortuosidade generalizadas, segmentação -beading ou sausage-like – e formação de alças looping), sem, contudo, atingir as características que definem a RDNP severa. Além desses sinais, manchas algodinosas e hemorragias intrarretinianas profundas (arredondadas e mais

escuras que as mais superficiais) podem estar presentes, indicando isquemia progressiva.

4 Retinopatia diabética não proliferativa severa (RDNP severa): caracterizada pela ausência de neovascularização e presença de pelo menos um dos seguintes sinais:

- Hemorragias intrarretinianas nos 4 quadrantes;
- Alterações venosas em pelo menos 2 quadrantes;
- Anormalidades microvasculares intrarretinianas (AMIR) em pelo menos 1 quadrante.

5 Retinopatia proliferativa (RP): caracterizada pela presença de neovasos no fundus e/ou hemorragia vítrea ou pré retiniana. Os neovasos podem ser de disco óptico (no disco ou dentro de um diâmetro de disco do disco óptico) ou *NVE* (*neovascularization else where* neovascularização em qualquer outra região do fundus) (WILKINSON et al., 2003).

Os vasos da retina são caracterizados por células endoteliais contínuas, não fenestradas, com junções intercelulares impermeáveis, que se apresentam para formar a barreira hemato-retiniana (BHR). A interação entre as células endoteliais formam a barreira que permite ao tecido, assim como ao endotélio capilar e ao epitélio pigmentar da retina, criarem condições para um tecido com integridade funcional. Podemos encontrar três tipos de junções intercelulares que fazem essa mediação no endotélio: as junções ou zonas de oclusão (*tight junctions*), as zonas de adesão e as junções *gap*. No DM, encontramos com frequência uma ruptura destas junções, principalmente das junções de oclusão (ISHIBASHI; INOMATA, 1993; IMESCH, et al., 1997). A ruptura destas junções, a chamada quebra da BHR, é considerada a marca da RD e caracteriza uma gama de complicações como o edema macular. Além disso, precede a neovascularização que pode levar à cegueira (HIRSCHI; D'AMORE, 1997; POLAK et al., 1997). Nos capilares retinianos dos pacientes com DM, sob a luz da microscopia eletrônica, pode-se observar alterações como pericitos com alterações degenerativas e espessamento da membrana (lâmina) basal do capilar, um fenômeno que ocorre unânime e precocemente no DM (POLAK et al., 1997). Este espessamento altera a função celular e/ou a difusão de oxigênio e reduz o contato entre os pericitos e a célula endotelial, contribuindo para as alterações vasculares dos diabéticos (BOSCO et al., 2005).

A RD divide-se principalmente em lesões que necessitam de vigilância oftalmológica regular para avaliar a sua estabilização ou progressão ao longo do tempo

e as lesões que causam baixa de visão e que necessitam de tratamento, o EMD e a RDP (CUNHA-VAZ et al., 2014).

A ameaça à visão produzida pela RD ocorre a partir de duas vias: crescimento de neovasos que levam a hemorragia intraocular e descolamento de retina, com profunda perda global da visão, e um dano mais localizado, envolvendo a região macular, determinando perda da acuidade visual central (ROYAL COLLEGE OF OPHTHALMOLOGIST, 2012).

A relação entre concentração de lipídios no sangue e RD tem sido controversa, e uma recente metanálise apontou ausência de efeito de triglicerídeos, HDL e colesterol total, com modesta influência dos níveis de LDL colesterol (ZHOU et al., 2018). Quanto à progressão, há controvérsia quando à influência dos lipídios, enquanto há resultados que indicam que não há influência dos lipídios plasmáticos, há dados que relacionam o aumento de triglicerídeos com o desenvolvimento de RDP (CIKAMATANA et al., 2007, SRINIVASAN et al., 2017).

Há menos evidências entre os estudos que tratam sobre a importância de outros fatores como a idade, tipo de diabetes, fatores de coagulação, doença renal, sedentarismo, marcadores inflamatórios, e uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY RETINA, 2017). Muitos desses fatores estão associados à morbimortalidade cardiovascular e outras complicações associadas à diabetes (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY RETINA, 2017).

2.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DA RD

As espécies reativas de oxigênio (EROs) consistem em moléculas quimicamente instáveis sintetizadas durante o metabolismo normal do oxigênio com papel importante na sinalização celular e na homeostase. São produzidas através de uma reação de oxidação do complexo enzimático Nicotinamina Adenina de Nucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH-oxidase) para o oxigênio na cadeia respiratória, o qual é reduzido e transformado em ânion superóxido, uma molécula altamente reativa e com elevada capacidade de lesão e morte celular (SIES, 2015).

Os seres vivos dispõem de um sistema fisiológico enzimático antioxidante, cuja principal função é neutralizar as espécies pró-oxidantes produzidas naturalmente pelo metabolismo energético. Tal sistema antioxidante enzimático é formado principalmente pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. A enzima SOD exerce um papel fundamental para reação de dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença do cobre, zinco e manganês, enquanto a catalase e glutathione peroxidase são responsáveis por converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio molecular ($1/2 O_2$) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; HALLIWELL, 2012; BISWAS, 2016).

Além do sistema antioxidante enzimático, compostos antioxidantes naturais advindos da dieta, tais como flavonóides, antocianinas, compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis podem atuar inibindo a ação dos radicais livres sobre as membranas celulares (BREWER, 2011).

Níveis elevados de EROs podem refletir desequilíbrios entre a produção de EROs e a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar facilmente os intermediários reativos ou para reparar o dano resultante (DENG et al., 2015; BISWAS, 2016).

Estresse oxidativo é o fenômeno no qual há níveis elevados de EROs associados com redução na capacidade antioxidante que pode contribuir para lesão celular através de pelo menos três reações: a peroxidação lipídica das membranas, a modificação oxidativa de proteínas intracelular, e dano oxidativo ao DNA. Estas reações oxidativas modificam a estrutura de biomoléculas e causam prejuízos às funções celulares (DENG et al., 2015; NITA; GRZYBOWSKI, 2016; RANI et al., 2016).

O estresse oxidativo tem sido considerado um dos principais fatores de desencadeamento da RD uma vez que a retina é suscetível devido ao seu estado hipermetabólico e exposição à luz (NATARAJAN et al., 2011; CALDERON et al., 2017; SANTIAGO et al., 2018).

Os níveis de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio têm demonstrado ser substancialmente elevada em modelos animais de RD (ELLIS et al., 2000). Mesmo as retinas normais parecem ser particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, devido a um alto consumo de oxigênio, altos níveis de substratos de oxidação e exposição à luz (ARDEN et al., 2011). O processo de angiogênese exacerbado na RD tem sido descrito como uma alteração patológica comum associada à produção elevada de EROs

(CHUNG; FERRARA, 2011) e tem sido fortemente associado a uma maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é um dos principais responsáveis pela distorção da microvasculatura e deslocamento da retina (RUEF et al., 1997; LU et al., 1998; LI et al., 2010).

O VEGF é o principal fator de crescimento angiogênico específico do endotélio, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A sinalização de VEGF é necessária para o desenvolvimento vascular normal e a homeostase (SHIBUYA, 2008). A via de sinalização entre VEGF e EROs parece ser afetada de modo bidirecional. Por exemplo, a produção de EROs através da maior atividade da NADPH oxidase pode causar ativação do fator induzível à hipóxia alfa ($\text{HIF1}\alpha$) e subsequentemente acarretar elevação na expressão de VEGF em vários tipos de células, como células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos. Em contrapartida, o aumento na expressão de VEGF induz a migração e proliferação de células endoteliais por meio de um aumento de EROs intracelular (RUEF, et al., 1997; USHIO-FUKAI et al., 2002; WANG et al., 2011). Assim, a reciprocidade entre o estresse oxidativo e a angiogênese foi centrada na via de sinalização do VEGF (BIR et al., 2012), a qual pode ser melhor visualizada na **Figura 1**.

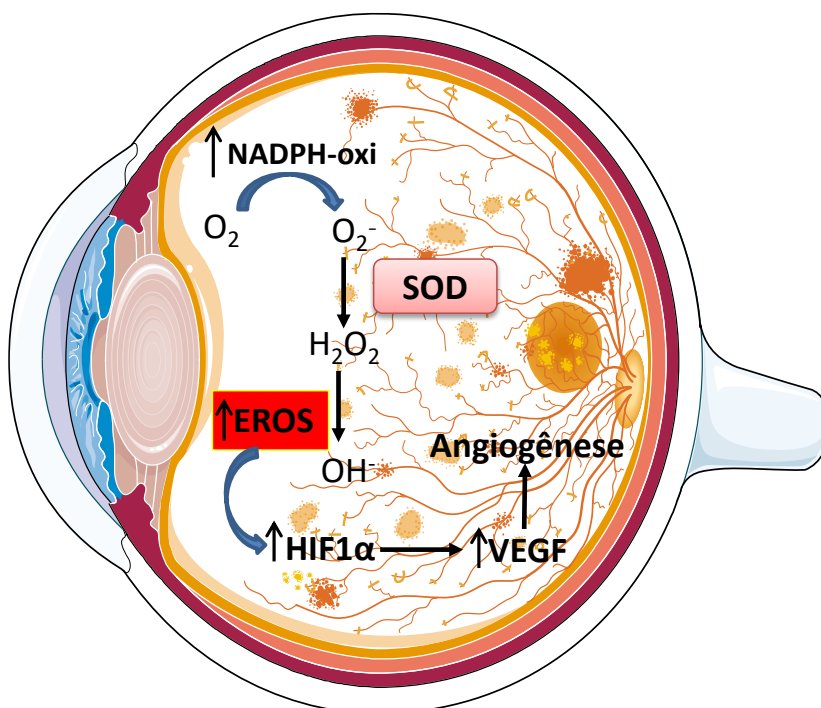


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da retinopatia diabética proliferativa mediada pelo estresse oxidativo. O desenho representa o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo pode levar ao processo de angiogênese na retina.

Siglas: EROS (Espécies reativas de oxigênio); NADPH-oxi (Nicotinaminda Adenina de Nucleotideo Fostato Oxidase); O_2^- (ânion superóxido); SOD (superóxido dismutase desidrogenase); HIF1 α (Fator induzível a hipóxia alfa); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Fonte: compilação do autor.

Considerando o papel importante do VEGF na angiogênese da retina, a terapia intraocular com anti-VEGF, embora com algumas limitações na efetividade, tem sido clinicamente utilizada para pacientes em estágios finais da RD (SINGER et al., 2016).

Além do estresse oxidativo, durante a patogênese da RD, mediadores inflamatórios estão elevados antes que sejam observadas alterações anatômicas ou histopatológicas. Em parte, essa alteração é decorrente da hiperglicemia, a qual induz desregulação metabólica que provoca um mau funcionamento das células e um estado de inflamação crônica (SIES, 2015).

A inflamação é uma resposta inespecífica á lesão ou estresse que inclui uma variedade de mediadores funcionais e moleculares. Evidências apontam esse processo como sendo crítico para o desenvolvimento de RD (ADAMIS et al., 2002; KERN et al., 2007; NODA et al., 2012) pois pode potencialmente desestabilizar o equilíbrio homeostático dos olhos (JOSHI et al., 1999 ; CASQUEIRO et al., 2012 ; KITAGAKI et al., 2016 ; HELLER et al., 2017), contribuindo , em longo prazo, para danos nas funções celulares do indivíduo e desenvolvimento da complicação (ZHANG et al., 2011 ; WHITCUP et al., 2013 ; ASCASO et al., 2014).

A regulação positiva dos mediadores inflamatórios e uma reação cruzada entre eles provocam alterações microvasculares e quebra da barreira hemato-retiniana (HOMME et al., 2018). Muitas citocinas e quimiocinas inflamatórias aumentam em amostras séricas e oculares (humor vítreo e aquoso) de pacientes diabéticos com RD (RÜBSAM et al., 2018).

Várias citocinas inflamatórias - IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e MCP-1 - foram relatadas elevadas nos tecidos oculares de pacientes com RD não proliferativa. Um estudo detectou níveis ainda mais altos de IL-8 e TNF- α em olhos diabéticos com RDNP do que com RDP (BOSS et al, 2017). O aumento dessas citocinas produzidas por microglia ativada, células endoteliais, macroglia e, posteriormente, até neurônios, destacam o aumento da atividade dessas citocinas inflamatórias nos estágios iniciais da RD e a progressão da resposta inflamatória em todos os tipos de células da retina (WU

et al., 2017). Em conjunto, essas informações descritas para um importante envolvimento do estresse oxidativo e inflamação e, o controle desses processos, contribuindo para o desenvolvimento de anormalidades vasculares da retina.

2.4 A ADIPONECTINA

A adiponectina é uma citocina secretada por adipócitos que regula a sensibilidade à insulina e também pode estar envolvida na melhora do processo inflamatório e protege contra apoptose (YE; SCHERER, 2013). Os níveis de adiponectina são reduzidos em camundongos diabéticos obesos (MAEDA et al., 2002) e a reposição de adiponectina melhora a sensibilidade à insulina (YAMAUCHI et al., 2001). Em adição, baixos níveis de adiponectina circulante tem sido relatado em indivíduos com obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (KUO et al., 2015).

A adiponectina varia de acordo com o índice de massa corporal com níveis mais baixos em pessoas obesas (LANG et al., 2011) e no DM2 (PYRZAK et al., 2010), consequentemente baixos níveis de adiponectina plasmática pode desempenhar um papel na etiologia da resistência à insulina e do DM2, implicando o gene adiponectina (*ADIPOQ*) na suscetibilidade ao DM tipo 2 (CHIODINI et al., 2010; GONG et al., 2010).

Tem sido demonstrado que a adiponectina atuando nos receptores AdipoR1 e AdipoR2 exerce atividade anti-inflamatória e melhora a sensibilidade periférica à insulina (HERDER et al., 2013), como também contribui para reduzir o estresse oxidativo e complicações microvasculares em DM1 e DM2 (RASCHE et al., 2008; ZHA et al., 2017).

O tecido adiposo é hoje reconhecido como um importante órgão endócrino, capaz de secretar um grande número de fatores endócrinos que regulam uma ampla variedade de funções fisiológicas. A adiponectina é um desses fatores, secretada em grandes quantidades principalmente pelo tecido adiposo. Após a ligação aos seus receptores, AdipoR1 e R2, a adiponectina inicia uma série de eventos de transdução de sinal dependentes de tecido, incluindo fosforilação de monofosfato de adenosina (AMPK) e proteína quinase ativada por mitogênio p38 (MAPK p38) e aumento da

atividade do ligante do receptor alfa ativado de proliferador de peroxissoma (PPAR α). AdipoR1 e R2 também possuem atividade de ceramidase, resultando em uma diminuição na ceramida intracelular, um esfingolípídeo que tem sido implicado na resistência à insulina, morte celular, inflamação e aterosclerose. A adiponectina estimula a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e inibe a produção de glicose no fígado, resultando em uma melhora na homeostase energética de todo o corpo. É um agente antiinflamatório clássico que resulta na proteção da vasculatura, coração, pulmão e cólon (FANG; JUDD, 2018).

Um estudo demonstrou que o tratamento com a administração de AdipoRon, um mimético sintético da adiponectina e agonista dos receptores AdipoR1 e a AdipoR2, melhorou a sensibilidade à insulina e o tempo de vida em ratos diabéticos tipo 2, sugerindo uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de diabetes tipo 2 e suas complicações (IWABU et al., 2013). Nos ratos com diabetes tipo 2, a adiponectina restaura a função das células endoteliais com a diminuição do estresse oxidativo (WONG et al., 2011). Assim, experimentalmente, a adiponectina está associada à melhora da função mitocondrial, melhora a sensibilidade à insulina e efeitos anti-inflamatórios indicando que a adiponectina pode proteger de complicações diabéticas, como a retinopatia diabética (FU et al., 2016).

Em um estudo transversal realizado com 198 pacientes japoneses com diabetes mellitus tipo 2, verificou-se que a adiponectina apresentou-se elevada em pacientes com RDP (KATO et al., 2008). Além disso, em pacientes diabéticos tipo 2, as concentrações de adiponectina são aumentadas no humor aquoso e no plasma de indivíduos com RDP, possivelmente devido ao aumento da permeabilidade da barreira hemato-retiniana com progressão da RD. Níveis muito baixos de adiponectina plasmática no humor cerebral e humor aquoso são relatados em comparação com os níveis circulantes, sugerindo um papel da barreira hematoencefálica e da retina sanguínea na homeostase da adiponectina. Existe também a possibilidade de indução da expressão local de adiponectina nas retinas diabéticas (MAO et al., 2012).

Uma explicação para o achado paradoxal de adiponectina elevada na RD é que a adiponectina pode ter um papel duplo, pró-inflamatório e anti-inflamatório (FANTUZZI, 2008). Vários relatos demonstraram uma correlação negativa de adiponectina e marcadores de inflamação para condições como diabetes tipo 2, obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, onde os níveis de

adiponectina geralmente são baixos (OUCHI et al., 2006). Nessas condições, a adiponectina pode exercer uma série de atividades anti-inflamatórias, incluindo inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6), prevenção da expressão da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), indução de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e proteção de células endoteliais (OUCHI et al., 2006; LARA-CASTRO et al., 2007; YE; SCHERER, 2013). Por outro lado, a adiponectina está positivamente correlacionada com marcadores de inflamação em doenças inflamatórias e autoimunes crônicas clássicas (FANTUZZI, 2008) e diabetes tipo 1 (HADJADJ et al., 2005). Além disso, a adiponectina parece exercer um papel importante na angiogênese (SHIBATA et al., 2004). No entanto, ainda não foi elucidado se isso teria algum papel na angiogênese associada à RDP. Assim, a adiponectina exerce funções diferenciais, e seu efeito na RD, uma complicação do diabetes tipo 1 e tipo 2, ainda carece de elucidação (KUO et al., 2015).

2.4.1 Polimorfismo rs266729 no gene da adiponectina

O gene da adiponectina encontra-se na região cromossômica 3q27, um locus de possível susceptibilidade para síndrome metabólica e diabetes (POLLIN et al., 2005; ULU et al., 2018).

O polimorfismo rs266729 (11377C>G), localizado na região promotora do gene que codifica a adiponectina, que possui 3 éxons e 2 íntrons, em especial os genótipos GC e GG tem sido relacionado ao maior risco cardiovascular (VIONNET et. al, 2000; HEGENER et al., 2006; GABLE et al., 2007). A variante rs266729 consiste de uma substituição C/G na posição -11377 que sobrepõe um dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 resultando em menor atividade de transcrição na presença do alelo raro G (LAUMEN et al., 2009; SRINIVASAN et al, 2017). Portanto, é possível que os portadores do alelo rs266729 G apresentem níveis menores de adiponectina, afetando a produção da molécula.

Em metanálise envolvendo amostras de asiáticos, sul africanos, iranianos, indígenas (Pima), o alelo rs266729 G mostrou-se associado a DM2 (HAN et al., 2011). Em estudo mais recente, o mesmo alelo mostrou o mesmo efeito em população iraquiana, apontando que portadores do genótipo homozigoto (GG) tem risco três vezes

maior de desenvolvimento de DM tipo 2; enquanto o risco do genótipo (CG) foi duas vezes maior. Portadores do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina são mais propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, afetando o HDL e os níveis de insulina (KAFTAN; HUSSAIN, 2015).

Estudos entre esse polimorfismo e RD são escassos, mas em população chinesa, evidenciou-se uma possível associação entre pacientes diabético com RD que fazem o uso de insulinoterapia e apresentam o alelo rs266729 G (LI et al., 2015).

2.5 O CONSUMO ALIMENTAR NA RETINOPATIA DIABÉTICA

Numa revisão sistemática sobre a relação entre a ingestão alimentar e a RD mostrou (na maioria dos estudos) que a ingestão de fibra alimentar, peixes oleosos e uma dieta mediterrânea tiveram efeito protetor nos pacientes com RD. Em contraste, sódio e carboidratos não foram associados à RD, enquanto a alta ingestão calórica total pode estar associada ao maior risco de RD. A relação entre a RD e vários componentes dietéticos comuns, incluindo antioxidantes, ácidos graxos, proteínas, álcool e bebidas, como chá e café, permaneceu obscura, sugerindo que mais pesquisas, incluindo estudos longitudinais, para compreender melhor essas relações (WONG et al., 2018).

Evidências de um efeito protetor da fibra alimentar, frutas e vegetais e peixes oleosos na RD, consistente com a literatura atual (SASAKI et al., 2015; MILLEN et al., 2016). A maioria das frutas e vegetais são alimentos de baixo índice glicêmico, ricos em antioxidantes e fibra dietética. A ingestão de fibras dietéticas tende a modular a resposta pós-prandial da glicose e, portanto, é proposta para reduzir os danos induzidos pela glicose à retina (FOSTER-POWELL et al., 2002). Da mesma forma, os antioxidantes são propostos para diminuir o estresse oxidativo na retina embora até agora não exista uma associação clara entre antioxidantes e RD. O peixe oleoso é uma fonte rica em vitamina D e LCω3PUFAs (MILLEN et al., 2016) e é proposto que as propriedades imunomoduladoras e antiangiogênicas desses nutrientes podem desempenhar um papel na inibição de RD.

Há relatos de que a dieta mediterrânea é protetora para a RD, pois é reconhecida como um dos padrões dietéticos mais saudáveis com vários componentes, incluindo azeite de oliva, vinho tinto, fibra e cereais propostos para aliviar os fatores patogênicos

das complicações microvasculares do diabético, como inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina (SAFI et al., 2014).

Alternativamente, a descoberta de que uma alta ingestão calórica total pode aumentar o risco de incidência e progressão de RD concorda com a evidência experimental e clínica sugerindo que a ingestão calórica mais elevada aumenta a carga metabólica e o estresse oxidativo em pessoas com diabetes, e pode aumentar o risco de desenvolver RD na retina suscetível ao estresse oxidativo (ROY; JANAL, 2010).

As estratégias nutricionais podem reduzir o risco de desenvolver RD revelando-se bastante benéficas em casos de RD resistente aos tratamentos convencionais. A terapêutica nutricional pode preservar a fisiologia normal, estrutura e funções da retina. Abordagens nutricionais têm um alto potencial para ser desenvolvida como terapia adjuvante para interromper a ocorrência ou progressão de RD em estágios iniciais e pode servir como um tratamento não invasivo e de baixo custo que pode ser adequada a cada nível socioeconômico. Enquanto as modalidades de tratamento atuais são mais invasivas, caras e não comprovadas para uso prolongado devido aos efeitos colaterais, as abordagens nutricionais podem evoluir como terapias complementares confiáveis para a RD e consequentemente inibindo o desenvolvimento de retinopatia e subsequente perda visual em indivíduos diabéticos (SHARMA et al., 2017).

3. ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo epidemiológico do tipo transversal que se caracteriza pela observação direta de determinado fator e efeito em indivíduos em uma única oportunidade (KLEIN; BLOCH, 2009). Com indivíduos com diagnósticos de Retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) leve, moderada, severa e com Retinopatia diabética do tipo proliferativa. Após os resultados, os indivíduos foram divididos em dois grupos, a saber: Grupo 1 portadores do genótipo rs266729 CC e Grupo 2 constituído de pacientes genótipo rs266729 CG + GG.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos propostos no presente estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba - HULW-UFPB, com número do CAAE 99840118.3.0000.5183 e parecer: 4.214.108 (ANEXO A). O estudo foi conduzido seguindo os procedimentos e os padrões éticos da instituição e estavam em cumprimento com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde /Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Os pacientes foram informados pela pesquisadora sobre os objetivos e as etapas do estudo, e os que manifestaram desejo de participar do estudo e deram ciência de seu consentimento mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram incluídos na pesquisa (APÊNDICE A).

3.3 AMOSTRAGEM

A amostra foi constituída por 98 indivíduos atendidos na Unidade da Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB) entre os períodos de dezembro de 2018 a março de 2020. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de Retinopatia diabética em Diabetes *Mellitus* apenas do tipo 2 (DM2), de ambos os sexos. Foram excluídos do estudo indivíduos que desistiram da pesquisa e com amostras com DNA insuficiente.

3.4 COLETA DE DADOS

3.4.1 Caracterização clínica

O diagnóstico de retinopatia foi definido por exame da retina realizado por oftalmologista da Unidade da Visão (HULW) utilizando como critérios de classificação os adotados pela Academia Americana de Oftalmologia (WILKINSON et al., 2003).

Foi realizada coleta de sangue em todos os voluntários, após jejum de 8 horas e preenchido formulário contendo a identificação do tipo de retinopatia diabética em que ele foi diagnosticado, dados referentes a variáveis sócio-demográficas (estado civil, ocupação, número de membros da família, escolaridade), antecedentes pessoais e familiares, tipos de tratamentos realizados, associação com outras doenças crônicas, variáveis antropométricas.

A aferição dos níveis de pressão arterial foi realizada pelo método auscultatório utilizando esfigmomanômetro aneróide previamente calibrado contra uma coluna de mercúrio seguindo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC, SBH, SBN, 2010).

3.4.2 Avaliação do Estado Nutricional

Para aferir o peso foi utilizada uma balança digital com capacidade para até 150 kg e sensibilidade de 100g. Os indivíduos foram pesados com roupas leves, descalços, com postura ereta, pés paralelos e inteiramente apoiados na plataforma da balança e com braços ao longo do corpo (BRASIL, 2011).

A altura foi aferida utilizando o estadiômetro. Os indivíduos estavam com postura ereta, pés juntos e calcanhares encostados na parede. O ápice da orelha e o canto externo do olho ficaram em linha paralela ao chão, formando um ângulo de 90° com a barra do estadiômetro, assim, a barra horizontal do estadiômetro era abaixada e apoiada na cabeça, permitindo a leitura em centímetros (BRASIL, 2011).

O Índice de Massa Corporal foi calculado dividindo-se o peso (em kg), pela altura (em metros), ao quadrado. Os valores obtidos categorizados em baixo peso, peso normal, sobrepeso ou obesidade de acordo com os pontos de corte da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000).

As circunferências utilizadas foram da cintura (CC) e do quadril (CQ). Todas foram realizadas com as pacientes em pé, com o abdômen e braços relaxados ao lado do corpo, utilizando fita métrica inelástica com precisão de 1mm. A CC foi mensurada com a fita posicionada horizontalmente no ponto médio entre a borda inferior da última costela e a crista ilíaca e as pernas levemente abertas, para a CQ a fita foi posicionada horizontalmente na projeção mais proeminente dos glúteos até a região anterior do quadril, e o voluntário com as pernas fechadas. As circunferências foram realizadas de forma firme, mas sem compressão dos tecidos. A relação cintura/quadril foi avaliada pela divisão simples da circunferência da cintura pela do quadril em centímetros (VAN DER KOOY et al., 1993; WHO, 1998).

A Relação Cintura/Quadril foi obtida pela razão da medida da circunferência da cintura pela circunferência do quadril e foi definida como alterada quando igual ou superior a 0,90 para homens e 0,85 para mulheres (ABESO, 2009).

3.4.3 Coleta de amostras biológicas e Determinações bioquímicas

Para as análises bioquímicas, o sangue foi coletado por meio de punção venosa e acondicionado em tubos contendo EDTA (para extração de DNA e dosagem de HbA1C) e tubos sem anticoagulante (contendo ativador de coágulos objetivando obtenção do soro para as dosagens bioquímicas).

Para as determinações bioquímicas foram realizados: glicemia, colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG), creatinina, hemoglobina glicada (HbA1c) e proteína C reativa (PCR). Todas as análises bioquímicas foram processadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e Saúde (LETFADS) do Departamento de Educação Física da UFPB. Todas as amostras dos tubos que não continham anticoagulante foram imediatamente centrifugadas para obtenção de plasma e soro respectivamente e submetidas à análise em período inferior à 2 horas após a coleta. Alíquotas de soro e plasma foram ainda armazenadas sob -20°C para análises posteriores.

Uma quantidade de 10 µl do sangue total obtido com o tubo 1 foi usada para determinação da HbA1c. Para tanto foi utilizada a técnica de imunoturbidimetria em analisador automatizado (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), utilizando

kit padronizado e seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Uma alíquota do plasma obtida do tubo 2 (250 µl) foi usada para determinação de glicose plasmática (método glicose oxidase) em analisador automatizado utilizando kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Todos os testes foram realizados em analisador automatizado (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) utilizando kit padronizado e seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração de LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald, onde: $[LDL] = [colesterol\ total] - [HDL] - [triglicerídeos \div 5]$.

Os marcadores do estresse oxidativo, malondialdeído (MDA) e capacidade antioxidante total (CAT), também foram analisados. A capacidade antioxidante total foi medida por meio de um ensaio espectrofotométrico utilizando-se uma solução de 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) em comprimento de onda de 540 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A molécula radicalar DPPH apresenta absorção máxima a 540 nm e coloração violeta que se transforma em amarela quando se reduz. Essa forma reduzida corresponde à molécula do radical livre DPPH pareado com um hidrogênio do antioxidante (DPPH-H). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3600 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente por 20 min a 12000 rpm, 4°C. Numa câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8) 30 µL da amostra, 150µL do NBT 75µM e 300 µL riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro 560nm.

Foi utilizada a peroxidação lipídica para quantificação da atividade pró oxidante através da dosagem do metabólico malonildialdeído, o qual foi dosado pela técnica de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979). Para isto, 250 µl de amostra foi incubada em banho maria a 37° por 60 minutos. Em seguida, foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante transferido para novos microtubos e foi adicionado 400µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado a 95 – 100° C por 30 minutos. Após o resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532nm.

3.5 ANÁLISE MOLECULAR

3.5.1 Coleta e Extração do DNA Genômico de leucócitos

As amostras anteriormente coletadas foram armazenadas a -20°C, por um período de no máximo 30 dias até a realização da extração do DNA proveniente de leucócitos. O DNA de leucócitos para análise foi isolado por metodologia descrita por Miller *et al* (1989), com adaptações, incluindo uma etapa de digestão com proteinase K a fim de melhorar a qualidade e pureza do DNA isolado.

As amostras de sangue foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1%. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 vezes no intuito de obter um precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina. O precipitado foi então ressuspense em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação foram adicionados 500 µl de uma solução aquosa de 1mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000g a 4°C e 700 µl do sobrenadante e transferida para novo tubo onde foi realizada a precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. Logo em seguida o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuspense em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (MILLER *et al.*, 1988 modificado).

3.5.2 Genotipagem para o rs266729 (variante do gene ADIPOQ)

A determinação do genótipo foi realizada no DNA isolado de leucócitos, utilizando para amplificação os iniciadores (F: CATCAGAATGTGTGGCTTGC e R: AGAAGCAGCCTGGAGAACTG), específicos para o polimorfismo rs266729. A amplificação foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 96°C), anelamento (1 minuto a 65°C) e extensão (1 minutos a 72°C), com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos a 72°C. Em seguida, a reação de restrição enzimática com a enzima *HhaI* (5'...GCG'3') foi padronizada a 37°C durante 3h. O padrão de fragmentos foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, utilizando com tampão TBE (Tris-borato EDTA), e corado com nitrato de prata, utilizado com padrão

de peso molecular o marcador de 50pb (pares de base). A leitura dos genótipos foi realizada da seguinte forma: uma banda de 163pb correspondente ao homozigoto selvagem, genótipo CC; duas bandas de 121pb e 42pb correspondentes ao homozigoto mutado, genótipo GG; e três bandas de 163pb, de 121pb e 42pb correspondentes ao heterozigoto, genótipo CG (PRIOR *et al.*, 2009).

3.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Um dos métodos de inquérito de consumo alimentar é o recordatório 24 horas (R24h). Este método foi utilizado pela primeira vez por Wiehl, em 1960, e consiste em quantificar todo o consumo de alimentos nas 24 horas anteriores a entrevista ou durante o dia anterior (FERRO-LUZZI, 2002). Por tratar-se de um método que descreve uma grande variedade de alimentos, o R24h é utilizado quando se deseja comparar a média de ingestão de nutrientes de diferentes populações.

O recordatório foi aplicado, três vezes, no intervalo de quinze dias, sendo dois de dia de semana e um dia do final de semana. Os recordatórios foram aplicados por um (a) nutricionista de acordo com os relatos dos indivíduos entrevistados. Para preenchimento do R24h, os indivíduos referiram dados que incluíam: hora, identificação do alimento ou bebidas consumidas, as características detalhadas dos alimentos como o tipo, ingredientes que compõem as preparações, marca, forma de preparo e identificação da quantidade consumida, de acordo com o tamanho da porção e medidas caseiras.

As preparações dos alimentos foram desmembradas segundo seus ingredientes e quantidades. Os alimentos foram avaliados e convertidos a calorias e nutriente pelo *software* de Nutrição, *Dietwin*, uma plataforma de software de nutrição que conta com aproximadamente 5230 alimentos e receitas cadastrados de acordo com a tabela TACO 4ª versão e a tabela *Dietwin*, que é uma compilação de várias tabelas, como Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), CENEXA, Alemã, Repertório Geral dos Alimentos, Fichas técnicas de receita.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software IBM SPSS 21.0 (StatSoft Inc., EUA) para análise estatística. O teste de *Kolmogorov Smirnov* foi utilizado para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados. Para testar as diferenças entre as médias dos dados contínuos paramétricos, foi utilizado o teste t de *Student* em amostras independentes. Os valores foram expressos em média e desvio padrão para as variáveis contínuas. Para os testes de dados contínuos não paramétricos, foi utilizado os testes de Mann-whitney e os valores obtidos foram expressos em mediana e IC 95%. O Teste exato de *Fisher* foi utilizado para analisar variáveis categóricas, expressas em valor bruto e em percentual. Um modelo de regressão logística foi realizado, para considerar as possíveis variáveis influenciadoras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

Entre os 98 participantes do estudo, a média de idade foi $61,6 \pm 8,8$ anos; 50% eram mulheres. O tempo de diagnóstico médico para DM2 foi de $17,4 \pm 7,6$ anos. Em relação ao tempo de diagnóstico para RD, 37 (37,7%) sujeitos tinham até 1 ano de diagnóstico médico; 58 (59,2%) indivíduos têm entre 2 e até 10 anos de diagnóstico médico e 3 (3,01%) indivíduos têm mais de 10 anos de diagnóstico médico de RD.

Analisando a frequência pela demanda de consultas médicas, 14 (14,3%) sujeitos procuravam o serviço de saúde duas ou mais vezes ao mês; 14 (14,3%) sujeitos procuravam o serviço de saúde uma vez por mês; 15 (15,3%) procuravam o serviço de saúde a cada dois meses; 38 (38,7%) a cada três meses; 10 (10,2%) procuravam o serviço de saúde semestralmente e 7 (7,2%) procuram o serviço apenas uma vez no ano.

Em relação as características antropométricas, bioquímicas e clínicas dos participantes não foram encontradas diferenças na idade, IMC, RCQ, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) entre os grupos. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças na glicose sérica, HbA1c, TG, TC, HDL-c, LDL-c, creatinina, PCR, MDA e CAT entre os grupos. Analisando a classificação da retinopatia entre os grupos, as prevalências de RD leve, moderada, grave e proliferativa foram semelhantes entre os indivíduos com e sem polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina.

No entanto, a amputação de membros e a terapia com insulina foram mais frequentes nos indivíduos com polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina (grupo CG + GG) quando comparados com os indivíduos sem polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina (grupo CC).

Calorias total, carboidratos, proteínas, gordura trans, gordura monoinsaturada, ácidos graxos ômega 9, ácidos graxos ômega 6, ingestão de ácidos graxos ômega 3 e índice glicêmico da dieta foram semelhantes entre os grupos. No entanto, o consumo de gordura saturada foi maior no grupo GC + GG do que no grupo CC.

Análises de regressão logística mostraram que o polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina prediz que amputação de membros (Beta = 2,89) é uma variável importante ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010 – ABESO**. 3ª Ed. Itapevi: AC Farmacêutica, 2009.
- ADAMIS, A. P., *et al.* Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? **Br. J. Ophthalmol.** v.86, p.363–365, 2002.
- AFARID, M. *et al.* The Association of Serum Leptin Level and Anthropometric Measures With the Severity of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. **Medical Hypothesis, Discovery & Innovation Ophthalmology Journal**. v. 7, p. 156-162, 2017.
- AGRAWAL, N.K.; KANT, S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. **World J Diabetes**. v.5, n.5, p. 697-710, 2014.
- ALBERGHINI, F. *et al.* An epigenetic view of B-cell disorders. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n. 3, p. 253–260, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. standards of medical care in diabetes 2018. **Diabetes Care**, v. 41, suplemento 1, Jan.2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 6. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes-2018. **Diabetes Care**. v. 41, suplemento S55–S64, 2018.
- AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY RETINA/VITREOUS PANEL. Preferred Practice Pattern® Guidelines. **Diabetic Retinopathy**. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2017. Arquivo eletrônico: www.aao.org/ppp.
- ARDEN, G. B.; SIVAPRASAD, S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. **Curr Diabetes Rev.** v. 7, n.5, p.291–304, 2011.
- ASCASO, F. J.; HUERVA, V.; GRZYBOWSKI, A. The role of inflammation in the pathogenesis of macular edema secondary to retinal vascular diseases. **Mediators Inflamm.** Article ID: 432685, p. 1-6, 2014.
- ASHTON, N. Diabetic microangiopathy. **Adv. Ophthalmol.** v.8, p.1–84, 1958.
- BARBIERI, L., *et al.* Elevated homocysteine and the risk of contrast-induced nephropathy: a cohort study. **Angiology**. v. 66, p. 333-338, 2014.
- BARROS, A. J. D.; HIRAKATA, V. N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. **BMC medical research methodology**, v. 3, p. 21- 20, 2003.

BIR, S.C.; KOLLURU, G.K.; FANG, K; KEVIL, C.G. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. **Semin Cell Dev Biol.** v. 23, n.7, p.745–757, 2012.

BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2016, p. 1- 9, 2016.

BOSCO, A.; GONÇALVES, E.R. Diabetes Mellitus: Prevenção e Tratamento da Retinopatia. Projeto Diretrizes. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2004.

BOSCO, A., *et al.* Retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.49, n.2, p. 217-227, 2005.

BOSS, J. D., *et al.* Assessment of neurotrophins and inflammatory mediators in vitreous of patients with diabetic retinopathy. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.** v.58, p.5594–5603, 2017.

BRASIL, M. S. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN.** Brasília, DF: Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, 2011.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** v.10, n.4, p.221–247, 2011.

CALDERON, G.D., *et al.* Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment. **Eye.** v. 31, p. 1122–1130, 2017.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações.** Porto Alegre-RS: Artmed, 2003.

CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: a review of pathogenesis. **Indian J. Endocrinol. Metab.** v.16, suplemento.1, p.S27–S36, 2012.

CIKAMATANA L, MITCHELL P, ROCHTCHINA E, *et al.* Five-year incidence and progression of diabetic retinopathy in a defined older population: the Blue Mountains Eye Study. **Eye.** v.21, p.465–471, 2007.

CHENG, Z., *et al.* Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction, **Current Hypertens. Rev.** v.5, n. 2, p.158–165, mai. 2009.

CHIBBER, R.; MOLINATTI, P.A.; KOHNER, E.M. Intracellular protein glycation in cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells exposed to high-glucose concentration. **Cell Mol Biol (Noisyle-grand).** v. 45, n.1, p. 47-57, 1999.

CHOI, S. *et al.* Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention. **Advances in Nutrition,** v. 4, n. 5, p. 530–532, 2013.

CHUA, C.C.; HAMDY, R. C.; CHUA, B., H. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. **Free Radic Biol Med.** v. 25, n. 8, p. 891–897, 1998.

CHUNG, H. K. *et al.* Influence of Adiponectin Gene Polymorphisms on Adiponectin Level and Insulin Resistance Index in Response to Dietary Intervention in Overweight-Obese Patients With Impaired Fasting Glucose or Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. **Diabetes Care.** v. 32, p. 552–558, 2009.

CHUNG, A., S.; FERRARA, N. Developmental and pathological angiogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 27, p.563–584, 2011.

CLARKE, M; DODSON, P. M. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 21, n.4, p. 573-86, 2007.

COHEN, S. R.; GARDNER, T. W. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. Retinal Pharmacotherapeutics. **Dev. Ophthalmol.** v. 55, p. 137–146, 2016.

COUTINHO, L. M. S.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R. Methods for estimating prevalence ratios in cross-sectional studies. **Revista de Saúde Pública,** v. 42, n. 6, p. 992–998, 2008.

CRIDER, K.S. *et al.* Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances in Nutrition,** v. 3, n. 1, p. 21–38, 2012.

CUI, Y. *et al.* Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. **Exp Eye Res.** v. 83, n. 4, p. 807–816, 2006.

Cunha-Vaz, J.G. Diabetic retinopathy. Human and experimental studies. **Trans. Ophthalmol.** Soc. U. K. v. 92,p. 111–124, 1972.

CUNHA-VAZ, J.; RIBEIRO, L.; NUNES, S.; LOBO, C. Biomarkers of diabetic retinopathy. **Diabetes Manage.** v.4, p.181–192, 2014.

CUNHA-VAZ, J.; RIBEIRO, L.; LOBO, C. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research.** v. 41, p.1-22, 2014.

DENG, R. *et al.* Oxidative Stress Markers Induced by Hyperosmolarity in Primary Human Corneal Epithelial Cells. **PLoS ONE.** v.29, p.1-16, 2015.

DEMETRIOU, C.A. *et al.* Biological embedding of early-life exposures and disease risk in humans: a role for DNA methylation. **European Journal of Clinical Investigation,** v. 45, n. 3, p. 303-332, 2015.

DOGANAY, S. *et al.* Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. **Eye (Lond).** v.16, n.2, p. 163-170, 2002.

EBRAHEM, Q. *et al.* Carboxyethylpyrrole oxidative protein modifications stimulate neovascularization: Implications for age-related macular degeneration. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 103, n.36, p. 13480–13484, 2006.

ELIA, L.; CONDORELLI, G. RNA (Epi) genetics in cardiovascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 89, p. 11–16, 2015.

ELLIS, E.A. *et al.* Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. **Free Radic Biol Med**. v. 28, n. 1, p. 91–101, 2000.

FANG, H.; JUDD, R. L. Adiponectin Regulation and Function. **Comprehensive Physiology**. v. 08, p.1031–1063, 2018.

FANTUZZI, G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. **J Allergy Clin Immunol**. v. 121, p. 326–330, 2008.

FERRO-LUZZI, A. Individual food intake survey methods. International Scientific Symposium on Measurement and Assessment of Food and Deprivation and Undernutrition. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 101-125, 2002.

FOSTER-POWELL, K.; HOLT, SH.; BRAND-MILLER, JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. **The American journal of clinical nutrition**. v.76, 5–56, 2002.

FU, Z. *et al.* Review: adiponectin in retinopathy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1862, p. 1392–1400, 2016.

FUMERON, F. *et al.* Adiponectin Gene Polymorphisms and Adiponectin Levels Are Independently Associated With the Development of Hyperglycemia During a 3-Year Period. **Diabetes**. v. 53, n.4, p.1150-1157, 2004.

GABLE, D.R.; MATIN, J.; WHITTALL, R. *et al.* Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. **Ann Hum Genet**. v. 71 p.453 –466, 2007.

GERAGHTY, A.A. *et al.* Nutrition During Pregnancy Impacts Offspring's Epigenetic Status - Evidence from Human and Animal Studies. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 8, n.1, p. 41–47, 2015.

GILOYAN A. *et al.* The prevalence of and major risk factors associated with diabetic retinopathy in Gegharkunik province of Armenia: cross-sectional study. **BMC ophthalmology**, 15, 46, 2015.

GU, H.F. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish Caucasians. **Diabetes**. v. 53 (Suppl. 1), p. S31– S35, 2004.

GU, X. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. **J Biol Chem.** v. 278, n.43, p.42027–42035, 2003.

HADJADJ, S.; AUBERT, R.; FUMERON, F. *et al.* Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. **Diabetologia.** v. 48, p. 1088–1092, 2005.

HALDAR, S. R. *et al.* Oxidative stress-related genes in type 2 diabetes: association analysis and their clinical impact. **Biochemical genetics,** v.53, p.93-119, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews.** v. 70, n .5, p.257–265, 2012.

HAMPTO, B. M. *et al.* Update on genetics and diabetic retinopathy. **Clin Ophthalmol.** v. 9, p. 2175–2193, 2015.

HAN, L. Y. *et al.* Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, –11377C>G, –11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia.** v.54, n.9, p. 2303–2314, 2011.

HEGENER, H.H. *et al.* Association of adiponectingene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: anested case-control study. **ClinChem.** v. 52, p. 2021-2027, 2006.

HELLER, T. *et al.* Mortality and its causes in a german cohort with diabetes mellitus type 1 after 20 years of follow-up: the JEVIN trial. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.** v.126, p. 387–393, 2017.

HENRIQUES, J. *et al.* Doença ocular diabética, **Acta Med Port.** v.28,p. 107-113, 2015.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D.M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab.** v.15, p.39–50, 2013.

HERMAN, J. G. *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.93, p. 9821-9826, 1996.

HIRSCHI, KK; D'AMORE, PA. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. **EXS.** v.79, p. 419-428, 1997.

HOLMAN, R.R. *et al.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **N Engl J Med.** v.359, p.1577–1589, 2008.

HOMME, R. P. *et al.* Remodeling of Retinal Architecture in Diabetic Retinopathy: Disruption of Ocular Physiology and Visual Functions by Inflammatory Gene Products and Pyroptosis. **Front. Physiol.** v. 9, Article ID: 1268, p. 1-18, 2018.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A.F.; FRAGA, M.F. The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome. **Cellular and Molecular Life**

Sciences, v. 70, n. 9, p. 1543–1573, 2013.

IMESCH, PD.; BINDLEY, CD. ; WALLOW, IHL. Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities. **Retina**. v.17, p.321-329, 1997.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF. **IDF diabetes atlas**, 9th edition, 2019.

INTINE, R. V; JR, M. P. Metabolic Memory and Chronic Diabetes Complications: Potential Role for Epigenetic Mechanisms. **Curr Diab Rep**.v.12, p.551-559, 2012.

ISHIBASHI, T; INOMATA, H. Ultrastructure of retinal vessels in diabetic patients. **Br J Ophthalmol**. v.77, p.574-578, 1993.

IWABU, M. O. *et al.* A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity, **Nature**. v. 503, p. 493–499, 2013.

JANG, Y. *et al.* The influence of the adiponectin gene on adiponectin concentrations and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. **Clin Chim Acta**. v. 391, p.85– 90, 2008.

JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R.Z. New concepts in DNA methylation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 7, p. 310–318, 2014.

JOSHI, N. *et al.* Infections in patients with diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med**. v.341, p.1906–1912, 1999.

KAFTAN, A. N., & HUSSAIN, M. K. Association of adiponectin gene polymorphism rs266729 with type two diabetes mellitus in Iraqi population. A pilot study. **Gene**. v.570, 95–99, 2015.

KANDI, V.; VADAKEDATH, S. Effect of DNA Methylation in Various Diseases and the Probable Protective Role of Nutrition: A Mini-Review. **Cureus**, v. 7, n. 8, p. 309, 2015.

KATO, K. *et al.* Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy. **Clin Endocrinol (Oxf)**. v. 68, p. 442–449, 2008.

KERN, T.S. *et al.* Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. **Exp. Diabetes Res**. v. 2007, Article ID: 95103, p. 1-14, 2007. doi: 10.1155/2007/95103.

KELVIN, K. K. NG. *et al.* Possible Modifying Effect of Hemoglobin A1c on Genetic Susceptibility to Severe Diabetic Retinopathy in Patients With Type 2 Diabetes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 61, n. 10, p.1-8, 2020.

KHALFAOUI, T.; LIZARD, G.; OUERTANI-MEDDEB, A. Adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) and diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **J. Mol. Histol**. v. 39, p.243–249, 2008. doi: 10.1007/s10735-007-9159-5.

KHAZAMIPOUR, N. *et al.* MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. **Hum Reprod.** v. 24, p. 2361-2364, 2009.

KITAGAKI, T. *et al.* A case of proliferative diabetic retinopathy with HIV infection in which HAART possibly influenced the prognosis of visual function. Case Rep. Ophthalmol. v.7, p.239-244, 2016.

KLEIN C. H; BLOCH, K. V. Estudos Seccionais. In: Epidemiologia, 2^oed. **Atheneu**, Porto Alegre, 2009, p. 193.

KLEINBAUM, D. G. *et al.* **Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods**. 4 edition ed. Australia ; Belmont, CA: Duxbury Press, 2007.

KOK, D.E. *et al.* The effects of long-term daily folic acid and vitamin B12 supplementation on genome-wide DNA methylation in elderly subjects. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 121, 2015.

KUO, J. Z. *et al.* Adiponectin, Insulin Sensitivity and Diabetic Retinopathy in Latinos With Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 100, n.9, p. 3348 –3355, 2015.

LARA-CASTRO, C.; FU, Y.; CHUNG, B.H; GARVEY, W.T. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol.** v. 18, p. 263–270, 2007.

LI, J.; SHEN, X. Oxidative stress and adipokine levels were significantly correlated in diabetic patients with hyperglycemic crises. **Diabetology & Metabolic Syndrome.** v. 11:13, p.1-8, 2019.

LI, J. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4. **Diabetes.** v. 59, n. 6, p.1528–1538, 2010.

LI, Y. *et al.* Gene-environment interaction between adiponectin gene polymorphisms and environmental factors on the risk of diabetic retinopathy. **Journal of Diabetes Investigation.** , v.6, n.1, p.56–66, 2015.

LIAO, W. L. *et al.* Effect of adiponectin level and genetic variation of its receptors on diabetic retinopathy. **Medicine (Baltimore).** v. 98, n.11, p.1-7, 2019.

LIU, C. C. *et al.* Effects of S- adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. **J Biochem Mol Toxicol.** v.23, p.349-356, 2009.

LU, M. *et al.* Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. **J Clin Invest.** v. 101, n.6, p.1219–1224, 1998.

MADDOCKS, O.D.K. *et al.* Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells, **Molecular**

Cell, v. 61, n. 2, p. 210-221, 2016.

MAEDA, N. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin /ACRP30. **Nat Med**. v.8, p.731–737, 2002.

MAHAJAN, N. *et al.* Perturbed Biochemical Pathways and Associated Oxidative Stress Lead to Vascular Dysfunctions in Diabetic Retinopathy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 8458472, 2019.

MAHONEY, SE; LOPRINZI, PD. Influence of flavonoid-rich fruit and vegetable intake on diabetic retinopathy and diabetes-related biomarkers. **Journal of diabetes and its complications**. v.28, n.6, p.767–771, 2014.

MANLEY, S. Haemoglobin A1c-a marker for complications of type 2 diabetes: the experience from the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). **Clin Chem Lab Med**. v. 41, p.1182–1190, 2003.

MAO, D. *et al.* Aqueous humor and plasma adiponectin levels in proliferative diabetic retinopathy patients. **Curr Eye Res**. v. 37, p. 03–808, 2012.

MARSZALEK, J., R.; LODISH, H. F. Docosaehaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v. 21, p.633–657, 2005.

MARTINO, F. *et al.* Epigenetics and cardiovascular risk in childhood. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 539–546, 2016.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem**. 244, 6049–6055, 1969.

MELETH, A.D. *et al.* Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.46, n.11, p. 4295-301, 2005.

MENTCH, S.J.; LOCASALE, J.W. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1363, p. 91-98, 2016.

MENTCH, S.J. *et al.* Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 861-873, 2015.

MENZAGHI, C. *et al.* A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. **Diabetes**. v. 51, p. 2306– 2312, 2002.

MEYERLE, C.B. *et al.* Nonproliferative Diabetic Retinopathy. **Diabetic Retinopathy**. Humana Press, p. 3–27, 2008.

MILL, J.; HEIJMANS, B.T. From promises to practical strategies in epigenetic epidemiology. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 8, p. 585–94, 2013.

MILLEN, AE. *et al.* Adequate vitamin D status is associated with the reduced odds of prevalent diabetic retinopathy in African Americans and Caucasians. **Cardiovascular diabetology**. v.15, n.128, p. 1-11, 2016.doi: 10.1186/s12933-016-0434-1.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MURUGESWARI, P. *et al.* Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease. **Retina**. v. 28, n.6, p. 817-824, 2008.

NATARAJAN, R.; REDDY, M. A. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. **Cardiovascular Research**. v. 90, n. 03, p. 421–429, 2011.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, Article ID 3164734, p.1- 23, 2016.

NODA, K. *et al.* Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. **J. Ophthalmol**. v.2012, Article ID: 279037, p.1-6, 2012. doi: 10.1155/2012/279037.

OUCHI, N.; SHIBATA, R.; WALSH, K. Cardioprotection by adiponectin. **Trends Cardiovasc Med**. v. 16, p. 141–146, 2006.

PENN, J.S. ; TOLMAN, B.,L. ; BULLARD, L.,E. Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. **Free Radic Biol Med**. v. 22, n. 6, p. 977–984, 1997.

PETERSEN, M. R.; DEDDENS, J. A. A comparison of two methods for estimating prevalence ratios. **BMC Medical Research Methodology**, v. 8, p. 9, 28 fev. 2008.

PETROVIČ, D. Candidate Genes for Proliferative Diabetic Retinopathy. **BioMed Research International**. v.2013, p. 1-9, 2013.

POLAK, M.R. *et al.* Pathophysiology of diabetes complications. **Diabetologia**. v.40, B65-67, 1997.

POLLIN, T.I. *et al.* Linkage of Plasma Adiponectin Levels to 3q27 Explained by Association With Variation in the APM1 Gene. **Diabetes**. v. 54, n. 1, p. 268-274, 2005.

PRATTICCHIZZO, F. *et al.* Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. **Clinical epigenetics**, v.7, p. 2-11, 2015.

PRIOR, S. L. *et al.* Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. **European Heart Journal**. v. 30, p. 1263–1269, 2009.

RANGASAMY, S.; MCGUIRE, P.G.; DAS, A. Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets. **Middle East Afr J Ophthalmol.** v.19, n.1, p. 52-59, 2012.

RASCHE, A.; AL-HASANI, H.; HERWIG, R. Meta-Analysis Approach identifies Candidate Genes and associated Molecular Networks for Type-2 Diabetes Mellitus. **BMC Genomics.** v.9, p. 1-17, 2008.

RANI, V. *et al.* Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences.** v.148, p. 183-193, 2016. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.

REDDY, M. A.; ZHANG, E.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. **Diabetologia,** v.58, p. 443-455, 2015.

RODRÍGUEZ-GALLEGO, E. *et al.* Mapping of the circulating metabolome reveals α -ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Obesity,** v. 39, n. 2, p. 279-287, 2015.

ROY, MS; JANAL, MN. High caloric and sodium intakes as risk factors for progression of retinopathy in type 1 diabetes mellitus. **Archives of Ophthalmology.** v.128, p.33– 39, 2010.

ROYAL COLLEGE OF OPHTHALMOLOGISTS. **Guidelines for the management of diabetic retinopathy.** London, 2012.

RÜBSAM, A.; PARIKH, S.; FORT, P. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. **International Journal of Molecular Sciences.** v.19, n.4, 942, p. 1-31, 2018.

RUEF, J. *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. **Circ Res.** v.81, n.1, p.24–33, 1997.

SAFI, SZ. *et al.* Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 1-18, 2014.

SANTIAGO, A. R. *et al.* Sweet Stress: Coping With Vascular Dysfunction in Diabetic Retinopathy. **Frontiers in Physiology,** v. 9, p. 1-9, 2018.

SASAKI, M. *et al.* The Associations of Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids With Diabetic Retinopathy in Well-Controlled Diabetes. **Investigative ophthalmology & visual science.** v. 56, p.7473–7479, 2015.

SERHAN, C.N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **Faseb j.** v. 21, n.2, p. 325-32, 2007.

SHARMA, Y. *et al.* Nutrition for diabetic retinopathy: plummeting the inevitable threat of diabetic vision loss. **European Journal of Nutrition.** 56(6), 2013–2027, 2017.

SHIBATA, R. *et al.* Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue

ischemia through stimulation of AMP-activated protein kinase signaling. **J Biol Chem.** v. 279, p. 28670–28674, 2004.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. **BMB Rep.** v. 41, n.4, p. 278–286, 2008.

SHORTHER, K. R.; FELDER, M. R.; VRANA, P. B. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more Always better? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.118, p. 14-20, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.** v.4, p.180-183, 2015.

SINGER, M.A. *et al.* Diabetic macular edema: It is more than just VEGF. **F1000 Research.** v.5, p. 1-6, Article ID: 1019, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**, ISBN: 978-85-93746-02-4, editora Clannad, 2019.

SPRANGER, J. *et al.* Adiponectin and Protection Against Type 2 Diabetes Mellitus. **The Lancet.** v. 361, n. 9353, p. 226-228, 2003.

SRINIVASAN, S. *et al.* Influence of serum lipids on the incidence and progression of diabetic retinopathy and macular oedema: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular genetics Study-II. **Clin Exp Ophthalmol.** v.45, p.894–900, 2017.

SUN, P. *et al.* The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A Meta-Analysis. **Medicine.** v. 96, n 47, 2017.

SUN, W. *et al.* Aspirin at low-intermediate concentrations protects retinal vessels in experimental diabetic retinopathy through non-platelet-mediated effects. **Diabetes.** v.54, p. 3418–3426, 2005. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3418.

TANG, J.; KERN, T.S. Inflammation in diabetic retinopathy. **Prog Retin Eye Res.** v.30, n.5, p. 343- 358, 2011.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **JBM.** v.102, n.5, 2014.

UEHARA, S. K; ROSA, G. Association between folic acid deficiency and disease and prevention strategies: a critical view. **Revista de Nutricao.** v.23, p.881-894, 2010.

ULU, R. *et al.* Investigation of association rs266729 G/C ADIPOQ gene polymorphism with type two diabetes mellitus risk in Turkish population. **Progr Nutr.** v. 20, n.4, p. 624-628, 2018.

USHIO-FUKAI, M. *et al.* Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. **Circ Res.** v.91, n.12, p.1160–1167, 2002.

VAN DER KOOY, K. et al. Waist-hip ratio is a poor predictor of changes in visceral fat. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 57, n.3, p. 327–333, 1993.

VASSEUR, F. *et al.* Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. **Hum Mol Genet**. v. 11, p. 2607–2614, 2002.

VELASQUE, L. S. Aplicação dos modelos de Cox e Poisson para obter medidas de efeito em um estudo de coorte. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Fundação Oswaldo Cruz. **Ministério da Saúde**, 2011.

VIONNET, N. *et al.* Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. **Am J Hum Genet**. v. 67, n. 6, p. 1470-1480, 2000.

VUJOSEVIC, S. *et al.* Aqueous humor biomarkers of muller cell activation in diabetic eyes. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci**. v.56, p. 3913–3918, 2015. doi: 10.1167/iops.15-16554.

VUJOSEVIC, S. *et al.* Proteome analysis of retinal glia cells-related inflammatory cytokines in the aqueous humour of diabetic patients. **Acta Ophthalmol**. v.94, p.56–64, 2016.

WANG, Y. *et al.* Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.301, n.3, p.C695–C704, 2011.

WHAYNE, T.F. Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease. **Molecular Biology Reports**. v. 42, n. 4, p. 765–776, 2015.

WHITCUP, S. M. *et al.* Inflammation in retinal disease. **Int. J. Inflam**. Article ID: 724648, p. 1-4, 2013.

W H O. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: **World Health Organization**, 2000. Disponível em: http://www.who.int/entity/nutrition/publications/obesity/HO_TRS_894/en/in ex.html, 2000.

W H O. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: **World Health Organization**, 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em: 16 Mar 2017.

W H O. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva: **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/diabetes/en>. Acesso em: 18 Jun 2018.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: Program of Nutrition, Family and Reproductive Health. (Technical Report Series 894). **World Health Organization**, 1998.

WILKINSON, C. P. F. L. *et al.* Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**. v. 110, n. 9, p. 1677-1682, 2003.

WONG, K. Defining Diabetic Retinopathy Severity. in: Browning, D. (Ed.), **Diabetic Retinopathy**. Evidence-Based Management. Springer-Verlag New York. p. 105–120, 2010.

WONG, M. Y. Z. *et al.* Dietary intake and diabetic retinopathy: A systematic review. **PLOS ONE**. v.13, p.1-26, 2018.

WONG, W.T. *et al.* Adiponectin is required for PPARgamma-mediated improvement of endothelial function in diabetic mice. **Cell Metab**. v.14, p. 104–115, 2011.

WU, H. *et al.* Association between aqueous cytokines and diabetic retinopathy stage. **J. Ophthalmol**. v.2017, Article ID: 9402198, p. 1-8, 2017.

XU, J. *et al.* Ten-Year Cumulative Incidence of Diabetic Retinopathy. The Beijing Eye Study 2001/2011. **PLoS One**.v.9, p. 1-6, 2014.

YAMAUCHI, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat Med**. v.7, p.941–946, 2001.

YAMAZAKI, D.; HITOMI, H.; NISHIYAMA, A. Hypertension with diabetes mellitus complications. **Hypertens Res**. v.41, p.147-156, 2018.

YAU, J.W.Y.; ROGERS, S.L.; KAWASAKI, R. *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care**. v. 35, p. 556, 2012.

YE, R.; SCHERER, P.E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? **Mol Metab**. v. 2, p. 133–141, 2013.

YOUNUS, L. A. *et al.* FTO gene polymorphisms (rs9939609 and rs17817449) as predictors of Type 2 Diabetes Mellitus in obese Iraqi population. **Gene**. v. 627, p. 79–84, 2017.

YU, B. *et al.* DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links age-related changes in gene expression to gene body methylation and 3'-end GC density. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3627–43, 2015.

ZHA, D.; WU, X.; GAO, P. Adiponectin and Its Receptors in Diabetic Kidney Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Potential. **Endocrinology**. v. 158, n.7, p. 2022-34, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Diabetic retinopathy: reversibility of epigenetic modifications and

new therapeutic targets. **Cell Biosci.** v.7, n.42, p.1-8, 2017.

ZHANG, Y.; REN, J. Epigenetics and obesity cardiomyopathy: From pathophysiology to prevention and management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 161, p. 52–66, 2016.

ZHANG, L. *et al.* Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. **Diabetes Care**. v. 24, p.1275–1279, 2001.

ZHOU, Y.; WANG, C.; SHI, K.; YIN, X. Relationship between dyslipidemia and diabetic retinopathy: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**. v.97, n.36, p. 1-6, 2018.

ZOU, G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 7, p. 702–706, 1 abr. 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO

O polimorfismo rs266729 da adiponectina afeta o risco de amputação de membro em pacientes com retinopatia diabética

Vanessa Polyana de Sousa Brito¹, Caroline Severo de Assis¹, Tainá Gomes Diniz¹, Yohanna de Oliveira¹, Alexandre Sérgio Silva^{1,2}, Mylenne da Silva Barros³, Bruno Rafael Virginio de Sousa¹, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista⁴, Darlene Camati Persuhn^{1,5*}.

Afiliações dos autores:

1 Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (SP) Brasil.

2 Laboratório de Estudos Aplicados em Treinamento Físico à Performance e Saúde - LETFADS, Departamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

3 Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (SP) Brasil.

4 Hospital Universitário Lauro Wanderley - HUWL, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (SP) Brasil.

5 Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (SP) Brasil.

*Autor correspondente:

PhD. Darlene Camati Persuhn

Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I - Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil.

ZIPCODE: 58051-900

E-mail: darlenecp@hotmail.com

Resumo

Objetivos: analisar se o rs266729 no promotor da adiponectina influencia os aspectos clínicos e metabólicos de pacientes com retinopatia diabética (RD). **Métodos:** Este é um estudo transversal incluindo pacientes com Diabetes Melitus tipo 2 com diagnóstico de RD (n = 98) de ambos os sexos que foram subgrupados nos grupos genotípicos (rs266729 CC e CG + GG) pelo método PCR-RFLP de amostras de DNA de leucócitos. Os pacientes foram analisados quanto ao grau de RD por fundoscopia, aspectos clínicos (pressão arterial, presença de amputações), parâmetros antropométricos, bioquímica (glicose, HbA1c, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, creatinina), inflamatórios (PCR) e parâmetros de estresse oxidativo (MDA e CAT). O consumo alimentar foi analisado a partir dos dados coletados em um cadastro alimentar de 24 horas. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças na idade, IMC, RCQ, pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos. Os parâmetros bioquímicos, inflamatórios (CR-P) e de estresse oxidativo (MDA e TAC) e a classificação dos estágios de RD não foram diferentes entre os grupos genotípicos. Amputação de membros (p = 0,02) e insulino terapia (p = 0,03) foram mais frequentes nos portadores de Alele. Calorias totais, carboidratos, proteínas, gordura trans, gordura monoinsaturada, ômega 6, ingestão de gordura ômega 3 e índice glicêmico da dieta foram semelhantes entre os grupos. O consumo de gordura saturada (p = 0,01) foi maior no grupo GC + GG do que no grupo CC. A associação entre a presença do alelo rs266729 G e amputação de membro foi confirmada na análise de regressão. **Conclusão:** o alelo rs266729 G no gene da adiponectina está associado à amputação do membro, mas essa informação precisa de confirmação.

Palavras-chave: adiponectina; amputação; Retinopatia diabética; rs266729

Abreviaturas

Recordatório alimentar de 24 horas (R24h); Índice de massa corporal (IMC); Proteína C reativa (PCR); Pressão arterial diastólica (PAD); Diabetes mellitus (DM); Retinopatia diabética (RD); hemoglobina glicada (HbA1C); circunferência do quadril (CQ); lipoproteína de alta densidade (HDL-c); lipoproteína de baixa densidade (LDL-c); malondialdeído (MDA); polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP); pressão arterial sistólica (PAS); capacidade antioxidante total (CAT); colesterol total (CT); triglicerídeos (TG); diabetes mellitus tipo 1 (DM1); diabetes mellitus tipo 2 (DM2); colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c); circunferência da cintura (CC); relação cintura-quadril (RCQ), doença microvascular (DMV).

1. Introdução

A retinopatia diabética (RD) é uma das doenças microvasculares (DMV) do diabetes que tem sido apontada como a principal causa de cegueira na população de 16 a 64 anos. O tempo de duração do diabetes mellitus (DM) tem sido descrito como o principal fator de risco para RD e aproximadamente 60% daqueles com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) apresentam alto risco para RD após 20 anos de doença sistêmica [1]. O MVC se associa independentemente com a amputação de membro e, no caso de DR, se na presença de DAP (doença arterial periférica), esse risco potencial é amplificado [2]

A RD pode ser classificada em retinopatia não proliferativa leve, moderada e grave ou retinopatia proliferativa, de acordo com a gravidade da doença [3]. Estudos anteriores demonstraram que o aumento dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes, desempenham um papel fundamental na patogênese da RD [4]. Além disso, as adipocinas, grupo de moléculas bioativas derivadas do tecido adiposo, desempenham importante papel na regulação de diversos processos biológicos, como apetite, metabolismo, sensibilidade à insulina, inflamação e estresse oxidativo [5, 6]. Dentre as adipocinas, a adiponectina tem sido uma das mais estudadas na RD [5, 7] e há relatos de níveis reduzidos em pacientes com lesões nos pés (pé diabético), o que é um importante fator de risco para amputação [8].

A adiponectina tem sido considerada o elo entre a obesidade e o diabetes atuando como adipocina “antidiabética” devido à sua ação na ativação da β -oxidação, aumentando a sensibilidade à insulina, reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo [6, 9]. Os achados clínicos sugeriram que variações genéticas no gene da adiponectina podem afetar os níveis séricos de adiponectina e contribuir para a resistência à insulina [10, 11]. Além disso, polimorfismos do gene da adiponectina têm sido descritos como fator de risco para inflamação, estresse oxidativo, resistência à insulina e DM [11, 12]. Um dos polimorfismos mais estudados, por se localizar na região promotora do gene da adiponectina e possivelmente afetar sua expressão, é o rs266729. Estudos anteriores relataram uma associação do alelo rs266729 G com DM2 [13] e RD na presença de terapia com insulina [14].

Embora existam dados que conectam rs266729 e DM2, o papel dos polimorfismos do gene da adiponectina na RD e na patogênese da amputação permanece inconclusivo.

Além disso, e em nosso melhor entendimento, não há estudo demonstrando se a ocorrência de rs266729 na RD afeta a progressão da complicação, bioquímica, inflamação, marcadores de estresse oxidativo e risco de amputação nesses pacientes. Sabendo que o alelo G do polimorfismo rs266729 parece impactar negativamente a expressão do gene da adiponectina, testamos a hipótese do efeito dos genótipos rs266729 sobre os aspectos relevantes no contexto do DR mencionado.

2. Metodologia

2.1 Aspectos éticos

Os protocolos do presente estudo transversal foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HUWL) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil (Número de referência 99840118.3.0000.5183) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e a Declaração Internacional de Helsinque. Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito.

2.2 Amostragem

Noventa e oito indivíduos, de ambos os sexos, com diagnóstico médico de retinopatia diabética em DM2, atendidos na Unidade da Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HUWL) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil. Foram recrutados entre dezembro de 2018 e março de 2020. Os indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa leve, moderada e grave e com retinopatia diabética do tipo proliferativa, os indivíduos foram alocados em dois grupos: portadores do genótipo rs266729 CC e portadores rs266729 G (grupo CG + GG).

2.3 Variáveis clínicas, antropométricas e bioquímicas

A aferição da pressão arterial foi realizada pelo método auscultatório. A pressão arterial foi aferida em indivíduos sentados após 3 min de repouso, com esfigmomanômetro aneroide Welch Allyn com manguito de circunferência do braço adequado (WELCH ALLYN INC, NovaYork, EUA) previamente calibrado contra uma coluna de mercúrio [15].

O peso corporal foi medido com sensibilidade de 0,1 kg em balança eletrônica (Filizola®) e a estatura com aproximação de 0,5 cm com estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) (kg / m^2) foi calculado como o peso dividido pela altura, ao quadrado. A circunferência da cintura (CC) (cm) foi medida no nível do ponto médio entre a margem inferior da última costela e a crista ilíaca medida horizontalmente com fita de tensão constante com o paciente em pé. A circunferência do quadril (CQ) foi medida no nível da maior circunferência sobre os grandes trocanteres. A relação cintura-quadril (RCQ) foi obtida pela relação da medida da CC para a CQ.

Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos após jejum de 8 horas. Para análise bioquímica, glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1C), colesterol total (TC), colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triglicerídeos (TG), proteína c-reativa (PCR) e níveis de creatinina foram determinados por método enzimático (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) utilizando kits colorimétricos enzimáticos (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi determinado pela fórmula de Friedewald, onde: $[LDL-c] = [TC] - [HDL-c] - [TG \div 5]$.

2.4 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

A atividade oxidante do malondialdeído (MDA) foi quantificada no plasma pela reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. [16]. A capacidade antioxidante total (CAT) foi quantificada no plasma pela medição da atividade de eliminação do radical livre usando o método 2,2 difenil-1-picril-hidrazila [17].

2.5 Genotipagem do gene da adiponectina

Amostras de DNA foram extraídas de leucócitos de sangue periférico usando um método previamente descrito [18]. O polimorfismo do gene rs266729 da adiponectina foi analisado usando polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP), conforme descrito anteriormente [19]. Os padrões foram analisados por eletroforese com gel de poliacrilamida 15% e coloração com nitrato de prata 0,5% para determinação dos genótipos.

2.6 Avaliação do Consumo Alimentar

Para estimar o consumo alimentar regular dos indivíduos, foram realizados três recordatórios alimentares de 24 horas (R24), especificamente, dois de dias da semana e um no final de semana. Os recordatórios foram aplicados por nutricionista de acordo com os relatos dos entrevistados, contemplando as seguintes informações: horário da refeição e identificação da bebida ou alimento ingerido com suas características específicas, como tipo, ingredientes das preparações, marca, forma de preparo, quantidade consumida, tamanho da porção e medidas caseiras. Todos os ingredientes e quantidades das preparações alimentares foram detalhados e os alimentos analisados

com o Dietwin (Porto Alegre, RS, Brasil), uma plataforma de software de nutrição com aproximadamente 5230 alimentos e receitas diversas. Todos os registros foram baseados na quarta versão da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e nas tabelas DIETWIN, que é uma compilação das seguintes tabelas: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), e Repertório Geral dos Alimentos, Fichas Técnicas de Receitas [20].

2.7 Análise estatística

foi utilizado o software SPSS 21.0 (StatSoft Inc., EUA) para análise estatística. O teste de *Kolmogorov Smirnov* foi utilizado para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados. Para testar as diferenças entre as médias dos dados contínuos paramétricos, foi utilizado o teste t de *Student* em amostras independentes. Os valores foram expressos como média $\pm$ e desvio padrão para variáveis contínuas. Para os testes de dados contínuos não paramétricos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e os valores obtidos foram expressos em mediana e IC 95%. O teste exato de *Fisher* foi usado para analisar as variáveis categóricas. Um modelo de regressão logística foi realizado para considerar as possíveis variáveis influenciadoras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 Caracterização geral

Entre os 98 participantes do estudo, a média de idade foi $61,6 \pm 8,8$ anos; 50% eram mulheres. O tempo de diagnóstico médico para DM2 foi de $17,4 \pm 7,6$ anos. Em relação ao tempo de diagnóstico para RD, 37 (37,7%) sujeitos tinham até 1 ano de diagnóstico; 58 (59,2%) indivíduos têm entre 2 e até 10 anos de diagnóstico médico e 3 (3,01%) indivíduos têm mais de 10 anos de diagnóstico médico de RD.

3.2 Características antropométricas, bioquímicas e clínicas

A comparação das características antropométricas, bioquímicas e clínicas dos grupos genotípicos é apresentada na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças na idade, IMC, RCQ, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) entre os grupos. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças na glicose sérica, HbA1c, TG, TC, HDL-c, LDL-c, creatinina, PCR, MDA e CAT entre os grupos. A classificação da retinopatia (RD leve, moderada, grave e proliferativa) foi semelhante entre os indivíduos em ambos os grupos genotípicos. No entanto, a amputação de membros e a terapia com insulina aumentaram nos indivíduos rs266729 com a presença do alelo G (grupo CG + GG) quando comparados com os indivíduos do grupo CC (Tabela 1).

3.3 Avaliações de ingestão de alimentos

Calorias total, carboidratos, proteínas, gordura trans, gordura monoinsaturada, ácidos graxos ômega 9, ácidos graxos ômega 6, ingestão de ácidos graxos ômega 3, índice glicêmico da dieta e gorduras total foram semelhantes entre os grupos (Tabela 2). No entanto, foi encontrada associada significativa do consumo de gordura saturada foi maior no grupo GC + GG do que no grupo CC (Tabela 2).

3.4 Regressão logística

Para confirmar as relações encontradas nas comparações entre os grupos genotípicos, foi realizada uma regressão logística, fixando o alelo rs266768 como variável dependente. A amputação de membros resistiu associada aos genótipos CG + GG mesmo com a inclusão de variáveis de confundimento. A associação entre a presença

desse alelo e a insulinoterapia não resistiu à influência de variáveis de confundimento (Tabela 3).

Foi analisada se a relação entre a presença do alelo rs266768 G e amputação de membro resistiria a fatores de confusão (gênero, idade, HbA1C, consumo de gorduras saturados, consumo de lipídios, índice glicêmico, IMC e terapia com insulina ou em combinação com hipoglicemiantes), testamos um modelo de regressão logística binária considerando a ocorrência de amputação de membro como variável dependente, no qual foi confirmada a associação do genótipo CC com a efeito protetor para a amputação de membro (Tabela 4).

4. Discussão

No presente estudo, demonstramos que, a menos que o polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina não esteja associado à gravidade da retinopatia diabética ou piora dos marcadores metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo, nossos achados mostram que os pacientes com polimorfismo rs266729 com a presença do alelo G do gene da adiponectina realizaram mais terapia com insulina e são mais propensos a sofrer amputação de membros.

Devido à importância das amputações nos custos com saúde, no comprometimento da qualidade de vida e na capacidade de trabalho do indivíduo, o estudo dos fatores de risco e escores tem se intensificado [21] mostrando que complicações relacionadas à obesidade, como o tipo 2 diabetes, estão intimamente associados à rarefação microvascular e colateralização reduzida em tecidos isquêmicos [22, 23], e a essas alterações circulatórias, visto que a DMV pode acelerar a vulnerabilidade a lesões isquêmicas e prejudicar a cicatrização de feridas, levando à ocorrência de amputação de membros inferiores. A RD é um desses fatores [24], aumentando o risco de amputações associadas ou não à doença arterial periférica [21]. Portanto, neste estudo em que estudamos apenas pacientes com RD, estamos diante de um grupo com risco clinicamente elevado para tal desfecho. No entanto, observamos uma relação significativa entre a ocorrência de amputações e os portadores do alelo G do polimorfismo rs266729 no gene da adiponectina, agregando informações importantes no contexto da identificação precoce de indivíduos que, na condição de portadores de RD, são mais susceptíveis a sofrer amputação. Embora esse polimorfismo já tenha sido associado ao aumento do risco cardiovascular em asiáticos e europeus [25, 26] e quando associado à terapia com insulina seja um fator de risco para RD [14], até onde sabemos, esta é a primeira vez que a associação com membro amputação é relatada.

Uma relação direta entre concentração e expressão de adiponectina e calcificação arterial periférica foi relatada [27]. Os autores argumentam que a relação pode ser consequência de uma resposta biológica ao processo de calcificação. Por outro lado, outros estudos encontraram uma relação inversa entre os níveis de adiponectina total e doença arterial periférica em mulheres inicialmente saudáveis [28] e homens saudáveis [29]. Embora a relação entre os níveis de adiponectina e as condições clínicas que aumentam o risco de amputação tenha sido encontrada, o efeito de polimorfismos no

gene da adiponectina, especialmente rs266729, ainda não foi relatado. A associação entre portadores do alelo G, que são majoritariamente heterozigotos neste estudo, e a ocorrência de fatores de confusão resistentes à amputação que são reconhecidos como fatores de risco para amputação, como HbA1C [30] e uso de insulinoterapia, associada ou não à agentes hipoglicemiantes orais [24]. As variantes genéticas rs266729 consistem em uma substituição C / G no -11377 que está localizado na região promotora de ADIPOQ e se sobrepõe aos locais dos fatores de transcrição Sp1, resultando em menor atividade de transcrição no G (alelo menor) [31]. Portanto, é possível que os portadores do alelo rs266729 tenham níveis mais baixos de adiponectina, reduzindo os efeitos protetores da molécula.

A inflamação sistêmica de baixo grau e o estresse oxidativo desempenham um papel importante na patogênese da retinopatia diabética [4]. No presente estudo, demonstramos que a ocorrência do polimorfismo do gene rs266729 da adiponectina não piorou as variáveis cardiometabólicas e os marcadores de estresse inflamatório e oxidativo em indivíduos com retinopatia diabética.

Em relação ao consumo alimentar, verificou-se que a ingestão de gorduras e ácidos graxos saturados foi aumentada em pacientes com retinopatia diabética com portadores do alelo rs266729 G em comparação com pacientes com genótipo CC. No entanto, ambos os grupos apresentaram proporção de ingestão de lipídios na dieta dentro da recomendação nutricional para diabetes mellitus tipo 2 (20 - 35% de lipídios do valor energético total da dieta) e, da mesma forma, a proporção de ingestão de ácidos graxos saturados na dieta foi inadequada para ambos os grupos (acima de 6% do valor energético total da dieta). Os estudos que comparam o consumo de alimentos com genótipos de adiponectina são raros. Há um resultado com crianças que sugere que polimorfismos no promotor da adiponectina podem influenciar a ingestão calórica; e que especificamente o alelo G rs266729 está associado a um pior perfil lipídico [32]. No presente estudo, a associação entre o alelo G rs266729 e maior ingestão de gorduras saturadas apareceu na comparação dos grupos de genótipos, mas não resistiu na regressão logística binária incluindo variáveis de confundimento.

5. Conclusão

Os portadores do alelo G rs266729 de pacientes com retinopatia diabética têm maior probabilidade de amputação de membros e maior ingestão de ácidos graxos saturados do que portadores de CC. Esta informação precisa ser confirmada em estudos mais robustos e em outras populações.

Potenciais limitações

Este é um estudo transversal realizado com uma população nordestina e generalizabilidade ou transportabilidade podem não se aplicar. A dosagem sérica de adiponectina não foi realizada no presente estudo para avaliar se o polimorfismo no gene rs266729 da adiponectina tem impacto negativo sobre os níveis séricos de adiponectina.

Agradecimentos: Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil) projeto número 057/13, edital 001/2013 FAPESQ / Ministério da Saúde / CNPq no âmbito do convênio SINCOV 774379/2012 FAPESQ / Ministério da Saúde / CNPq no programa PPSUS. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

VPSB foi responsável pela coleta de amostras biológicas, análises experimentais, redação do manuscrito, CSA foi responsável pela coleta de dados nutricionais, análises experimentais, TGD foi responsável pela coleta de dados nutricionais, YO foi responsável pela análise de dados nutricionais, ASS foi responsável pela coordenação das análises laboratoriais e revisão do manuscrito, MSB foi responsável pela análise molecular, IWQE foi responsável pelos exames de retina dos pacientes, DCP coordenou o trabalho em todas as suas etapas. Todos os autores participaram da análise e discussão dos dados.

Tabela 1- Avaliação das variáveis antropométricas, bioquímicas e clínicas em pacientes com retinopatia diabética dos Grupos CC e CG + GG. Caracterização da população estudada segundo o polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina

Variáveis	Grupo CC (n57)	Grupo CG+GG (n=41)	p
IDADE	61,74 ± 8,90	61,49 ± 8,84	0,89
PCR (mg/L)	0,21 (-0,14 - 1,73)	0,26 (0,06 - 0,96)	0,62
HbA1c (%)	7,00 (6,61 - 7,49)	7,59 (6,98 - 7,85)	0,25
Glicemia de jejum (mg/dL)	137,00 (129,00 - 156,28)	141,00 (128,39 - 167,76)	0,64
CT (mg/dL)	163,08 ± 40,44	164,73 ± 47,64	0,85
HDL-c (mg/dL)	40,00 (38,44 - 44,26)	42,00 (38,45 - 46,43)	0,65
LDL-c (mg/dL)	93,88 ± 35,55	91,64 ± 38,67	0,77
TG (mg/dL)	110,00 (113,37 - 162,30)	117,00 (118,93 - 181,39)	0,53
Creatina (mg/dL)	0,88 (0,85 - 1,02)	0,82 (0,7469 - 9558)	0,19
MDA (nmol/mL)	3,50 (3,31 - 3,65)	3,40 (3,33 - 3,86)	0,43
CAT(%)	20,00 (16,76 - 27,26)	22,00 (16,00 - 24,51)	0,62
PAS (mmHg)	148,95 ± 22,09	142,32 ± 20,436	0,13
PAD (mmHg)	92,44 ± 13,27	89,64 ± 14,700	0,33
IMC	28,37 ± 4,32	28,83 ± 4,38	0,61
RCQ	0,97 (0,95 - 0,99)	0,97 (0,93 - 0,98)	0,34
Soma 4 pregas cutâneas (mm)	76,69 ± 24,11	74,10 ± 24,12	0,60
Insulinoterapia	31 (54,4%) 0,692 (0,502 - 0,954)	31 (75,6%) 1,800 (1,005 - 3,223)	0,032*
Amputação de Membro	02 - 3,5% 0,360 (0,105 - 1,234)	07 (17,1%) 2,036 (1,314 - 3,155)	0,022*

Classificação da Retinopatia diabética

Leve (n, %)	11/57 (19.3%)	11/41 (26.8%)	0.46
Moderada (n, %)	12/57 (21.0%)	9/41 (21.9%)	1.00
Severa (n, %)	18/57 (31.6%)	10/41 (24.5%)	0.50
Proliferativa (n, %)	16/57 (28.1%)	11/41 (26.8%)	1.00

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo de confiança de 95%) e foram analisados por testes t de *Student* ou Manny Whitney de acordo com a distribuição dos dados. O teste exato de *Fisher* foi usado para dados categóricos. Abreviaturas: IMC, índice de massa corporal; PCR, proteína C reativa; HbA1c, hemoglobina glicada; MDA, malondialdeído; CAT, capacidade antioxidante total; CT, colesterol total; TG, triglicerídeos; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL-c, colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol de lipoproteína de baixa densidade; RCQ, relação cintura-quadril.

Tabela 2. Avaliação do consumo alimentar em pacientes com e sem o polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina dos grupo CC e grupo CG + GG com retinopatia diabética

Variables	CC group (n=57)	CG+GG group (n=41)	p-value
Ingestão de energia (Kcal / dia)	1326,20 ± 79	1333,41± 72,37	0,64
Carboidratos (g / dia)	171,78 ± 11,62	172,02 ± 10,90	0,92
Índice glicêmico	29,06 ± 6,15	30,75 ± 6,41	0,19
Proteínas (g / dia)	79,05 ± 7,83	81,00 ± 7,88	0,23
Gordura total (g / dia)	35,0±5,36	36,83 ±4,96	0,09
Ácido graxo ômega 3 (g / dia)	0,35 (0,33 – 0,41)	0,35 (0,34 – 0,41)	0,75
Ácido graxo ômega 6 (g / dia)	4,93 ± 1,23	5,14 ± 1,23	0,42
Ácido graxo ômega 9 (g / dia)	7,54± 0,60	7,62 ± 0,52	0,50
Gordura saturada (g / dia)	10,69 (10,3972 – 11,3391)	12,22 (11,2431 – 12,3270)	0,012*
Gordura monoinsaturada (g / aa)	10,24 ± 1,89	10,39 ± 1,44	0,67
Gordura trans (g / dia)	0,59 ± 0,13	0,60 ± 0,12	0,69

Fonte: dados da pesquisa. * $p < 0,05$; Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo de confiança de 95%) e foram analisados por testes t de Student ou Mann Whitney de acordo com a distribuição dos dados.

Tabela 3. Modelo de regressão logística binária avaliando a influência do polimorfismo rs266729 do gene da adiponectina na ingestão alimentar, variáveis antropométricas, bioquímicas e clínicas

	B	p-valor	OD
Idade	-0,00 ± 0,03	0,99	0,99 (0,94 – 1,06)
SEXO	1,04 ± 1,39	0,45	2,82 (0,18 – 43,0)
PCR	0,36 ± 0,55	0,55	1,43 (0,49 – 4,19)
HbA1c	0,16 ± 0,54	0,77	1,17 (0,40 – 3,41)
Glicose	0,16 ± 0,54	0,70	1,17 (0,40 – 3,41)
HDL-c	0,35 ± 0,56	0,54	1,41 (0,46 – 4,28)
LDL-c	-0,00 ± 0,01	0,56	0,99 (0,98 – 1,01)
TG	-0,36 ± 0,61	0,56	0,70 (0,21 – 2,33)
Creatinina	0,42 ± 0,59	0,47	1,53 (0,48 – 4,89)
MDA	-0,51 ± 0,58	0,38	0,60 (0,19 – 1,88)
TAC	0,11 ± 0,52	0,83	1,12 (0,40 – 3,10)
IMC	0,04 ± 0,06	0,54	1,04 (0,91 – 1,18)
Carboidratos (g / dia)	0,01 ± 0,05	0,83	1,01 (0,90 – 1,13)
Proteínas (g / dia)	0,05 ± 0,04	0,24	1,05 (0,97 – 1,14)
Gordura total (g / dia)	0,11 ± 0,09	0,18	1,12 (0,95 – 1,33)
Ácido graxo ômega 6 (g / dia)	0,09 ± 0,30	0,76	1,09 (0,60 – 1,99)
Ácido graxo ômega 3 (g / dia)	-0,24 ± 0,60	0,69	0,78 (0,24 – 2,54)
Gordura saturada (g / dia)	-0,98 ± 0,77	0,20	0,37 (0,08 – 1,69)
Gordura monoinsaturada (g / aa)	-0,39 ± 0,28	0,17	0,68 (0,39 – 1,18)
Gordura trans (g / dia)	1,59 ± 2,27	0,48	4,92 (0,57 – 421,95)
Índice glicêmico	0,07 ± 0,05	0,15	1,07 (0,97 – 1,18)
Terapia de insulina	-0,50 ± 0,59	0,40	0,61 (1,19 – 1,93)
Amputação de Membro	2,895 ± 1,214	0,017*	18,090 (1,677 – 195,197)

Fonte: dados da pesquisa. * $p < 0,05$; B = coeficiente de regressão beta ± erro padrão; OD = limites de Odds superior e inferior; Abreviaturas: IMC, índice de massa corporal; PCR, proteína C reativa; HbA1c, hemoglobina glicada; MDA, malondialdeído; CT, colesterol total; TG, triglicerídeos; HDL-c, colesterol de lipoproteína de alta densidade.

Tabela 4. Modelo de regressão logística binária, verificando a influência da amputação de membro na ingestão alimentar, parâmetros antropométricos, bioquímicos

	B	p-valor	OD
Idade	-0,04 ± 0,05	0,35	0,95 (0,86 – 1,05)
Sexo	2,31± 1,23	0,06	10,11 (0,90 – 113,50)
Terapia de insulina	2,28 ± 1,37	0,09	9,85 (0,67 – 144,11)
AdipoQ	-2,38 ± 1,05	0,02*	0,09 (0,01 – 0,72)
HbA1c	0,34 ± 0,88	0,69	1,41 (0,25 – 7,91)
IMC (Kg / m2)	-0,08 ± 0,10	0,38	0,92 (0,75 – 1,11)
Gordura saturada	0,27 ± 1,10	0,80	1,32 (0,15 – 11,34)
Gordura total	0,20 ± 0,11	0,08	1,22 (0,97 – 1,54)
Índice glicêmico	0,10 ± 0,07	0,18	1,10 (0,95 – 1,28)

Fonte: dados da pesquisa. * $p < 0,05$; B = coeficiente de regressão beta ± erro padrão; OD = limites de Odds superior e inferior.

Referências

1. *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. Diabetes Care, 2020. **43**(Suppl 1): p. S14-S31.
2. Behroozian A, Beckman JA Microvascular Disease Increases Amputation in Patients With Peripheral Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40(3):534-40.
doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312859
3. Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kambik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT; Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003 Sep;110(9):1677-82.
doi: 10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
4. Calderon GD, Juarez OH, Hernandez GE, Punzo SM, De la Cruz ZD. Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment. *Eye (Lond)*. 2017 Aug;31(8):1122-1130.
doi: 10.1038/eye.2017.64.
5. Kuo JZ, Guo X, Klein R, Klein BE, Genter P, Roll K, Hai Y, Goodarzi MO, Rotter JI, Chen YD, Ipp E. Adiponectin, Insulin Sensitivity and Diabetic Retinopathy in Latinos With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Sep;100(9):3348-55.
doi: 10.1210/jc.2015-1221.
6. Li J, Shen X. Oxidative stress and adipokine levels were significantly correlated in diabetic patients with hyperglycemic crises. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Feb 6;11:13.
doi: 10.1186/s13098-019-0410-5.
7. Afarid M, Attarzadeh A, Farvardin M, Ashraf H. The Association of Serum Leptin Level and Anthropometric Measures With the Severity of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2018 Winter;7(4):156-162.
8. Tuttolomondo A, La Placa S, Di Raimondo D, Bellia C, Caruso A, Lo Sasso B, Guercio G, Diana G, Ciaccio M, Licata G, Pinto A. Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity. *Cardiovasc Diabetol*. 2010 Sep 13;9:50.
doi: 10.1186/1475-2840-9-50.
9. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003 Jan 18;361(9353):226-8.

doi: 10.1016/S0140-6736(03)12255-6

10. Sun P, Liu L, Chen J, Chen Y, Shi L, Imam MU, Chen Y, Pei X, Xu Y, Guo Y, Ping Z, Fu X. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Nov;96(47):e8745. '

doi: 10.1097/MD.00000000000008745.
11. Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Péan F, Hadjadj S, Tichet J, Wilpart E, Chesnier MC, Balkau B, Froguel P, Marre M; Epidemiologic Data on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) Study Group. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1150-7.

doi: 10.2337/diabetes.53.4.1150.
12. Prior SL, Gable DR, Cooper JA, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, Stephens JW. Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J*. 2009 May;30(10):1263-9.

doi: 10.1093/eurheartj/ehp090.
13. Han LY, Wu QH, Jiao ML, Hao YH, Liang LB, Gao LJ, Legge DG, Quan H, Zhao MM, Ning N, Kang Z, Sun H. Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, -11377C>G, -11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. 2011 *Diabetologia* 54(9): 2303-14.

doi: 10.1007/s00125-011-2202-9.
14. Li Y, Wu QH, Jiao ML, Fan XH, Hu Q, Hao YH, Liu RH, Zhang W, Cui Y, Han LY. Gene-environment interaction between adiponectin gene polymorphisms and environmental factors on the risk of diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig*. 2015 Jan;6(1):56-66.

doi: 10.1111/jdi.12249.
15. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, Ramirez A, Schlaich M, Stergiou GS, Tomaszewski M, Wainford RD, Williams B, Schutte AE. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*. 2020 Jun;75(6):1334-1357.

doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.

doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
17. d de Lima Tavares Toscano L, Silva AS, de França ACL, de Sousa BRV, de Almeida Filho EJB, da Silveira Costa M, Marques ATB, da Silva DF, de Farias Sena K, Cerqueira GS, da Conceição Rodrigues Gonçalves M. A single dose of purple grape juice improves physical performance and antioxidant activity in

- runners: a randomized, crossover, double-blind, placebo study. *Eur J Nutr.* 2020 Oct;59(7):2997-3007.
doi: 10.1007/s00394-019-02139-6.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
doi: 10.1093/nar/16.3.1215.
 19. Gable DR, Matin J, Whittall R, Cakmak H, Li KW, Cooper J, Miller GJ, Humphries SE; HIFMECH investigators. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. *Ann Hum Genet.* 2007 Jul;71(Pt 4):453-66.
doi: 10.1111/j.1469-1809.2006.00340.x.
 20. de Oliveira Y, Lima RPA, Luna RCP, Monteiro MGCA, da Silva CSO, do Nascimento RAF, de Farias Lima KQ, Andrade E Silva AH, de Lima Ferreira FEL, de Toledo Vianna RP, de Moraes RM, de Oliveira NFP, de Almeida ATC, Silva AS, da Silva Diniz A, de Carvalho Costa MJ, da Conceição Rodrigues Gonçalves M. Decrease of the DNA methylation levels of the ADRB3 gene in leukocytes is related with serum folate in eutrophic adults. *J Transl Med.* 2018 Jun 5;16(1):152.
doi: 10.1186/s12967-018-1529-0.
 21. Lipsky BA, Weigelt JA, Sun X, Johannes RS, Derby KG, Tabak YP. Developing and validating a risk score for lower-extremity amputation in patients hospitalized for a diabetic foot infection. *Diabetes Care.* 2011 Aug;34(8):1695-700.
doi: 10.2337/dc11-0331.
 22. Abaci A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinç H, Ergin A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation.* 1999 May 4;99(17):2239-42.
doi: 10.1161/01.cir.99.17.2239.
 23. Yarom R, Zirkin H, Stämmler G, Rose AG. Human coronary microvessels in diabetes and ischaemia. Morphometric study of autopsy material. *J Pathol.* 1992 Mar;166(3):265-70.
doi: 10.1002/path.1711660308.
 24. i CI, Lin CC, Cheng HM, Liu CS, Lin CH, Lin WY, Wang MC, Yang SY, Li TC. Derivation and validation of a clinical prediction model for assessing the risk of lower extremity amputation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Jul;165:108231.
doi: 10.1016/j.diabres.2020.108231.
 25. Kanu JS, Qiu S, Cheng Y, Li R, Kou C, Gu Y, Bai Y, Shi J, Li Y, Liu Y, Yu Y, Liu Y. Associations between three common single nucleotide polymorphisms (rs266729, rs2241766, and rs1501299) of ADIPOQ and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2018 May 28;17(1):126.

doi: 10.1186/s12944-018-0767-8.

26. Zhang H, Mo X, Hao Y, Gu D. Association between polymorphisms in the adiponectin gene and cardiovascular disease: a meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2012 May 28;13:40.

doi: 10.1186/1471-2350-13-40.

27. Aubert CE, Liabeuf S, Amouyal C, Kemel S, Lajat-Kiss F, Lacorte JM, Halbron M, Carlier A, Salem JE, Funck-Brentano C, Perisic Matic L, Witasz A, Stenvinkel P, Phan F, Massy ZA, Hartemann A, Bourron O. Serum concentration and vascular expression of adiponectin are differentially associated with the diabetic calcifying peripheral arteriopathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Apr 29;11:32.

doi: 10.1186/s13098-019-0429-7.

28. Ho DY, Cook NR, Britton KA, Kim E, Creager MA, Ridker PM, Pradhan AD. High-molecular-weight and total adiponectin levels and incident symptomatic peripheral artery disease in women: a prospective investigation. *Circulation*. 2011 Nov 22;124(21):2303-11.

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.045187.

29. Joosten MM, Joshipura KJ, Pai JK, Bertola ML, Rimm EB, Mittleman MA, Mukamal KJ. Total adiponectin and risk of symptomatic lower extremity peripheral artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 May;33(5):1092-7.

doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301089.

30. Zhou ZY, Liu YK, Chen HL, Yang HL, Liu F. HbA1c and Lower Extremity Amputation Risk in Patients With Diabetes: A Meta-Analysis. *Int J Low Extrem Wounds*. 2015 Jun;14(2):168-77.

doi: 10.1177/1534734615593190.

31. Zhang D, Ma J, Brismar K, Efendic S, Gu HF. A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study. *J Diabetes Complications*. 2009 Jul-Aug;23(4):265-72.

doi: 10.1016/j.jdiacomp.2008.05.004.

32. Zandoná MR, Rodrigues RO, Albiero G, Campagnolo PD, Vitolo MR, Almeida S, Mattevi VS. Polymorphisms in LEPR, PPARG and APM1 genes: associations with energy intake and metabolic traits in young children. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013 Nov;57(8):603-11.

doi: 10.1590/s0004-27302013000800004.

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre **Epigenética + genética: identificação de marcadores para Retinopatia Diabética** e está sendo desenvolvida por Vanessa Polyana de Sousa e Tainá Gomes Diniz, ambas mestrandas do Curso de Pós Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Profa Darlene Camati Persuhn.

Os objetivos do estudo são estudar se alguns genes presentes nas suas células apresentam versões que podem estar relacionadas às complicações da diabetes que acontecem numa região dos olhos denominada retina. A finalidade deste trabalho é contribuir para identificar marcadores genéticos e precoces da retinopatia diabética, podendo abrir caminho para identificação antecipada de indivíduos com risco da complicação ou da sua rápida progressão.

Solicitamos a sua colaboração para *1) responder algumas questões sobre sua condição de saúde, medicamentos que toma, e o conhecimento que possui sobre diabetes utilizando questionários apropriados que demorarão em torno de 20 minutos, 2) permitir aos pesquisadores determinar seu peso em balança apropriada; altura, medida da cintura e quadril utilizando fita métrica; 3) permitir a coleta de uma amostra de sangue equivalente a 30mL ou 3 colheres de sopa, que servirá para determinação das taxas bioquímicas importantes para o estudo (colesterol, HDL, triglicerídeos, glicose, hemoglobina glicada, creatinina) e variáveis bioquímicas relacionadas aos genes estudados. A mesma amostra de sangue será utilizada para isolamento do DNA cromossomal que permitirá analisar os marcadores genéticos que você possui.* Solicitamos ainda sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto.

Informamos que a coleta de sangue pode trazer um pequeno desconforto local e a presença de hematoma discreto que tente a desaparecer em poucos dias. Caso ocorra dor ou aparecimento de hematoma devido a coleta de sangue, você deverá entrar em contato com os pesquisadores e será orientado sobre a utilização de compressas e utilização de medicamentos de uso tópico. Por participar deste projeto, sua condição de diabético pode ficar exposta, no entanto, toda a identificação de materiais será realizada através de códigos para evitar sua exposição.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

João Pessoa, ____ de _____ de _____
dactiloscópica


Impressão

Assinatura do participante ou responsável legal

Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Vanessa Polyana de Sousa, Telefone: (81) 99712-3000, Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn Telefone: 83 999423268, email darlenecp@hotmail.com ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br Campus I – Fone: 32167964

APÊNDICE C

INSTRUMENTO PARACOLETA DE DADOS

• Data da entrevista ____/____/____

Nome do entrevistador: _____	Nº de identificação: _____
Nome: _____	Sexo () F () M
Idade atual: _____	Data de nascimento: ____/____/____
Naturalidade: _____	Etnia: _____
Unidade(ambatório de acompanhamento): _____	
Prontuário HU : _____	Prontuário CEROF : _____
Telefone : _____	
Endereço: _____	

DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS

- Estado civil:
() casado (a) () desquitado(a)/ separado
() viúvo (a) () solteiro (a) () outros
- Ocupação:
() trabalha () aposentado
() do lar () outra: _____
- Número de membros da Família (residência): _____
- Escolaridade: _____

DADOS REFERENTES AO DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E CONTROLE DO DIABETES E OUTRAS COMORBIDADES

Tempo de Diagnóstico da Diabetes: _____

Tempo de Diagnóstico da RD: _____

Casos de DM na família: () sim () não

• Fatores de risco para complicações vasculares:

S () N () tabagismo

S () N () etilismo

S () N () sedentarismo

S () N () HAS há _____ anos

S () N () dislipidemia

S () N () sobrepeso/obesidade

S () N () depressão

• Tratamento realizado:

() dieta () dieta e antidiabético oral

() dieta e insulina () dieta, antidiabético oral e insulina () outro

• Medicamentos que faz uso:

• Presença de complicações:

S () N () IAM- Infarto agudo do miocárdio

S () N () amputação de membro

S () N () pé diabético

S () N () AVE- Acidente vascular encefálico(derrame)

() Neuropatia () Nefropatia

• Qual a Frequência que você faz uma consulta médica?

() 2 ou mais vezes por mês

() 1 vez por mês

() a cada 2(dois) meses

() a cada 3 (três) meses

() a cada 6 meses

() 1 vez por ano

• Exames laboratoriais:

HbA1c _____ Glicemia de jejum _____

Colesterol total _____ Colesterol HDL _____

Colesterol LDL _____ Triglicerídeos _____

Creatinina _____ CAT/MDA _____

DADOS DA AVALIAÇÃO CLÍNICA

• Oftalmologia

() RDNP leve () RDNP moderada

() RDNP severa () RDP

() EMD (edema macular diabético)

Que tipo de tratamento vem sendo realizado para RD ? _____

Pressão arterial :

P.A. Sistólica: _____ P.A. Diastólica: _____

Avaliação Antropométrica:

Peso Atual(Kg)	Estatura(cm):	IMC(Kg/m²): Estado Nutricional:
CIRCUNFERÊNCIAS		
Cintura(cm):	Quadril(cm):	Relação C/Q: Resultado:
DOBRAS CUTÂNEAS (Referência DURNIN E WOMERSLEY, 1974)		
Tricipital(mm):	Bicipital(mm):	
Subscapular(mm):	Suprailíaca(mm):	
Percentual de gordura (%):		

APÊNDICE D-RECORDATÓRIO ALIMENTAR 24 HORAS.

ID: []

Nome: _____ Data: / /

RECORDATÓRIO ALIMENTAR: 1º [] 2º []

Refeições/Alimentos		Medida Caseira	Tamanho da porção	Valor em gramas/ml	Observações
Café Da Manhã					Preencher as medidas mostrando o álbum de medidas caseiras. Para mensurar o valor de g/ml das medidas caseiras, considerar o valor da porção média do QFCA, Se for pequena, / 2 Se for grande, + ½ Se for extra-grande, X 2 (p25 – p50 – p75 – p100) Descrever quantidades de alimentos por preparação: Papás, sopas, macarronada, feijoada, etc. E colocar neste recordatório, perguntado a responsável pela preparação, para quantas pessoas será dividida. Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário. Descrever o tipo de cocção: - -Fritura -Grelhado -Cozido - Assado
Lanche					
Almoço					
Lanche					
Jantar					
Lanche Noturno					
Preferências Alimentares:					
Aversões Alimentares:					

ANEXO

ANEXO A- TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Epigenética + genética: identificação de marcadores para Retinopatia Diabética

Pesquisador: Darlene Camati Persuhn

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 11

CAAE: 99840118.3.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAIBA - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.214.108

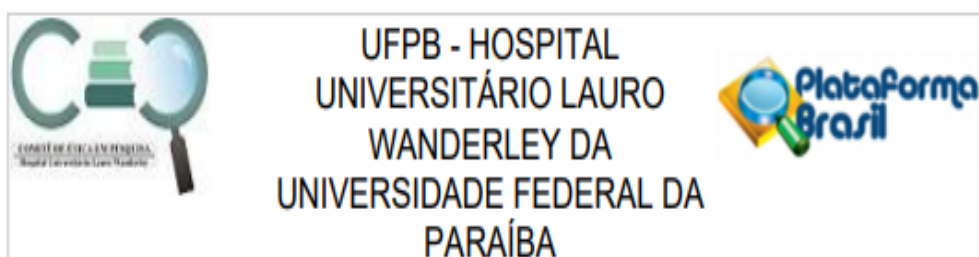
Apresentação do Projeto:

Protocolo de pesquisa - Versão_11, Emenda_07.

Histórico de Versões anteriores do Protocolo de pesquisa:

Projeto Original Versão_01 - PO-01 - Parecer nº 3018211 - Pendente (13/11/2018)

Versão_02 - PO-02 - Parecer nº 3053068 - Aprovado (03/12/2018)



Continuação do Parecer: 4.214.108

Outros	fapesq.pdf	17:58:24	Persuhn	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	30/09/2018 15:45:30	Darlene Camati Persuhn	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	formularioGEP.pdf	30/09/2018 15:34:05	Darlene Camati Persuhn	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	certidaoPPGCN.pdf	30/09/2018 15:32:10	Darlene Camati Persuhn	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimento.pdf	30/09/2018 15:30:49	Darlene Camati Persuhn	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	30/09/2018 15:29:48	Darlene Camati Persuhn	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 14 de Agosto de 2020

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador(a))