

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

MYLENNE DA SILVA BARROS

**ANÁLISE DO EFEITO DOS POLIMORFISMOS RS266729
DO *ADIPOQ* E RS7539542 DO *ADIPOR1* SOBRE
PARÂMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS,
ANTROPOMÉTRICOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
DIABÉTICOS TIPO 2**

**JOÃO PESSOA – PB
NOVEMBRO – 2021**

MYLENNE DA SILVA BARROS

**ANÁLISE DO EFEITO DOS POLIMORFISMOS RS266729 DO
ADIPOQ E RS7539542 DO *ADIPOR1* SOBRE PARÂMETROS
CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS, ANTROPOMÉTRICOS E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM DIABÉTICOS TIPO 2**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso
de Graduação em Farmácia, do
Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.**

Orientadora: Dra. Darlene Camati Persuhn

**JOÃO PESSOA-PB
NOVEMBRO – 2021**

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B277a Barros, Mylenne da Silva.

ADIPOQ Análise do efeito dos polimorfismos RS266729 do
e RS7539542 do ADIPOR1 sobre parâmetros clínicos,
bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo em
diabéticos tipo 2 / Mylenne da Silva Barros. - João
Pessoa, 2021.
51f.

Orientação: Darlene Camati Persuhn.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Diabetes. 2. Adiponectina. 3. Polimorfismos
genéticos. I. Persuhn, Darlene Camati. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 616.379-008.64

MYLENNE DA SILVA BARROS

**ANÁLISE DO EFEITO DOS POLIMORFISMOS RS266729 DO
ADIPOQ E RS7539542 DO ADIPOR1 SOBRE PARÂMETROS
CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS, ANTROPOMÉTRICOS E DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM DIABÉTICOS TIPO 2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em 22 de Novembro de 2021.



Prof^a. Dr^a. Darlene Camati Persuhn
Universidade Federal da Paraíba- UFPB



Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Campana
Universidade Federal da Paraíba- UFPB



Prof^a. Dr^a. Temilce Simões de Assis Cantalice
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por guiar todos os meus passos e estar sempre acima e a frente de tudo na minha vida, e à minha Doce Mãe de Deus pela intercessão, pelo modelo de fé, de perseverança e de entrega aos planos divinos.

Aos meus pais, Luciene e Eduardo, por nunca duvidarem da minha capacidade, por priorizarem a educação na minha vida, pela compreensão nos momentos que precisei me ausentar para estudar, pelo apoio e confiança em mim, eu sou e serei eternamente grata por tudo isso.

À minha irmã, Rayenne, por sempre ser meu exemplo e meu maior incentivo aos estudos, com certeza sem o apoio dela teria sido tudo muito mais difícil. Muito obrigada por todos os conhecimentos partilhados, pela força, pela amizade e amor de sempre.

Ao meu parceiro, Higor, por me ensinar tanto a ser uma pessoa melhor, por ser meu ombro amigo, por toda a paciência e amor e também por ser alívio em muitos momentos conturbados.

À todos da minha família, que sempre estiveram comigo, que me ajudaram e me incentivaram nos congressos, na formatura e durante todo o curso. Essa vitória é nossa.

Às minhas amigas, Tainá e Scheilla que me ajudaram na organização desse trabalho e todos os outros que direta ou indiretamente fizeram parte desse sonho, muito obrigada por todos os momentos, todas as risadas e apoio.

Aos meus colegas de turma, Heivila, Rubens, Larissa Alves, Herlanny, Larissa Xavier e Giovana, por toda a parceria, ajuda e amizade, vocês deixaram tudo mais leve e foram uma força para eu chegar até aqui.

À minha orientadora, Darlene, pela oportunidade, por confiar sempre na minha capacidade, por me ensinar tanto como professora, como pessoa, como pesquisadora. A senhora foi realmente uma mãe e um anjo na minha vida durante esses anos.

Aos meus colegas de laboratório, pelo conhecimento partilhado, por toda paciência, por todo amor, todos os que fizeram e fazem parte do LEMAC foram essenciais para minha caminhada e meu crescimento.

À banca, professoras Eloiza e Temilce, pela disponibilidade, colaboração,

atenção e cuidado nos apontamentos realizados nesse trabalho.

Por fim agradeço à todos os professores que passaram seus ensinamentos ao longo desses 5 anos, à UFPB, à Coordenação do Curso de Farmácia, à PROPESQ e ao CNPq, por todo apoio, pela excelência no ensino e pelo incentivo à pesquisa que sem dúvidas foi o maior diferencial na minha formação.

Mylenne Barros

RESUMO

Análise do efeito dos polimorfismos rs266729 do *ADIPOQ* e rs7539542 do *ADIPOR1* sobre parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo em diabéticos tipo 2

Mylenne da Silva Barros

Coordenação do Curso de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso
CCS/UFPB (2021)

A Diabetes tipo 2 é uma doença crônica metabólica de etiologia complexa e multifatorial caracterizada principalmente por resistência à insulina e hiperglicemia persistente. A adiponectina é uma proteína “antidiabética” que atenua a resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação. A atividade metabólica da molécula é mediada pela ligação ao receptor de adiponectina 1. O polimorfismo rs266729 é uma variante genética encontrada do gene da adiponectina e o rs7539542 é um polimorfismo localizado no gene do receptor de adiponectina 1, ambas as variantes afetam a transcrição e expressão da adiponectina e seu receptor respectivamente. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos dos polimorfismos rs266729 e rs7539542 nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo em diabéticos tipo 2. O estudo foi composto por 107 diabéticos recrutados do Hospital Universitário Lauro Wanderley. Amostras de sangue e urina foram utilizadas para determinações dos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo, variáveis antropométricas foram determinadas por nutricionistas, complicações crônicas foram diagnosticadas por médicos do hospital e a hipertensão arterial foi auto referida. O DNA foi extraído de leucócitos, e os genótipos dos polimorfismos determinados pela técnica de PCR–RFLP. Os resultados indicaram que o genótipo CG do rs266729 associa-se com hipertensão arterial e menores níveis de capacidade antioxidante total, enquanto que os portadores de GG apresentaram maior hemoglobina glicada. O rs7539542 e a associação simultânea do rs266729+rs7539542 não mostraram influência nas variáveis estudadas. Dessa forma, informações importantes são adicionadas no contexto genético da diabetes e da adiponectina.

Palavras-chave: Diabetes; Adiponectina; Polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Analysis of the effect of polymorphisms rs266729 from *ADIPOQ* and rs7539542 from *ADIPOR1* on clinical, biochemical, anthropometric and oxidative stress parameters in type 2 diabetic patients

Mylenne da Silva Barros

Coordenação do Curso de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

CCS/UFPB (2021)

Type 2 diabetes is a chronic metabolic disease of complex and multifactorial etiology characterized mainly by insulin resistance and persistent hyperglycemia. Adiponectin is an “anti-diabetic” protein that attenuates insulin resistance, oxidative stress and inflammation. The molecule's metabolic activity is mediated by binding to the adiponectin 1 receptor. The rs266729 polymorphism is a genetic variant found in the adiponectin gene and rs7539542 is a polymorphism located in the adiponectin 1 receptor gene, both variants affect transcription and expression of adiponectin and its receptor respectively. The aim of this study was to evaluate the effects of the rs266729 and rs7539542 polymorphisms on clinical, biochemical, anthropometric and oxidative stress parameters in type 2 diabetics. The study consisted of 107 diabetics recruited from the University Hospital Lauro Wanderley. Blood and urine samples were used to determine biochemical parameters and oxidative stress, anthropometric variables were determined by nutritionists, chronic complications were diagnosed by hospital physicians, and arterial hypertension was self-reported. DNA was extracted from leukocytes, and the genotypes of polymorphisms determined by the PCR–RFLP technique. The results indicated that the CG genotype of rs266729 is associated with arterial hypertension and lower levels of total antioxidant capacity, while GG carriers had higher glycated hemoglobin. The rs7539542 and the simultaneous association of rs266729+rs7539542 showed no influence on the studied variables. In this way, important information is added in the genetic context of diabetes and adiponectin.

Keywords: Diabetes; Adiponectin; Genetic polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema das enzimas e tecidos-alvo da sinalização do ADIPOR1 através da AMPK e seus efeitos fisiológicos.....	21
Figura 2 – Localização do rs266729 no gene <i>ADIPOQ</i>	22
Figura 3 – Localização do rs7539542 no gene <i>ADIPOR1</i>	24
Figura 4 – Representação do gel de poliacrilamida com os fragmentos do polimorfismo rs266729.....	29
Figura 5 – Representação do gel de poliacrilamida com os fragmentos do polimorfismo rs266729.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise dos genótipos do polimorfismo rs26729 da adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo	31
Tabela 2 – Análise dos genótipos do rs7539542 do receptor de adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo	32
Tabela 3 – Análise simultânea dos genótipos dos polimorfismos rs266729 da adiponectina e rs7539542 do receptor de adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3' não traduzida
ACC	Acetil-CoA-carboxilase
ADIPOQ	Adiponectina
ADIPOR1	Receptor de Adiponectina 1
ADIPOR2	Receptor de Adiponectina 2
AMPK	Proteína-cinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
DAC	Doença Arterial Coronariana
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
eEf2	Fator de Alongamento 2
FAS 1	Ácido graxo-sintase
GLUT1	Transportador de Glicose 1
GLUT4	Transportador de Glicose 4
GPAT	Aciltransferase
GS	Glicogênio-sintase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Colesterol de Alta Densidade
HMGR	HMG-CoA-redutase
HSL	Lipase Sensível a Hormônio
HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	Colesterol de Baixa Densidade
MEE	Músculo Estriado Esquelético
mTORC1	Alvo Mecanístico do Complexo 1 da Rapamicina
ND	Nefropatia Diabética
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFK-2	Fosfofrutocinase
PPM	Padrão de Peso Molecular
RD	Retinopatia Diabética

RFLP	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição
RNAm	RNA mensageiro
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 DIABETES MELLITUS.....	16
2.1.1 Diabetes Mellitus tipo 2	17
2.2 ADIPONECTINA	18
2.2.1 Receptor de adiponectina 1	20
2.3 POLIMORFISMO RS266729 DO <i>ADIPOQ</i>	22
2.4 POLIMORFISMO RS7539542 DO <i>ADIPOR1</i>	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	26
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	26
4.3 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS	26
4.3.1 Parâmetros clínicos	26
4.3.2 Parâmetros bioquímicos	26
4.3.3 Parâmetros do estresse oxidativo	27
4.3.4 Parâmetros antropométricos	27
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA	27
4.5 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS	28
4.5.1 Polimorfismo rs266729	28
4.5.1 Polimorfismo rs7539542	29
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	37
8 REFERÊNCIAS	38

APÊNDICES.....46

ANEXOS.....48

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) é um distúrbio no metabolismo da glicose de início insidioso e de causas multifatoriais. O DM2 se caracteriza por resistência periférica à insulina devido a uma falha na secreção e/ou ação desse hormônio, que acarreta o aumento dos níveis de glicose sanguínea. Geralmente o DM2 acomete pessoas acima de 40 anos, porém devido aos maus hábitos alimentares, obesidade e sedentarismo está cada vez mais comum em faixas etárias menores (SBD, 2019).

A hiperglicemia persistente presente no DM2 pode desencadear graves complicações nos vasos do coração, olhos, rins, nervos e dentes e além disso, diabéticos são mais propensos a infecções (IDF, 2020). Existem vários fatores de risco para a DM2 além do estilo de vida em si, pode-se destacar o histórico familiar de diabetes, hipertensão arterial e dislipidemia (SBD, 2019).

Os fatores de risco clínicos e a glicemia são de grande importância na patogênese do DM2, porém os estudos deles isoladamente não bastam para o esclarecimento total dos fatores da diabetes e para previsão do desenvolvimento de complicações. Para tanto, pesquisas direcionadas a identificação de variantes genéticas relacionadas a doença, aumentam a probabilidade e a exatidão da previsão do risco de DM2 e complicações associadas (COLE; FLOREZ, 2020).

A adiponectina (ADIPOQ) é um hormônio peptídico produzido pelo tecido adiposo com uma variedade de atividades biológicas benéficas, entre elas o aumento da sensibilização à insulina, atenuação de inflamação e inibição de morte celular. Essa adipocina age através de dois receptores: receptor de adiponectina 1 (ADIPOR1) e receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2) (HOLLAND et al., 2011).

O polimorfismo rs266729 está localizado na região promotora do gene *ADIPOQ* e vem se mostrando importante para o DM2. O alelo variante G do polimorfismo afeta negativamente a transcrição da adiponectina, além de contribuir para o desenvolvimento do DM2 e se relacionar com parâmetros de estresse oxidativo em população diabética (ZHANG et al., 2009; SUN et al., 2017; PRIOR et al., 2009).

O polimorfismo rs7539542 localiza-se na 3' UTR (região 3 não traduzida) do gene *ADIPOR1*. O rs7539542 modula a expressão do receptor onde o genótipo GG relaciona-se com menor atividade de transcrição do *ADIPOR1*, aumento do

risco de DM2 e com doenças macrovasculares em diabéticos (KLAKAMANI et al., 2008; QI et al., 2007; SOCCIO et al., 2006).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIABETES *MELLITUS*

O Diabetes *Mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico crônico complexo que ocorre quando há uma hiperglicemia persistente devido a não produção e/ou falha na ação da insulina. A etiologia do DM é decorrente de fatores genéticos, biológicos e ambientais e esses fatores são a base para a classificação da doença (SBD, 2019).

A estimativa de portadores de DM mostra números consideravelmente altos e que continuam em ascensão. No ano de 2009 o número de adultos (20-79 anos) com diabetes no mundo era de 285 milhões, já no ano de 2019 cerca de 463 milhões de pessoas nessa faixa etária vivem com DM em todo o mundo, o que representa cerca de 9,3% da população adulta mundial. No Brasil, o número de adultos com algum tipo de diabetes é cerca de 16,8 milhões o que corresponde a 8% dos brasileiros com estimativa de 26 milhões até 2045, e vale ressaltar que o país em 2019 era o quinto no ranking mundial (IDF, 2019).

Por ser uma desordem metabólica crônica complexa e multifatorial se faz necessário cuidados médicos contínuos e estratégias de controle glicêmico eficaz pois, a hiperglicemia crônica é o principal fator predisponente para o desenvolvimento das complicações crônicas vasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e aumento na mortalidade. O número de óbitos decorrente de diabetes e suas complicações no mundo em 2019 é de aproximadamente 4,2 milhões (ADA, 2020; SBD, 2019; IDF, 2019).

A classificação é importante pois ela é essencial na determinação da terapia do paciente. Segundo a Associação Americana de Diabetes (2020), o DM pode ser classificada em quatro grandes grupos: Diabetes *Mellitus* tipo 1 (doença autoimune em que há destruição das células produtoras de insulina); Diabetes *Mellitus* tipo 2 (doença crônica causada por uma perda progressiva da produção e/ou da sensibilidade à insulina); Diabetes *Mellitus* Gestacional (diabetes diagnosticado durante a gravidez principalmente no segundo ou terceiro trimestre

de gestação) e outros tipos de diabetes (inclui-se monogênicas, diabetes neonatal, secundária a doenças do pâncreas exócrino, a infecções ou a medicamentos ou após transplante de órgãos).

O diagnóstico do DM é realizado através de exames laboratoriais. A Sociedade Brasileira de Diabetes (2019) tem como base os seguintes exames: Glicemia em jejum (acima ou igual a 126 mg/dL), Teste de Tolerância a Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose ou glicose ao acaso (acima ou igual a 200 mg/dL) e Hemoglobina glicada (HbA1c) (maior que 6,5%). A vantagem do teste de tolerância à glicose é que pode ser detectável no início da doença principalmente da DM2 porque reflete a secreção de insulina e a vantagem da HbA1c é que ela mostra os níveis glicêmicos dos últimos 3 meses oferecendo maior confiança ao resultado e independe de jejum.

Porém, devido a muitos fatores entre eles: início insidioso dos sintomas, inexistência de biomarcadores precoces, falta de informação e portadores assintomáticos, a DM pode permanecer indetectável e/ou não diagnosticada por vários anos, fato esse que favorece o desenvolvimento de complicações. É estimado que cerca de 50% dos casos em adultos não sejam diagnosticados e desses não diagnosticados 84,3% sejam de residentes de países em desenvolvimento (BEAGLEY et al., 2014).

2.1.1 Diabetes *Mellitus* tipo 2

O DM2 é o tipo de diabetes mais comum, responsável por cerca de 90% dos casos. É uma doença multifatorial caracterizada por deficiência de insulina e resistência à insulina, no entanto os indivíduos portadores de DM2 pelo menos nos primeiros anos da doença não necessitam de insulinoaterapia (ADA, 2020).

A categorização dentro do grupo de diabéticos tipo 2 pode ser uma ferramenta importante para a individualização dos protocolos de tratamento e para a identificação do risco aumentado de complicações crônicas, pois o DM2 é um distúrbio com poucos sintomas e algumas vezes assintomáticos (BANDEIRA, 2021). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2019), os sintomas clássicos do DM2, mesmo que pouco frequentes, relacionam-se com o quadro de hiperglicemia sendo: poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso inexplicável entre outros como fadiga e sonolência.

Um dos grandes problemas de doenças crônicas como a DM2, é o surgimento de complicações que são responsáveis por alterarem a qualidade de vida do paciente. Pode-se destacar as complicações microvasculares exclusiva de diabéticos: nefropatia diabética (ND) (caracterizada por hipertensão, declínio na taxa de filtração glomerular e aumento da excreção de albumina); retinopatia diabética (RD) (caracterizada pelo aumento na permeabilidade vascular e neovascularização da retina) e neuropatia diabética que é a mais frequente e está associada com alterações neuropáticas e se relacionam com as outras duas complicações (BANDEIRA, 2021).

Os diabéticos tipo 2 apresentam maior risco no desenvolvimento de doenças macrovasculares como: doença coronariana, acidente vascular encefálico isquêmico, insuficiência cardíaca e doença arterial obstrutiva periférica. Além disso, indivíduos com DM2 tem uma redução de expectativa de vida estimada em 4 a 8 anos em relação a não diabéticos (SBD, 2019).

Além do controle da hiperglicemia que é o principal fator predisponente do DM2, se faz necessário o controle da pressão arterial e das variáveis lipídicas, ambos fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 e/ou de complicações crônicas. Com o devido controle, acompanhamento médico, estilo de vida saudável e terapia medicamentosa adequada, os pacientes diabéticos tipo 2 conseguem ter uma qualidade de vida adequada e saudável (IDF, 2019).

2.2 ADIPONECTINA

A adiponectina é um hormônio produzido pelos adipócitos com a atividade principal de sensibilizar os órgãos aos efeitos da insulina, mas além disso a ADIPOQ realiza efeitos importantes sobre o metabolismo de ácidos graxos a partir da β -oxidação e também bloqueando a produção de novas moléculas de ácidos graxos, bloqueia também a síntese de glicose hepática e estimula a captação da glicose sanguínea já disponível no organismo. Além disso, a adiponectina é conhecida como uma molécula antiaterogênica, anti-inflamatória e antiapoptótica e por todas essas razões uma molécula “antidiabética” (NELSON; COX, 2019; HOLLAND et al., 2011).

Uma metanálise revelou que níveis elevados de adiponectina se associam com um menor risco de desenvolvimento de DM2 em várias populações (LI et al.,

2009). Já em população afro-americana um estudo de coorte mostrou uma relação interessante da adiponectina prevendo de forma significativa a diabetes tipo 2 (HANLEY et al., 2011).

A relação da adiponectina com obesidade é bem estabelecida na literatura, a síntese de ADIPOQ e seus níveis sanguíneos diminuem com a obesidade ao passo que aumentam com a perda de peso. Níveis séricos reduzidos de adiponectina foram encontrados em camundongos com diabetes e obesidade (NELSON; COX, 2019; MAEDA et al., 2002).

Maiores níveis de adiponectina relacionam-se com maior HDL e por outro lado menores valores de índice de massa corpórea (IMC), circunferência da cintura, triglicerídeos, glicemia em jejum, insulina em jejum e também inversamente proporcional a hipertensão arterial, mostrando menores valores pressão sistólica e diastólica (MENTE et al., 2013).

Uma melhora da função endotelial mediada pelo aumento da adiponectina foi relatada em camundongos obesos e diabéticos (WONG et al., 2011). Além disso, mulheres adultas portadoras de síndromes metabólicas com menores níveis de ADIPOQ, se apresentaram com um risco 10 vezes maior de terem resistência à insulina em comparação com as mulheres que tinham maiores níveis de adiponectina (SOEBIJANTO; WASPADJI, 2010).

Uma substância sintética que mimetiza a ADIPOQ, foi testada e demonstrou efeitos bastante semelhantes aos da adiponectina em camundongos com dieta rica em lipídeos, entre os efeitos destacam-se: melhora da resistência à insulina e melhora da intolerância à glicose. Em outros modelos de roedores obesos a substância sintética amenizou o DM (IWABU et al., 2013). Além disso, a suplementação de adiponectina pode auxiliar na restauração da sensibilidade cardíaca no estágio inicial do DM (LI et al., 2016).

O gene *ADIPOQ* e principalmente sua região promotora é uma área que contam com a presença de bastante SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos). Além disso, o *ADIPOQ* é um gene de grande interesse por parte dos estudos de DM2, pois apresenta uma suscetibilidade promissora para a diabetes (ZHA et al., 2017)

As concentrações séricas de adiponectina e variantes genéticas em *ADIPOQ* (rs182052 e rs17300539) participam do processo de patogênese de doenças cardiovasculares em diabéticos tipo 2 (FOUCAN et al., 2014). Outros

polimorfismos tais como: rs12637534, rs16861209 e rs17366568 também estiveram relacionados com alterações na concentração de adiponectina além de contribuírem para o desenvolvimento de DM2 (PETERS et al., 2013).

Os dois receptores principais responsáveis pela ação da adiponectina são o ADIPOR1 e o ADIPOR2 que são codificados por genes que situam-se respectivamente nas regiões cromossômicas 1p36.13-q41 e 12p13.31. ADIPOR1 está expresso principalmente no músculo estriado esquelético (MEE) e tem afinidade principalmente pela adiponectina globular, o ADIPOR2 por sua vez é predominante no fígado com afinidade pela adiponectina de comprimento total (YAMAUCHI et al., 2003).

2.2.1 Receptor de adiponectina 1

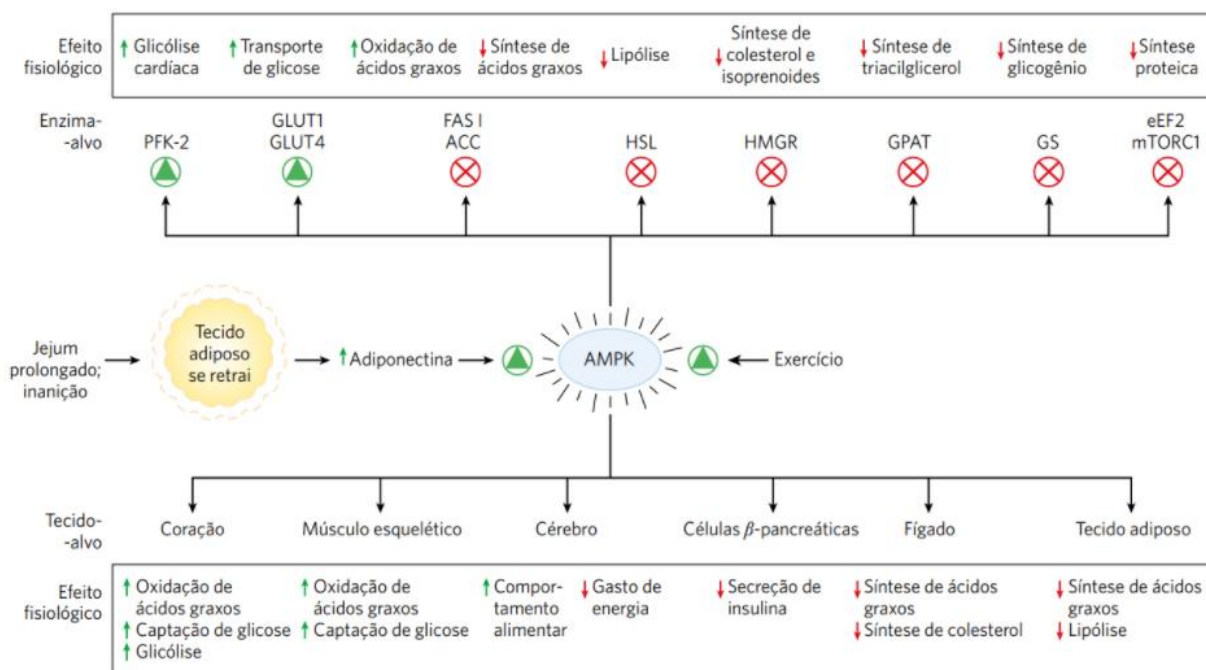
O receptor de adiponectina 1 foi descrito pela primeira vez por Yaumuchi e colaboradores em 2003, como um receptor com uma afinidade maior pela adiponectina globular e expresso em vários locais como hepatócitos, adipócitos e células-beta, porém sua localização é predominantemente no MEE.

O ADIPOR1 é um receptor acoplado a proteína G cuja sinalização acontece por meio da ativação da proteína-quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A AMPK quando ativada, regula várias enzimas que desencadeiam variadas respostas no organismo, no geral há uma inibição de atividades que consomem energia e esse mecanismo afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas no coração, no MEE, no cérebro, nas células -beta, fígado e no próprio tecido adiposo (**Figura 1**) (NELSON; COX, 2019).

Quando o ADIPOQ é produzido e liberado pelos adipócitos o hormônio se liga ao ADIPOR1 que ativa a sinalização intracelular através da AMPK que por sua vez ativa por fosforilação a fosfofrutocinase (PFK-2) e os transportadores de glicose 1 e 4 (GLUT1 e GLUT4), desencadeando efeitos como o aumento da glicólise e o aumento do transporte de glicose, enquanto inativa a glicogênio-sintase (GS) dessa forma diminuindo a síntese de glicogênio. Por outro lado, há uma inibição em enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico como: ácido graxo-sintase 1 (FAS 1), acetil-CoA-carboxilase (ACC), lipase sensível a hormônio (HSL), HMG-CoA-redutase (HMGR) e aciltransferase (GPAT) gerando uma diminuição na síntese de ácidos graxos, colesterol e triacilglicerol, ao passo que

aumentam a oxidação dos ácidos graxos. Por fim, também inativam o fator de alongamento 2 (eEf2) e o alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina (mTORC1) fatores necessários para a síntese proteica (**Figura 1**) (NELSON; COX, 2019).

Figura 1 – Esquema das enzimas e tecidos-alvo da sinalização do ADIPOR1 através da AMPK e seus efeitos fisiológicos.



Fonte: NELSON; COX, 2019.

O comprometimento da sinalização de ADIPOR1 se mostrou como responsável pela perda da cardioproteção no DM e no mesmo estudo foi demonstrado que após a indução da diabetes a expressão de ADIPOR1 teve uma redução significativa em ratos (LI et al., 2016). Em indivíduos com histórico familiar de DM2, os níveis de ADIPOR1 foram menores em comparação às pessoas sem histórico e em contrapartida uma maior expressão do receptor relacionou-se com uma melhor sensibilidade à insulina (CIVITARESE et al., 2004).

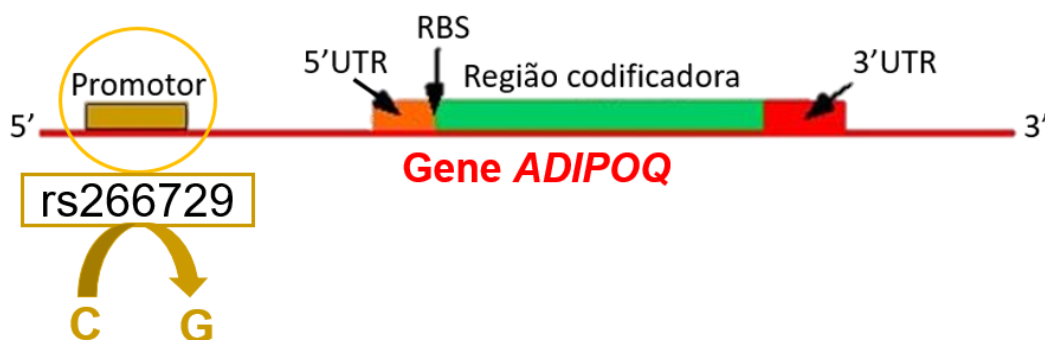
Um agonista sintético do receptor de adiponectina teve resultados importantes frente a nefropatia diabética associada ao DM2, produzindo uma melhora na lesão de podócitos e nas células glomerulares (KIM et al., 2018). Uma isoflavona vegetal por sua vez foi testada em ratos com ND e restaurou pelo menos de forma parcial a expressão de ADIPOR1 *in vitro* e *in vivo*, além de propor que o ADIPOR1 desempenha um papel crítico na ND (YANG et al., 2020).

As variantes genéticas em *ADIPOR1* exercem uma influência sobre o risco de DM mesmo que independa das concentrações de adiponectina. Dois SNPs especialmente (rs1342387 e rs12733285) relacionaram-se com um aumento de aproximadamente 18% das chance de desenvolvimento de diabetes (MATHER et al., 2012). Os polimorfismos em *ADIPOR1* contribuem também para suscetibilidade a DM2 e DAC (Doença Arterial Coronariana) simultaneamente ou não (JIN et al., 2014).

2.3 POLIMORFISMO RS266729 DO *ADIPOQ*

O polimorfismo rs266729 (11377C>G) está situado na região promotora do gene *ADIPOQ* e realiza a conversão de uma citosina por uma guanina (**Figura 2**) e tal gene localiza-se na região cromossômica 3q27 que é descrita como um locus de susceptibilidade à síndromes metabólicas e diabetes tipo 2 (VIONNET et al., 2000).

Figura 2 – Localização do rs266729 no gene *ADIPOQ*.



Fonte: Autor

Esse polimorfismo é amplamente estudado no contexto de várias doenças e etiologias. Um exemplo disso, são estudos recentes mostrando uma associação do alelo G do rs266729 com susceptibilidade à câncer colorretal sendo um risco aumentado para indivíduos com IMC>24kg/cm² e um aumento do risco de adenocarcinoma pancreático, assim como outros dois polimorfismos de *ADIPOQ* rs1501299 e rs2241766 (HUNG et al., 2020; MOHAMED et al., 2019).

O alelo G se associa com menores níveis de adiponectina mesmo em populações distintas como americanos, chipriotas e russos (ZHANG et al., 2009;

CHRISTODOULOU et al., 2020; SMETNEV et al., 2019). Em mexicanos ainda, o alelo G do polimorfismo associou-se como fator de risco para o desenvolvimento de síndromes metabólicas (ROBLES et al., 2020).

Meta-análise realizada sugeriu que o rs266729 aumenta o risco de diabetes gestacional na Ásia e Europa, porém na população do Estados Unidos o risco foi diminuído (BAI et al., 2020). Houve ainda uma associação com uma anormalidade da tolerância à glicose pós-parto e o polimorfismo em japonesas com diabetes gestacional recente (KASUGA et al., 2019).

Resultados apontando uma relação do polimorfismo com DAC e desordens cardiológicas vêm se mostrando cada vez mais frequente. Um estudo de coorte pode observar que o alelo G do rs266729 associou-se com a prevalência de DAC e angina instável, por sua vez uma meta-análise pôde afirmar que essa variante nesse mesmo alelo se associa com a suscetibilidade a DAC em determinadas populações junto com outros três polimorfismos de *ADIPOQ*: rs822395, rs1501299 e rs2241766. Outra meta-análise indicou que o rs266729 em seus modelos de genótipos GG ou CG se associaram com um aumento no risco de doenças cardiovasculares (SMETNEV et al., 2019; WANG et al., 2019; KANU et al., 2018).

O HDL foi um parâmetro lipídico alterado associado com o genótipo GG e GC do polimorfismo. O alelo G relacionou-se com o peso corporal, circunferência abdominal, percentual de gordura e IMC elevados (KAFTAN; HUSSAIN, 2015; ZADJALO et al., 2013). O genótipo GG indicou de forma significativa uma suscetibilidade para DM2 em egípcios obesos (ALY et al., 2020).

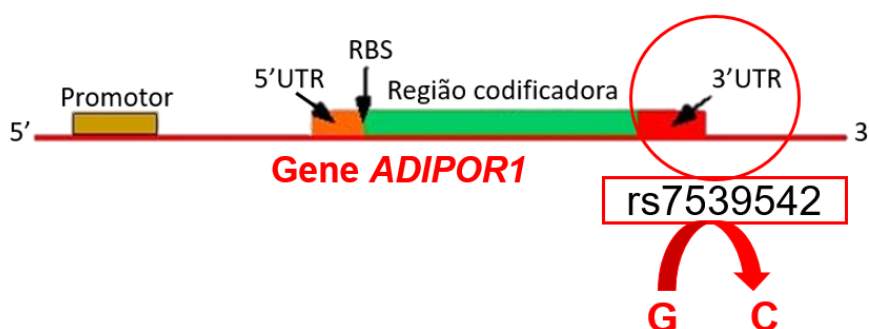
A frequência do alelo G é significativamente maior em indivíduos com DM2 comparado a não diabéticos (KAFTAN; HUSSAIN, 2015). Além disso, o alelo mostrou um maior risco de DM2 em russos e espanhóis além de estarem relacionados com maiores taxas de hiperglicemia em obesos (SMETNEC et al., 2019; DE LUIS et al., 2020).

O alelo G ainda aumenta o risco de DM2 em 1,13 vezes em comparação aos não portadores do alelo. Além disso, os indivíduos com o genótipo GG comparado a CC têm um aumento de risco de três vezes para desenvolver DM2, já para o grupo de heterozigoto o aumento chega a ser duas vezes maior comparado ao genótipo CC (SUN et al., 2017; KAFTAN; HUSSAIN et al., 2015).

2.4 POLIMORFISMO RS7539542 DO *ADIPOR1*

O polimorfismo rs7539542 (10225 G>C), localiza-se na 3'UTR do gene *ADIPOR1* que por sua vez está presente no cromossomo 1 (**Figura 3**). Esse polimorfismo realiza a conversão de uma guanina por uma citosina e frequência dos alelos e sua distribuição em diferentes populações são distintas e esse polimorfismo ainda é pouco explorado na literatura (ncbi.nlm.nih.gov, 2021).

Figura 3 – Localização do rs7539542 no gene *ADIPOR1*.



Fonte: Autor

Porém, estudos e meta-análises indicam uma relação do rs7539542 com alguns tipos de câncer. Pode haver uma associação do polimorfismo com câncer colorretal em asiáticos e com o risco de câncer de próstata em americanos (YE et al., 2015; KAKLAMANI et al., 2011). Também há relações significativas do SNP com o câncer de mama, onde em sua etiologia tem a participação da adiponectina e é mais comum em mulheres obesas e diabéticas (KAKLAMANI et al., 2008).

Uma importante descoberta foi em relação ao genótipo GG do polimorfismo e transcrição de *ADIPOR1*, pois GG atua diminuindo a quantidade de RNA mensageiro (RNAm) em que apresenta de 30 a 40% menos RNAm comparado aos outros dois genótipos GC e CC (KAKLAMANI et al., 2008; SOCCIO et al., 2006).

O alelo G do rs7539542 já esteve associado com DAC em pessoas sem diabetes, o genótipo GG associou-se com DAC em diabéticos e o genótipo GC pode aumentar o risco de DAC em diabéticos tipo 2 (LI et al., 2016; SOCCIO et al., 2006; JIN et al., 2014). No entanto, para o genótipo GC houve um estudo controverso em que relacionou-o com maiores níveis de HDL em portadores de DM2 (YEH et al., 2008).

O genótipo GG mostrou um risco aumentado de DM2 em mulheres (QI et al., 2007). Além disso, o mesmo genótipo teve relações significativas com parâmetros lipídicos como: IMC, circunferência abdominal e espessura de pregas cutâneas, sendo o GG o genótipo com maiores valores dessas variáveis em mexicanos (RICHARDSON et al., 2006).

Por outro lado, um estudo Finlandês de Prevenção ao Diabetes associou o genótipo CC do rs7539542 com maiores níveis de insulina em jejum em pacientes homens com tolerância à glicose prejudicada, porém foi demonstrado também que portadores do alelo C tiveram os níveis mais elevados de glicose em jejum na mesma população (SIITONEN et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos dos polimorfismos rs266729 do gene *ADIPOQ* e rs7539542 do gene *ADIPOR1* sobre parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Associar os três genótipos do rs266729 com os parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo dos pacientes diabéticos da amostra;
- Realizar a análise da associação dos três genótipos do rs7539542 com os parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo dos pacientes diabéticos da amostra;
- Analisar os indivíduos que simultaneamente portam o alelo de risco para ambos os polimorfismos *versus* os não portadores do alelo de risco, com os parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo dos pacientes diabéticos da amostra.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Todos os participantes incluídos no estudo tem a partir de 40 anos de idade e são portadores de DM2 com diagnóstico de 5 a 10 anos. A amostra é composta por 107 pacientes que foram recrutados e atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley (parecer de número 1.335.108). Todos os participantes incluídos no estudo foram esclarecidos da proposta e objetivo do projeto e deram seu consentimento através de assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

4.3 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS

4.3.1 Parâmetros clínicos

Os portadores de retinopatia diabética foram diagnosticados por um oftalmologista do HULW através do exame de fundoscopia. A nefropatia diabética foi diagnosticada por um médico especialista em nefrologia do HULW após consulta e análise do resultado da dosagem de microalbuminúria. Na amostra correspondente 47 pacientes apresentaram nefropatia e/ou retinopatia diabética, enquanto os outros 60 pacientes não foram diagnosticados com nenhuma das duas complicações. Os pacientes com consentimento através do TCLE cederam informações pessoais e clínicas já diagnosticadas anteriormente e auto referiram a presença ou ausência de hipertensão arterial.

4.3.2 Parâmetros bioquímicos

Para a determinação da hemoglobina glicada (%), proteína C reativa (mg/dL) e microalbuminúria foi utilizado o método de imunoturbidimetria, para a creatinina sérica o método utilizado foi o picrato alcalino enquanto que para glicemia utilizou-se o método da glicose oxidase e todos foram realizados com kits comerciais seguindo as orientações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os parâmetros lipídicos colesterol total (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL) foram analisados por método enzimático Trinder enquanto que o colesterol de alta densidade (HDL) foi por ultracentrifugação-detergente seletivo ambos por kits comerciais da Labtest. Já para o colesterol de baixa densidade (LDL) sua determinação se deu pela fórmula de Friedewald apresentada como: $[LDL] = [COLESTEROL\ TOTAL] - [HDL - [TRIGLICERÍDEOS / 5]]$. Todos os exames citados foram determinados através de amostras do sangue dos pacientes com exceção da microalbuminúria que foi determinada a partir da urina de 24 horas.

4.3.3 Parâmetros do estresse oxidativo

O malondialdeído foi dosado através da reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979) determinado através da leitura em espectrofotômetro. Para a capacidade antioxidante total utilizou a reação de redução do radical 2,2 difenil-1- picril-hidrazila por método colorimétrico e lido em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

4.3.3 Parâmetros antropométricos

As variáveis antropométricas índice de massa corpórea (IMC) e circunferência abdominal foram determinadas através de instrumentos adequados por nutricionista da equipe, o IMC foi representado em kg/cm^2 e a circunferência da cintura em centímetros.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi isolado através dos leucócitos seguindo o protocolo de Miller

(MILLER et al., 1988). O protocolo consiste em inicialmente, diluir a amostra de sangue em uma solução contendo Tris-HCl, EDTA, sacarose e Triton-X 1%, a solução é centrifugada e descarta-se o sobrenadante, repete-se o processo por cerca de três vezes, o objetivo dessa etapa é realizar a lise das hemácias e descarta-las.

O precipitado vindo da primeira etapa é ressuspenso em outra solução que contém Tris-HCl, dodecil sulfato de sódio, EDTA e proteinase K, a solução com a amostra é incubada a 55°C por 7 horas. Essa etapa tem como objetivo a lise dos leucócitos para expor seus compartimentos intracelulares, a proteinase K é uma adaptação do protocolo afim de reagir e degradar as proteínas que não são de interesse e assim, isolar um DNA mais puro, livre de proteínas e de melhor qualidade.

Após a incubação adiciona-se EDTA e acetato de amônio, a mistura é centrifugada por 1 minuto e se destina a realizar a precipitação das proteínas. O sobrenadante resultado da centrifugação é separado em outro tubo e adiciona-se isopropanol, afim de realizar a precipitação do DNA. O precipitado então é lavado com álcool 70%, seco e ressuspenso em tampão Tris-EDTA com pH=8. O DNA isolado é mantido a -20°C para posterior análises moleculares.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS

4.5.1 Polimorfismo rs266729

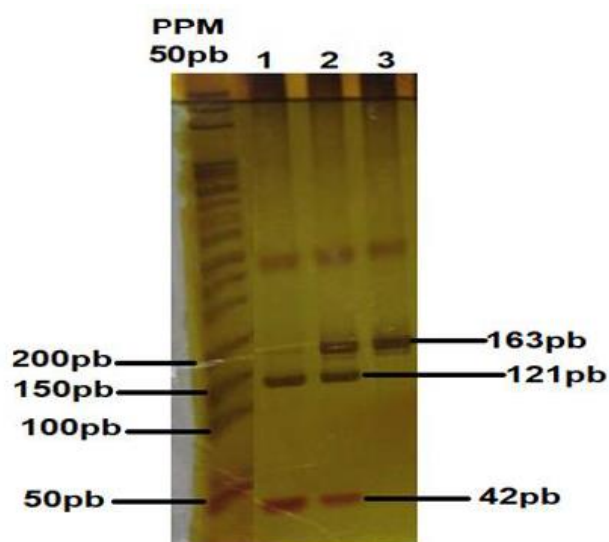
A determinação dos genótipos do polimorfismo rs266729 foi realizada através da técnica de RFLP (Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição). A técnica de RFLP consiste na amplificação da região de interesse através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), essa reação é possível através da utilização do DNA previamente extraído com os dois iniciadores específicos para a sequência gênica (F: CATCAGAATGTGTGGCTTGC e R: AGAAGCAGCCTGGAGAACTG) e a enzima Taq polimerase, a reação é submetida a ciclos de temperaturas específicas no termociclador com temperatura de anelamento em 65°C e assim a região é amplificada.

O resultado da amplificação é submetido então ao processo de digestão (3 horas a 37°C) com a enzima HhaI que é uma endonuclease de restrição específica

capaz de reconhecer os alelos polimórficos do rs266729 (PRIOR et al., 2009). Os fragmentos característicos dos genótipos foram observados após a corrida em eletroforese vertical através de gel em poliacrilamida 15% corado com nitrato de prata.

Na Figura 2 é possível a observação das representações dos três genótipos possíveis para o rs266729 em três amostras de pacientes diferentes. O gel de poliacrilamida tem como base o Padrão de Peso Molecular (PPM) de 50 pares de base (pb). A coluna 1 representa o genótipo GG com os fragmentos de 121pb e 42pb, a coluna 2 indica o genótipo CG (163pb, 121pb e 42pb) e a coluna 3 o genótipo CC com somente a banda de 163pb.

Figura 4 – Representação do gel de poliacrilamida com os fragmentos do polimorfismo rs266729.



PPM 50pb= Padrão de Peso Molecular de 50 pares de base. Coluna 1= Genótipo GG; Coluna 2= Genótipo GC; Coluna 3= Genótipo CC. Fonte: Autoria Própria.

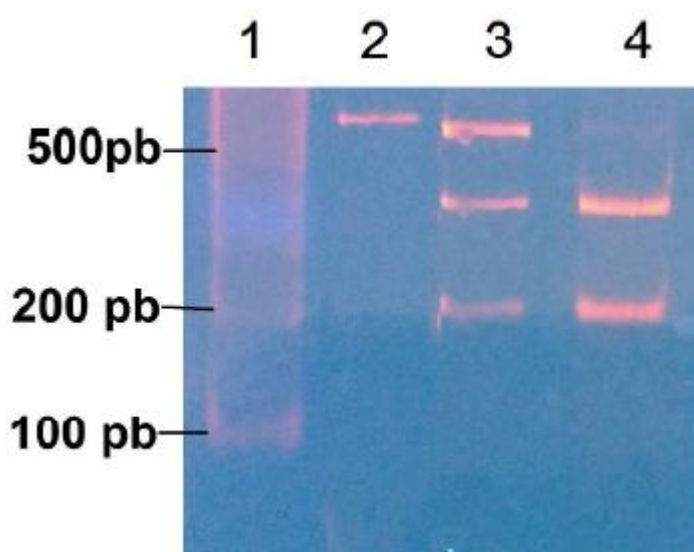
4.5.2 Polimorfismo rs7539542

Em relação ao polimorfismo rs7539542, utilizou-se a técnica de RFLP, iniciando com PCR que nesse caso utiliza: DNA molde, os dois iniciadores específicos da região do gene *ADIPOR1* (F: GCACCCAGCCCTGAGAATCT; R: CCGGCTAATCATGGAAGTGTGT) e a enzima Taq polimerase. Após a amplificação da região de interesse com a temperatura de anelamento de 65°C, o DNA amplificado é submetido a processo de digestão em 37°C por três horas com a endonuclease BsmAI (JIN et al., 2014). O resultado dos fragmentos digeridos

foi realizado através de eletroforese e observado em gel de poliacrilamina 10% corado com gel Red (Biotium®) que é possível a observação através de transiluminador de ultravioleta.

Na Figura 3, pode-se observar como os genótipos são representados no gel de poliacrilamida após a corrida da eletroforese tendo como base o PPM de 100pb representado na coluna 1. Na coluna 2 se observa apenas um fragmento em 542pb o que representa o genótipos GG, na coluna 3 há três fragmentos: 542pb, 349pb e 193pb, isso é representativo do genótipo GC e na coluna 4 há dois fragmentos: 349pb e 193pb o que indica o genótipos CC. Ao final das 107 análises dos pacientes, foram repetidos 10% da amostra afim de confirmar os genótipos já estabelecidos.

Figura 5 – Representação do gel de poliacrilamida com os fragmentos do polimorfismo rs7539542.



Coluna 1= padrão de peso molecular de 100 pares de base; Coluna 2= genótipo GG; Coluna 3= genótipo GC; Coluna 4= genótipo CC. Fonte: Autoria própria.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados genéticos, bioquímicos e antropométricos foram organizados em banco de dados no programa IBM SPSS Statistics versão 25 onde as análises estatísticas também foram realizadas. Para as variáveis categóricas utilizou-se o teste Exato de Fisher representado com o valor bruto, a porcentagem em relação a classificação genotípica e a razão de risco.

Para as variáveis contínuas, os dados foram avaliados inicialmente de acordo com sua normalidade pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk para grupos com $n < 50$ e Kolmogorov Smirnov para $n > 50$. Os dados analisados com dois grupos amostrais que foram considerados normais utilizou-se o teste paramétrico de t de Student (média $\pm$ desvio padrão) e quando os dados não eram homogêneos, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney [mediana (intervalo de confiança de 95%)]. Para análises contendo três amostras independentes foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) apresentado com média $\pm$ desvio padrão. Para todos os testes citados, considerou-se significativo os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os participantes do estudo foram categorizados de acordo com o genótipo que portam para os dois polimorfismos em questão. Para o polimorfismo rs266729 do gene *ADIPOQ* foram 73 pacientes com o genótipo CC, 27 com CG e 7 com GG e a distribuição dos genótipos do polimorfismo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de $p = 0,8084$ e $X^2 = 3,6777$. A **Tabela 1** mostra as análises estatísticas realizadas associando os três genótipos com os parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo para o polimorfismo rs266729.

O polimorfismo rs266729 mostrou-se associado à hipertensão ($p = 0,003$), onde 92,6% do grupo com genótipo CG são hipertensos. Outra relação do genótipo CG foi que os pacientes do grupo tiveram os menores níveis de capacidade antioxidante total em comparação ao GG e CC ($p = 0,014$). Além disso, o parâmetro hemoglobina glicada também foi uma variável significativa para o polimorfismo ($p = 0,027$) onde os portadores do genótipo GG apresentaram os maiores níveis de hemoglobina glicada comparado aos outros dois genótipos (**Tabela 1**).

Tabela 1- Análise dos genótipos do rs266729 da adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo.

	CC (n=73)	CG (n=27)	GG (n=7)	p
Complicações crônicas	35 (47,9%)	9 (33,3%)	3 (42,9%)	0,432 ^{ab}
Hipertensão arterial	44 (60,3%)	25 (92,6%)	3 (42,9%)	0,003*^{ab}

Insulinoterapia	15 (20,8%)	4 (14,8%)	2 (28,6%)	0,674 ^{ab}
Hemoglobina Glicada	8,20 ± 0,20	7,74 ± 0,28	9,70 ± 0,82	0,027*^a
Glicemia	162,17 ± 5,83	156,52 ± 11,51	194,57 ± 31,24	0,262 ^a
Colesterol Total	197,68 ± 6,29	191,96 ± 8,22	184,00 ± 21,09	0,738 ^a
HDL	44,83 ± 1,30	42,71 ± 1,94	38,86 ± 3,15	0,300 ^a
LDL	113,54 ± 6,02	117,24 ± 7,99	111,786 ± 21,86	0,937 ^a
Triglicerídeos	197,28 ± 11,70	179,41 ± 16,69	167,29 ± 25,54	0,564 ^a
Creatinina	0,85 ± 0,30	0,80 ± 0,04	0,73 ± 0,90	0,370 ^a
Microalbuminúria	18,48 ± 2,65	21,02 ± 3,40	28,28 ± 12,23	0,509 ^a
Proteína C reativa	3,12 ± 0,30	2,87 ± 1,76	3,42 ± 1,13	0,861 ^a
Alfa-1-glicoproteína ácida	82,16 ± 1,83	77,83 ± 3,47	81,43 ± 6,83	0,506 ^a
Capacidade Antioxidante Total	36,86 ± 3,37	21,00 ± 4,50	50,00 ± 12,60	0,014*^a
Malondialdeído	3,55 ± 0,13	3,43 ± 0,26	3,69 ± 0,42	0,844 ^a
Índice de Massa Corpórea	29,47 ± 0,55	29,68 ± 0,79	26,07 ± 0,79	0,178 ^a
Circunferência Abdominal	104,44 ± 1,25	104,19 ± 2,52	94,14 ± 2,11	0,067 ^a

*Resultado estatisticamente significativo. a= Teste de ANOVA (média ± desvio padrão). ab= Teste de ANOVA com variáveis categóricas (quantidade bruta e %)

Em relação ao polimorfismo rs7539542 do gene *ADIPOR1* foram 19 pacientes com o genótipo GG, 56 com GC e 32 com CC e a distribuição dos genótipos do polimorfismo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme o valor de $p = 0,5607$ e $X^2 = 0,4168$.

A **Tabela 2** demonstra as análises realizadas associando os três genótipos do polimorfismo rs7539542 com os parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo. Conforme explanado abaixo, não foram encontrados resultados significativos estatisticamente para a associação dos três genótipos com os parâmetros de interesse (**Tabela 2**).

Tabela 2- Análise dos genótipos do rs7539542 do receptor de adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo.

	GG (n=19)	GC (n=56)	CC (n=32)	p
Complicações crônicas	6 (31,6%)	26 (46,4%)	15 (46,9%)	0,496 ^{ab}
Hipertensão arterial	13 (68,4%)	38 (67,9%)	21 (65,6%)	0,613 ^{ab}
Insulinoterapia	5 (26,3%)	9 (16,4%)	7 (21,6%)	0,971 ^{ab}
Hemoglobina Glicada	8,11 ± 0,32	8,14 ± 0,25	8,30 ± 0,29	0,902 ^a

Glicemia	169,21 ± 14,15	161,56 ± 7,65	161,38 ± 8,47	0,860 ^a
Colesterol Total	187,16 ± 12,29	194,42 ± 6,93	201,80 ± 8,59	0,604 ^a
HDL	47,37 ± 2,54	42,47 ± 1,54	44,34 ± 1,55	0,222 ^a
LDL	106,01 ± 11,22	116,41 ± 6,70	115,74 ± 8,57	0,719 ^a
Triglicerídeos	171,37 ± 18,10	185,25 ± 13,52	212,08 ± 16,01	0,275 ^a
Creatinina	0,82 ± 0,52	0,83 ± 0,34	0,83 ± 0,42	0,977 ^a
Microalbuminúria	10,86 ± 2,75	21,57 ± 3,33	19,76 ± 2,14	0,156 ^a
Proteína C reativa	3,04 ± 0,44	3,44 ± 0,39	2,46 ± 0,42	0,247 ^a
Alfa-1-glicoproteína ácida	80,05 ± 4,18	81,45 ± 2,18	80,83 ± 2,77	0,947 ^a
Capacidade Antioxidante Total	33,47 ± 5,82	32,82 ± 3,75	35,44 ± 5,71	0,919 ^a
Malondialdeído	3,65 ± 0,30	3,36 ± 0,14	3,73 ± 0,11	0,330 ^a
Índice de Massa Corpórea	29,49 ± 1,05	29,48 ± 0,88	29,30 ± 0,46	0,933 ^a
Circunferência Abdominal	106,37 ± 1,93	103,24 ± 1,46	102,94 ± 2,36	0,527 ^a

a= Teste de análise de variância (ANOVA) (média ± desvio padrão). ab= Teste de ANOVA com variáveis categóricas (quantidade bruta e %)

Por fim, na **Tabela 3** realizou-se uma análise simultânea dos genótipos dos dois polimorfismos (rs266729+rs7539542). Houveram 23 pacientes com o genótipo CC para ambos os polimorfismos simultaneamente e 25 pacientes portadores do alelo G para os dois polimorfismos. Os parâmetros analisados foram os mesmos clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo analisados para os polimorfismos separadamente, porém no caso da análise simultânea não houve diferença em nenhuma das variáveis conforme as análises estatísticas realizadas (**Tabela 3**).

Tabela 3- Análise simultânea dos genótipos do rs266729 da adiponectina e rs7539542 do receptor de adiponectina nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo.

	CC para os dois polimorfismos (n=23)	CG+GG para os dois polimorfismos (n=25)	p
Complicações crônicas	11 (47,8%) 1,40 (0,79-2,50)	8 (32,0%) 0,72 (0,40-1,32)	0,377 ^d
Hipertensão arterial	14 (60,9%)	21 (84,0%)	0,106 ^d

	0,58 (0,34-0,99)	1,95 (0,83-4,60)	
Insulinoterapia	5 (21,7%) 1,21 (0,61-2,37)	4 (16,0%) 0,83 (0,38-1,81)	0,719 ^d
Hemoglobina Glicada	8,47 ± 0,36	8,24 ± 0,38	0,678 ^b
Glicemia	174,35 ± 10,15	177,36 ± 14,19	0,866 ^b
Colesterol Total	196,68 ± 8,27	187,92 ± 9,07	0,483 ^b
HDL	44,35 ± 1,86	41,04 ± 2,01	0,236 ^b
LDL	109,45 ± 9,72	110,47 ± 8,20	0,936 ^b
Triglicerídeos	237,42 ± 17,79	191,75±18,46	0,083 ^b
Creatinina	0,80 ± 0,05	0,72 ± 0,33	0,178 ^b
Microalbuminúria	15,00 (12,91-31,99)	13,00 (10,84-28,58)	0,877 ^c
Proteína C reativa	3,76 ± 0,80	4,12 ± 7,60	0,742 ^b
Alfa-1-glicoproteína ácida	80,33 ± 4,80	80,33 ± 4,52	0,959 ^b
Capacidade Antioxidante	41,00 Total (27,96-56,65)	13,00 (18,24-42,24)	0,311 ^c
Malondialdeído	3,93 ± 0,18	3,55 ± 0,23	0,218 ^b
Índice de Massa Corpórea	29,67 (27,95-32,47)	27,92 (27,27-31,82)	0,476 ^c
Circunferência Abdominal	104,64 ± 2,88	103,96 ± 2,52	0,860 ^b

b= Teste t de Student (média±desvio padrão); c= teste Mann-Whitney (mediana e intervalo de confiança 95%); d= Exato de Fisher;

6 DISCUSSÃO

Para o rs266729 da adiponectina observou-se associação com o parâmetro de hipertensão arterial em que 92,6% do grupo de portadores de CG que além de diabéticos tipo 2 são também hipertensos (p=0,003).

A adiponectina em níveis mais baixos está relacionada com hipertensão arterial, assim como outras disfunções vasculares e cardiovasculares (ONG et al., 2010; PATEL et al., 2007). Por sua vez, indivíduos portadores de pelo menos um alelo G do polimorfismo rs266729, apresentam menores níveis de adiponectina (AVERY et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

O alelo G associou-se com um aumento de estenose coronariana e fatores de risco para doenças cardiovasculares e também demonstrou um aumento de 1 a 2% na pressão sistólica arterial (AVERY et al., 2011; PATEL et al., 2007). Dessa

forma, alguns estudos relacionam o alelo G do polimorfismo com maiores chances de hipertensão arterial em chineses, e dois estudos realizados na China mostraram tais resultados (ONG et al., 2010; JIANG et al., 2014). Além de uma meta-análise sugerir que o genótipo GG especificamente pode aumentar os valores da pressão arterial em até 43% (FAN et al., 2017).

No presente estudo, foi encontrado a associação apenas para o genótipo CG, que por sua vez porta um dos alelos de risco que é o alelo G. Porém ainda, especificamente o genótipo CG esteve associado com a pré-eclâmpsia (MACHADO et al., 2014). Além disso, o grupo de heterozigotos também associou-se com DAC na população geral, em europeus e asiáticos (ZHOU et al., 2012; KANU et al., 2018).

Outra associação importante observada para os indivíduos heterozigotos do rs266729 foi em relação a capacidade antioxidante total ($p=0,014$), onde os portadores do genótipo CG tiveram a menor capacidade antioxidante total comparado aos outros dois genótipos homozigotos GG e CC.

A adiponectina com suas atividades de atenuação de estresse oxidativo e inflamação, reduz o estresse oxidativo induzido por glicose e apoptose além de desempenhar proteção de células cardíacas (XING et al., 2012). A hipertensão arterial é associada com a capacidade antioxidante total de maneira inversamente proporcional, quanto menor a capacidade antioxidante total maior o risco de hipertensão arterial (VILLAVERDE et al., 2019). No presente trabalho pode-se demonstrar que justamente os indivíduos com o genótipo CG são mais propensos a hipertensão arterial e de terem menores níveis da variável capacidade antioxidante total.

A literatura carece de resultados do polimorfismo rs266729 com estresse oxidativo e principalmente com a capacidade antioxidante total, no entanto Prior e colaboradores (2009) demonstraram que o genótipo GG do SNP se associou com um aumento na capacidade antioxidante total, fato que curiosamente também aconteceu na pesquisa aqui realizada.

Ainda sobre o polimorfismo da adiponectina, o genótipo GG relacionou-se significativamente com a hemoglobina glicada ($p=0,027$), tendo o genótipo GG os maiores níveis da variável comparado a CC e CG. A relação especificamente da hemoglobina glicada e o polimorfismo rs266729 ainda não foi demonstrada com clareza na literatura. Porém, pesquisas recentes demonstraram que GG aumenta

o risco de DM2 em egípcios e iranianos (ALY et al., 2020; ALIMI et al., 2021). O mesmo genótipo indica uma suscetibilidade a DM2 cerca de três vezes mais se comparado a CC e duas vezes mais comparado ao CG. (KAFTAN; HUSSAIN et al., 2015).

Além disso, o alelo G relaciona-se com variáveis glicêmicas importantes, como: níveis mais baixos de adiponectina circulante, maiores níveis de insulina e de HOMA-IR (índice de avaliação de resistência à insulina) além de um risco aumentado de hiperglicemia em obesos (DE LUIS et al., 2020).

Na amostra correspondente, quando realizada a análise do polimorfismo rs7539542 do *ADIPOR1* sozinho e a análise simultânea do rs7539542+rs266729 não foram observadas associações significativas para nenhum dos parâmetros estudados. Em relação ao rs7539542 do receptor de adiponectina 1 alguns estudos também não mostraram associações em análises semelhantes a presente e/ou em população diabética (RIZK et al., 2011; KIM et al., 2009; DAMCOTT et al., 2005). Em relação a análise simultânea dos dois polimorfismos é algo inédito que pode ser melhor explorado em estudos maiores, já que na presente pesquisa os grupos comparativos ficaram com o número experimental pequeno.

Porém, ainda é válido continuar a investigação dos polimorfismos rs266729 e rs7539542, já que são polimorfismos que modificam a expressão gênica da adiponectina e seu receptor respectivamente (ZHANG et al., 2009; KAKLAMANI et al., 2008) e são de grande importância principalmente para distúrbios metabólicos como obesidade e diabetes (SMETNEC et al., 2019; DE LUIS et al., 2020).

7 CONCLUSÕES

- Pacientes diabéticos tipo 2 portadores de genótipo CG do rs266729 podem ser mais propícios ao desenvolvimento de hipertensão arterial e de terem menor capacidade antioxidante total, enquanto que o genótipo GG do polimorfismo tem potencial relação com maior hemoglobina glicada;
- O polimorfismo rs7539542 e a associação simultânea do rs7539542+rs266729 parecem não influenciar nos parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo na amostra estudada;
- Com os resultados do presente estudo, informações importantes são adicionadas no contexto da etiologia genética da DM2, assim como um melhor entendimento da fisiologia da adiponectina e de seu receptor;
- Estudos maiores e mais robustos são necessários, para a elucidação dos polimorfismos rs266729 e rs7539542 em parâmetros clínicos, bioquímicos, antropométricos e do estresse oxidativo em diferentes populações de diabéticos.

8 REFERÊNCIAS

ALIMI, Mahrokh; GOODARZI, Mohammad Taghi; NEKOEI, Mehdi. Association of ADIPOQ rs266729 and rs1501299 gene polymorphisms and circulating adiponectin level with the risk of type 2 diabetes in a population of Iran: a case-control study. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, p. 1-7, 2021.

ALY, Omnia et al. Gene polymorphisms of Patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3), adiponectin, leptin in diabetic obese patients. **PloS one**, v. 15, n. 6, p. e0234465, 2020.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, ADA. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**. Jan 2020;43(Suppl 1) S1-S2.

AVERY, P. J. et al. Common variation in the adiponectin gene has an effect on systolic blood pressure. **Journal of human hypertension**, v. 25, n. 12, p. 719-724, 2011.

BANDEIRA, Francisco. **Protocolos clínicos em endocrinologia e diabetes**. 4^o ed. Guanabara Koogan, 2021.

BAI, Yu; TANG, Lei; LI, Ling. The roles of ADIPOQ rs266729 and MTNR1B rs10830963 polymorphisms in patients with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. **Gene**, v. 730, p. 144302, 2020.

BEAGLEY, Jessica et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. **Diabetes research and clinical practice**, v. 103, n. 2, p. 150-160, 2014.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CIVITARESE, A. E. et al. Adiponectin receptors gene expression and insulin

sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 5, p. 816-820, 2004.

COLE, Joanne B.; FLOREZ, Jose C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature reviews nephrology**, v. 16, n. 7, p. 377-390, 2020.

CHRISTODOULOU, Andria et al. Variants in ADIPOQ gene are linked to adiponectin levels and lung function in young males independent of obesity. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0225662, 2020.

DAMCOTT, Coleen M. et al. Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2245-2250, 2005.

DE LUIS, D. A. et al. Relation of a variant in adiponectin gene (rs266729) with metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2 in adult obese subjects. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 20, p. 10646-10652, 2020.

FAN, Weina et al. Associations between polymorphisms of the ADIPOQ gene and hypertension risk: a systematic and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

FOUCAN, Lydia et al. Adiponectin gene variants, adiponectin isoforms and cardiometabolic risk in type 2 diabetic patients. **Journal of diabetes investigation**, v. 5, n. 2, p. 192-198, 2014.

HANLEY, Anthony JG et al. Adiponectin and the incidence of type 2 diabetes in Hispanics and African Americans: the IRAS Family Study. **Diabetes care**, v. 34, n. 10, p. 2231-2236, 2011.

HOLLAND, William L. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 55-

63, 2011.

HUNG, Yi-Chih et al. Association of adiponectin genotypes with colorectal cancer susceptibility in Taiwan. **Anticancer research**, v. 40, n. 3, p. 1297-1306, 2020.

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

IDF, **INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION**, 2020. Disponível em: <https://idf.org/aboutdiabetes/complications.html>

JIANG, Bo et al. Association of four insulin resistance genes with type 2 diabetes mellitus and hypertension in the Chinese Han population. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 2, p. 925-933, 2014.

JIN, Zening et al. Identification of susceptibility variants in ADIPOR1 gene associated with type 2 diabetes, coronary artery disease and the comorbidity of type 2 diabetes and coronary artery disease. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100339, 2014.

KAFTAN, Ahmed Naseer; HUSSAIN, Majid Kadhum. Association of adiponectin gene polymorphism rs266729 with type two diabetes mellitus in Iraqi population. A pilot study. **Gene**, v. 570, n. 1, p. 95-99, 2015.

KAKLAMANI, Virginia G. et al. Variants of the adiponectin and adiponectin receptor 1 genes and breast cancer risk. **Cancer Research**, v. 68, n. 9, p. 3178-3184, 2008.

KAKLAMANI, Virginia et al. Polymorphisms of ADIPOQ and ADIPOR1 and prostate cancer risk. **Metabolism**, v. 60, n. 9, p. 1234-1243, 2011.

KANU, Joseph Sam et al. Associations between three common single nucleotide polymorphisms (rs266729, rs2241766, and rs1501299) of ADIPOQ and

cardiovascular disease: a meta-analysis. **Lipids in health and disease**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018.

KASUGA, Yoshifumi et al. Clinical and genetic characteristics of abnormal glucose tolerance in Japanese women in the first year after gestational diabetes mellitus. **Journal of diabetes investigation**, v. 10, n. 3, p. 817-826, 2019.

KIM, Jin Taek et al. Polymorphisms of ADIPOR1 and ADIPOR2 are associated with phenotypes of type 2 diabetes in Koreans. **Clinical endocrinology**, v. 70, n. 1, p. 66-74, 2009.

KIM, Yaeni et al. The adiponectin receptor agonist AdipoRon ameliorates diabetic nephropathy in a model of type 2 diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 4, p. 1108-1127, 2018.

LI, Haobo et al. Hyperglycemia abrogates ischemic postconditioning cardioprotection by impairing AdipoR1/Caveolin-3/STAT3 signaling in diabetic rats. **Diabetes**, v. 65, n. 4, p. 942-955, 2016.

LI, Hong et al. Adiponectin receptor 1 and small ubiquitin-like modifier 4 polymorphisms are associated with risk of coronary artery disease without diabetes. **Journal of geriatric cardiology: JGC**, v. 13, n. 9, p. 776, 2016.

LI, Shanshan et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 302, n. 2, p. 179-188, 2009.

MACHADO, J. S. R. et al. Polymorphisms of the adiponectin gene in gestational hypertension and pre-eclampsia. **Journal of human hypertension**, v. 28, n. 2, p. 128-132, 2014.

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

MATHER, K. J. et al. Common variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ)

and its receptors (ADIPOR1/2), adiponectin concentrations, and diabetes incidence in the Diabetes Prevention Program. **Diabetic medicine**, v. 29, n. 12, p. 1579-1588, 2012.

MOHAMED, Amal Ahmed et al. Single nucleotide polymorphism in adiponectin gene and risk of pancreatic adenocarcinoma. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 20, n. 1, p. 139, 2019.

MENTE, Andrew et al. Causal relationship between adiponectin and metabolic traits: a Mendelian randomization study in a multiethnic population. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66808, 2013.

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

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2019.

OHKAWA H., OHISHI N., YAGI K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**. 95(2):351-8,1979.

ONG, Kwok Leung et al. Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese. **European journal of endocrinology**, v. 163, n. 2, p. 251, 2010.

PATEL, Sheila et al. Variation in the ADIPOQ gene promoter is associated with carotid intima media thickness independent of plasma adiponectin levels in healthy subjects. **European heart journal**, v. 29, n. 3, p. 386-393, 2008.

PETERS, Kirsten E. et al. A comprehensive investigation of variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/R2), and their association with serum adiponectin, type 2 diabetes, insulin resistance and the

metabolic syndrome. **BMC Medical Genetics**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2013.

PRIOR, Sarah L. et al. Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. **European heart journal**, v. 30, n. 10, p. 1263-1269, 2009.

QI, Lu et al. Variations in adiponectin receptor genes and susceptibility to type 2 diabetes in women: A tagging–single nucleotide polymorphism haplotype analysis. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1586-1591, 2007.

RICHARDSON, D. K. et al. Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans. **Diabetologia**, v. 49, n. 10, p. 2317-2328, 2006.

RIZK, Nasser Mostafa et al. Polymorphism of Adiponectin Receptor Gene Type 1 (ADIPOR1) in Diabetic Patients Presenting with Coronary Artery Disease. 2011.

ROBLES, Mayra Judith Garcia et al. ADIPQ gene polymorphism rs266729 (-11377 C> G) and metabolic syndrome risk in a Mexican population of western Mexico. **Nutricion Hospitalaria**, 2020.

SBD, **SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES**. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. 2019.

SIITONEN, N. et al. Association of sequence variations in the gene encoding adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) with body size and insulin levels. The Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetologia**, v. 49, n. 8, p. 1795-1805, 2006.

SMETNEV, Stepan et al. Associations of SNPs of the ADIPOQ Gene with Serum Adiponectin Levels, Unstable Angina, and Coronary Artery Disease. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 537, 2019.

SOCCIO, Teresa et al. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1

(ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2763-2770, 2006.

SOEBIJANTO, Nanang; WASPADJI, Sarwono. Adiponectin levels and its role in insulin resistance among adult women with metabolic syndrome. **Acta Med Indones-Indones J Intern Med**, v. 30, n. 40, p. 41-50, 2010.

SUN, Panpan et al. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 47, 2017.

VILLAVERDE, Paola et al. High dietary total antioxidant capacity is associated with a reduced risk of hypertension in French women. **Nutrition journal**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

VIONNET, Nathalie 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. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1470-1480, 2000.

WANG, Zhiyuan et al. Effects of ADIPOQ polymorphisms on individual susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. **Adipocyte**, v. 8, n. 1, p. 137-143, 2019.

WONG, Wing Tak et al. Adiponectin is required for PPAR γ -mediated improvement of endothelial function in diabetic mice. **Cell metabolism**, v. 14, n. 1, p. 104-115, 2011.

XING, L. I.; LI, Mei-Rong; GUO, Zhi-Xin. Effects of adiponectin on oxidative stress and apoptosis in human cardiac myocytes cultured with high glucose. **Chinese medical journal**, v. 125, n. 23, p. 4209-4213, 2012.

YAMAUCHI, Toshimasa et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762-769, 2003.

YANG, Shu et al. Tectorigenin attenuates diabetic nephropathy by improving vascular endothelium dysfunction through activating AdipoR1/2 pathway. **Pharmacological research**, v. 153, p. 104678, 2020.

YE, Jiaxiang et al. Three ADIPOR1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0127253, 2015.

YEH, E. et al. Association of polymorphisms at the ADIPOR1 regulatory region with type 2 diabetes and body mass index in a Brazilian population with European or African ancestry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 468-472, 2008.

ZADJALI, F. et al. Association of adiponectin promoter variants with traits and clusters of metabolic syndrome in Arabs: family-based study. **Gene**, v. 527, n. 2, p. 663-669, 2013.

ZHA, Dongqing et al. Adiponectin and Its Receptors in Diabetic Kidney Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Potential. **Endocrinology**. v. 158, n.7, p. 2022-34, 2017.

ZHANG, Dongying et al. 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. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 23, n. 4, p. 265-272, 2009.

ZHOU, Liang et al. Association between adiponectin gene polymorphisms and coronary artery disease across different populations. **Thrombosis research**, v. 130, n. 1, p. 52-57, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vocês estão convidados a participar de uma pesquisa que recebe o título: **Análise dos diabéticos usuários do SUS atendidos em serviço de referência de João Pessoa** que visa avaliar alguns fatores genéticos, que são aqueles que herdamos dos nossos pais, possivelmente envolvidos com complicações do diabetes. Caso a relação se confirme, novas estratégias de diagnóstico antecipado das lesões e até de prevenção poderão ser considerados.

Para participar do estudo será necessário responder algumas questões sobre o que você sente e seus eventuais problemas de saúde, informações que você tem a respeito de diabetes e as atividades físicas que realiza. Esta entrevista demorará entre 10 e 15 minutos. Você irá também realizar uma coleta de sangue. Será utilizada uma seringa descartável e agulha para coletar uma quantidade de sangue que equivale a duas colheres de sopa. Este procedimento pode causar um desconforto local e formação de hematomas que desaparecem em poucos dias. Trata-se de um procedimento rotineiro nos postos de coleta dos laboratórios de análises clínicas. Uma amostra de sangue será encaminhada para um laboratório localizado na UFPB onde serão realizadas análises relacionadas à possibilidade de complicações no diabetes: hemoglobina glicosilada, creatinina.

A hemoglobina glicosilada é uma proteína que circula no sangue e a sua medida indica o quanto ela reagiu com glicose, permitindo estimar a quantidade de glicose média no sangue num período de 2 a 3 meses. A creatinina é um composto que é produzido nos músculos e seu aumento no sangue pode indicar comprometimento renal, já que sua eliminação acontece através deste órgão. Para complementar a investigação do comprometimento renal também será solicitada amostra de urina coletada no período de 24 horas. Realizará também exame nos olhos por médico oftalmologista. Outra amostra de sangue será utilizada para avaliar a capacidade antioxidante da amostra. Esta análise permite avaliar se existem substâncias protetoras suficientes no seu sangue capazes de neutralizar produtos resultantes do metabolismo normal, denominados radicais livres, que podem ser responsáveis por complicações na diabetes.

Para se submeter ao exame de DNA você deverá permitir a coleta de células da mucosa da boca através de bochecho com uma solução contendo sacarose, que não deverá ser engolida. Esta solução deverá permanecer na boca por 1 minuto e depois depositada em recipiente próprio. O referido procedimento é indolor. Esta coleta tem por objetivo extrair

DNA, que consiste de uma parte das células onde está armazenado o material genético dos seres vivos. Nela está o código que determina as características de um indivíduo. Após, realizada a coleta de células, os pesquisadores irão isolar o DNA das amostras, e farão análises numa região do material genético relacionada ao metabolismo do ácido fólico, uma importante vitamina que o organismo precisa para estar saudável. Além disso, serão analisadas regiões que permitirão avaliar a capacidade antioxidante do seu metabolismo através da genética.

Toda a coleta de dados acontecerá preservando a sua identidade. Todos os documentos relacionados a esta pesquisa serão consultados exclusivamente pelos pesquisadores, não sendo permitido o acesso a nenhuma outra pessoa ou entidade. O material genético será mantido no Departamento de Biologia Molecular, sob guarda da coordenadora desta pesquisa, podendo futuramente ser utilizado em outros projetos de pesquisa relacionados a diabetes. Serão utilizados exclusivamente para fins científicos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa serão exclusivamente utilizados para fins científicos, e quando divulgados não citarão em nenhum momento o seu nome.

Participando ou não desta pesquisa, o tratamento ou acompanhamento no Serviço não será afetado. A opção de participar fica a seu critério, e mesmo assinando esse termo, pode retirar o consentimento a qualquer momento, bastando para isso contatar a pesquisadora principal sem a necessidade de oferecer qualquer explicação.

Caso deseje participar, poderá optar em ter ou não acesso aos resultados do exame genético. Em caso afirmativo, a pesquisadora agendará um momento oportuno após a finalização da coleta de dados para realizar a devolutiva. O benefício gerado por essa pesquisa está na geração de informações sobre os fatores de risco que levam a ocorrência de complicações microvasculares na população diabética de João Pessoa. Estas informações poderão resultar no aprimoramento das ações de prevenção e acolhimento desempenhadas pelo Sistema Único de Saúde – SUS.

Este documento visa cumprir todas as recomendações da resolução 466/12 que regulamenta a realização de pesquisas em seres humanos no Brasil.

NOME: _____ NASC. ____/____/____

ASSINATURA: _____

Caso tenha dúvidas a respeito do projeto ou seu andamento, favor contatar a pesquisadora responsável, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley

(CEP/HULW – 4º andar – Fone: (83) 3216-7964).

Email: comitedeetica@hulw.ufpb.br

Pesquisadora responsável: Darlene Camati Persuhn

Departamento de Biologia Molecular – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

darlenecp@hotmail.com

Assinatura Pesquisadora responsável

Assinatura do Pesquisador responsável pela coleta de dados



IMPRESSÃO DATILOGRÁFICA

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Pesquisa em Humanos do HULW



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos diabéticos usuários do SUS atendidos em serviço de referência de João Pessoa

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: 5

CAAE: 20108513.2.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO ESTADO DA PARAÍBA - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.335.108

Apresentação do Projeto:

A diabetes é hoje um dos maiores problemas de saúde pública. As complicações crônicas decorrentes da doença traduzem um imenso gasto da verba pública destinada à saúde. Diante disso, é fundamental a implantação de políticas de prevenção tanto da doença quanto de suas complicações. Trata-se de uma pesquisa experimental descritiva a ser desenvolvida como Dissertação de Mestrado e quatro Iniciações científicas.

População e amostra: serão incluídos pacientes diabéticos com tempo de diagnóstico entre 5 a 10 anos atendidos nos ambulatórios de endocrinologia, oftalmologia e nefrologia dos Centros de Referência Hospital Universitário Lauro Wanderley, CAISI, CAIS de Jaguaribe. Os pacientes selecionados serão convidados a participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O presente projeto será submetido pela Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos da Universidade Federal da Paraíba (Número do Parecer: 796.459; Data da Relatoria: 26/08/2014). A devolutiva dos resultados será realizada diretamente aos pacientes que assim o desejarem, assim como através de relatório para a Secretaria Municipal de Saúde e Hospital Lauro Wanderley. Categorização clínica dos pacientes: nos ambulatórios de oftalmologia (CEROF) e de nefrologia, serão incluídos pacientes com complicações microvasculares já instaladas.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br

[Assinatura]
 Dr.ª Elaine Monteiro Freire
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 HULW - EBSERH / UFPB



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



Continuação do Parecer: 1.335.108

e que já estão em acompanhamento/tratamento. No ambulatório de endocrinologia será questionada a data da última realização dos exames de retina, laboratoriais para avaliação renal e microfilamento. Caso não se disponha do resultado em prontuário ou a avaliação tenha sido realizada há mais de um ano, estas análises serão realizadas. Desta forma será possível caracterizar os pacientes com diagnóstico de 5-10 anos de diabetes que já apresentam complicações instaladas e identificadas nos ambulatórios de oftalmologia e nefrologia, os que apresentam complicações sem identificação prévia e os que não apresentam sinais de complicação. Variáveis antropométricas, sócio-demográficas serão coletadas através de instrumento adequado no qual o paciente será entrevistado para identificação da região de residência, UF de nascimento, idade, sexo, raça/cor, escolaridade, situação conjugal. As variáveis antropométricas são: peso determinado em balança, altura e circunferência da cintura que será medida por fita métrica. O índice de massa corporal será calculado dividindo-se o peso em quilogramas pela estatura em metros quadrados. A circunferência da cintura será analisada segundo pontos de corte da OMS para avaliar risco metabólico associado à adiposidade abdominal. Análise de complicações microvasculares: Retinopatia

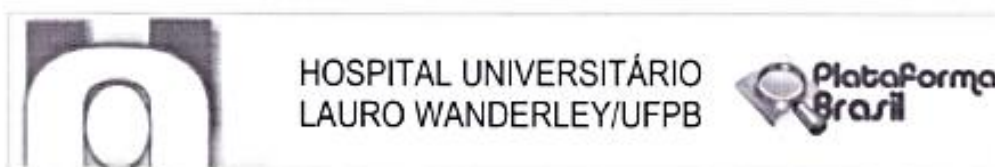
será realizada por médico oftalmologista, caso qualquer tipo de comprometimento retiniano seja evidenciado, o paciente será incluído no grupo de presença de complicação; a Nefropatia será diagnosticada por um médico especialista em nefrologia após análise do resultado de dosagem de albuminúria através da quantificação de albumina na urina em amostra aleatória (exame de triagem). A urina será coletada nos ambulatórios e

encaminhada para laboratório responsável pela análise. Neuropatia será realizada por profissional de enfermagem treinado, através da análise da perda da sensibilidade protetora, por metodologia validada pelo Ministério da Saúde, descrita no Manual de Enfermagem de responsabilidade do departamento de Enfermagem da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009). A Coleta, análise genética e extração do DNA Genômico de células de

mucosa bucal serão coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3% e a coleta de sangue será realizada para obtenção de leucócitos através de punção venosa em tubos estéreis contendo 7,2 mg de K3EDTA de acordo e seguindo a RESOLUÇÃO DA ANVISA - RDC N° 34, DE 11 DE JUNHO DE 2014, que dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. O conteúdo resultante do bochecho e da coleta sanguínea serão transferido para um tubo de 15 ml para o isolamento do DNA genômico que será feito por precipitação por isopropanol, a amplificação e genotipagem pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase seguida por digestão com enzimas (PCR-RFLP) e reação em cadeia da polimerase específica para metilação

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br

[Assinatura]
Dra. Maria do Carmo Moterle Freire
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
HULW - EBSERH / UFPB



Continuação do Parecer: 1.335.108

referência quanto aos indicadores clínicos, laboratoriais, sociodemográficos, educacionais e genéticos relacionados às complicações crônicas visando identificar pontos de acerto e de fragilidade da atenção básica e proposição de estratégias de prevenção.

Objetivo Secundário:

Caracterizar os pacientes quanto as características sociodemográficas, fatores de risco cardiovascular e presença de complicações;

Genotipar os pacientes incluídos no estudo quanto aos polimorfismos genéticos e metilação de genes envolvidos no metabolismo de grupamentos metil e também o stress oxidativo, ou outras vias de interesse ao desenvolvimento de complicações no diabetes

Analisar o estresse oxidativo dos pacientes incluídos no estudo

Analisar as associações existentes entre características sociodemográficas, fatores de risco cardiovascular, presença de complicações microvasculares, polimorfismos genéticos

Caracterizar os pacientes quanto ao conhecimento que apresentam a respeito do diabetes e a prática de atividades físicas

Fortalecer a Associação de Diabéticos de João Pessoa e analisar o impacto da frequência às reuniões sobre a consciência que o paciente apresenta acerca do autocuidado através de aplicação de questionários previamente validados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco da pesquisa está relacionado com a coleta de sangue que pode trazer desconforto local e formação de leves hematomas que desaparecem em poucos dias.

Benefícios:

Os benefícios estão relacionados à obtenção de dados acerca dos fatores de risco para desenvolvimento de complicações crônicas no diabetes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo relevante com possibilidade de contribuições para o acompanhamento clínico-laboratorial e evolução de pacientes com diabetes no município de João Pessoa, bem como fortalecer o programa ministerial de atenção ao paciente com diabetes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados adequadamente, conforme

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica@hulw.ufpb.br

[Assinatura]
 Prof.ª Maria Moura Freire
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 HULW - EBSERH/UFPB



Continuação do Parecer: 1.335.108

exigência da Resolução 466/2012, do CNS. MS.

Recomendações:

Recomenda-se que o pesquisador responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o pesquisador responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a pesquisadora atende adequadamente às recomendações inerentes à emenda e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, somos favoráveis ao desenvolvimento da investigação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo Colegiado do CEP/HULW em Reunião Ordinária realizada no dia 24 de novembro de 2015. Ressaltamos que, antes de iniciar a pesquisa, o pesquisador responsável deverá comparecer ao CEP, para receber o PARECER DE APROVAÇÃO do projeto.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

- . O participante da pesquisa deverá receber uma via do Termo de Consentimento na íntegra, com assinaturas do pesquisador responsável e do participante e/ou do responsável legal.
- . Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e apor assinatura na última folha.
- . O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer dano ou prejuízo à assistência que esteja recebendo.
- . O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- . Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
 UF: PB Município: JOAO PESSOA
 Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica@uflpb.edu.br

[Assinatura]
 Dr. Alexandre Moreira Freire
 Coordenador
 de Ética em Pesquisa
 CEP-HULW/UFPB