



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

**CAROLINE SEVERO DE ASSIS**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES DO *RECEPTOR DE VITAMINA D*,  
*ADIPONECTINA E RECEPTOR 1 DE ADIPONECTINA* NA RETINOPATIA  
DIABÉTICA**

**João Pessoa**

**2023**

CAROLINE SEVERO DE ASSIS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES DO *RECEPTOR DE VITAMINA D*,  
*ADIPONECTINA E RECEPTOR 1 DE ADIPONECTINA* NA RETINOPATIA  
DIABÉTICA**

**João Pessoa**

**2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A848a Assis, Caroline Severo de.

Análise de polimorfismos nos genes do receptor de vitamina D, adiponectina e receptor 1 de adiponectina na retinopatia diabética / Caroline Severo de Assis. - João Pessoa, 2023.

134 f. : il.

Orientação: Darlene Camati Persuhn.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes Mellitus - Amputação. 2. Retinopatia diabética. 3. Adiponectina. 4. Polimorfismo genético. 5. Vitamina D - Receptores. 6. Alimentação habitual - Consumo. I. Persuhn, Darlene Camati. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

CAROLINE SEVERO DE ASSIS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES DO *RECEPTOR DE VITAMINA D*,  
*ADIPONECTINA E RECEPTOR 1 DE ADIPONECTINA* NA RETINOPATIA  
DIABÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de doutor(a) em Ciências da Nutrição.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Darlene Camati Persuhn

**João Pessoa**

**2023**

CAROLINE SEVERO DE ASSIS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES DO RECEPTOR DE VITAMINA D,  
ADIPONECTINA E RECEPTOR 1 DE ADIPONECTINA NA RETINOPATIA  
DIABÉTICA**

**Defesa em 07/02/2023**



---

**Profª. Drª. Darlene Camati Persuhn**

Orientadora e Presidente da Banca examinadora (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição - Universidade Federal da Paraíba)



---

**Prof. Dr. Vinícius José Baccin Martins**

Examinador interno (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição Universidade Federal da Paraíba)



---

**Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva**

Examinador interno (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba)



---

**Profª. Drª. Fabiane Gomes de Moraes Rego**

Examinadora Externa (à instituição) (UFPR/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas)



---

**Dr. Fabyan Esberard de Lima Beltrão**

Examinador Externo (à instituição) (HULW/ Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba)

---

**Profª. Drª. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves**

Examinadora interna suplente (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição Universidade Federal da Paraíba)

---

**Drª. Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro**

Examinadora Externa (à instituição) suplente (Faculdade Três Marias (FTM); Escola de Ensino Superior do Agreste Paraibano (EESAP)).

Dedico esta produção a **Deus**, à **virgem Maria e a minha família**,  
pelo dom da vida e por permitirem que meu sonho se tornasse real.  
A eles toda honra e glória!

## AGRADECIMENTOS

Assim como a Mãe do meu Senhor, rendo toda minha gratidão a Ele: “A Minha alma glorifica ao Senhor, meu espírito exulta de alegria em Deus, meu Salvador, porque olhou para sua pobre serva (...) porque realizou em mim maravilhas. Aquele que é poderoso e cujo nome é Santo.” Obrigada meu Senhor, por teu infinito amor e misericórdia! Os sonhos de Deus são muito maiores que os meus. Cá estou, a realizar mais um.

Aos que nunca mediram esforços para me verem feliz, realizada e vitoriosa. Sem dúvida alguma, grande parte do que sou devo a vocês, minha família tão amada. Obrigada a minha mãe Sileide Severo, ao meu Pai Francisco de Assis e a minha Tia Teresa Maria, por me ajudarem em todos os momentos da vida, por não se negarem a muitas vezes abdicar de algo para vocês em meu benefício! As minhas irmãs Aline e Andréia Severo, ao meu cunhado Roberto Gonçalves e a minha afilhada Alice Severo, a princesa de nossas vidas, por terem me ajudado de tantas formas, sempre com boa vontade e com tanto amor! Agradeço a minha família como um todo, por perdoarem minhas ausências durante esse tempo de dedicação ao Doutorado. Os frutos nós iremos colher juntos a partir de agora! (Tias Gorete, Marline, Marli e Eliane, meus avós Ferreira e Aidil Monteiro (*in memoriam*) e as minha primas Kelly Aidil e Fernanda Gonçalves). Ao meu noivo Steven Allyson, pela companhia, paciência e apoio que sempre teve para comigo. Sua presença sempre tornou tudo mais leve e feliz! Amo vocês!

Obrigada aos meus colegas, por compartilharem dessa caminhada nada fácil, que vibraram e sofreram comigo a cada passo (Tainá Diniz, Mussara Gomes, Rúbia Cartaxo, Beatriz Fernandes, Marina Coelho, Raquel Brito, Vanessa Polyana, Bruno Virginio e Myllene Barros), obrigada por todo apoio e incentivo.

A Profa. Darlene Camati, pela orientação e competência. Obrigada pelos ensinamentos ao longo desses seis anos entre mestrado e doutorado, e por acreditar que ainda é possível executar ciência de qualidade em meio a tantos percalços. Obrigada ainda por todas as vezes que me impulsionou a corrigir meus erros e construir algo melhor. Você é honesta e ética, esses dois ensinamentos, em especial, levarei comigo.

Aos membros da banca examinadora, professores Alexandre Sérgio Silva, Vinícius José Baccin Martins, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Fabyan Esberard de Lima Beltrão, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves e Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar para a finalização desta tese.

Agradeço ao Programa Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, aos seus funcionários (na pessoa do senhor Carlos), a todos os docentes,

coordenador e vice coordenador, por contribuírem com os insumos e ensinamentos necessários para a formação excelente de Doutor(a) em ciências da nutrição.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas da Natureza (UFPB), em especial ao Senhor Bosco e a Dona Geralda, que tão gentilmente dividiram comigo horas a fio pelos corredores do laboratório, ajudando em tudo que fosse possível.

Gratidão ao Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, por viabilizar o campo de coleta e a infraestrutura necessária, e a todos os participantes do estudo por permitirem a coleta de dados, mesmo em meio a uma pandemia. Não há palavras que possam descrever a gratidão que tenho a cada um dos nossos pacientes, aos muitos “José e Marias”, que deram vida ao nosso projeto! Que o Senhor os guarde e cuide, sempre!

Agradeço ainda às instituições, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil) pelo aporte financeiro através do Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) Grant 05/2021 e à PROPESQ/PRPG/UFPB pelo aporte através do edital Produtividade em Pesquisa 03/2020 grant n. PIA13262-2020 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil).

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste projeto. Muito obrigada!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma  
humana”.

Carl Jung

## RESUMO

A Retinopatia Diabética é uma complicação microvascular do *Diabetes Mellitus* e é uma das principais causas de cegueira na população em idade ativa. A Retinopatia está intimamente relacionada ao controle de metas glicêmicas, ao tempo de duração do diabetes e a outros aspectos clínicos e genéticos complexos e ainda não compreendidos em sua totalidade. A vitamina D, a adipocina Adiponectina e suas respectivas variantes genéticas, a saber, *VDR*, *ADIPOQ* e *ADIPOR1*, apresentam papéis importantes no contexto de *Diabetes Mellitus* tipo 2 e suas complicações e por esse motivo são alvo de interesse e estudo. O objetivo deste trabalho foi analisar a associação entre os genótipos dos polimorfismos localizados nos genes *VDR* (rs1544410), Adiponectina (rs266729) e receptor 1 da adiponectina (rs7539542) e Retinopatia Diabética com os estágios clínicos da doença, aspectos clínicos, bioquímicos, antropométricos, de atividade física e de consumo alimentar. Pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2, com no mínimo 5 anos de diagnóstico foram recrutados e submetidos à exame da retina para classificação clínica (com ou sem retinopatia e o estágio da doença) gerando os seguintes grupos experimentais: sem retinopatia (n= 139), com retinopatia (n=221) estando o segundo grupo subdividido em Retinopatia não proliferativa (RDNP) n= 144 e Retinopatia proliferativa (RDP) n=77. Parâmetros bioquímicos (glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total, HDL colesterol, triglicérides, creatinina), dados antropométricos, de consumo alimentar e atividade física foram coletados e análises moleculares foram realizadas para determinação dos genótipos dos polimorfismos de interesse. A distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos estudados não diferiu entre os grupos sem retinopatia comparado a com retinopatia, RDNP e RDP para todos os genes. Contudo, a presença do alelo b do rs1544410 (Bb+bb) do gene *VDR* foi associado a maiores níveis de glicemia de jejum (p=0,04) e uso de insulinoterapia (p=0,01) no grupo de pacientes com retinopatia sugerindo ser indicativo de um controle glicêmico menos efetivo do que em portadores do genótipo BB. Com relação a adiponectina, a presença do alelo G do polimorfismo rs266729 foi um fator de risco para amputação de membros (p=0,009), e o genótipo CC para o polimorfismo rs7539542 do receptor 1 de adiponectina foi um fator de proteção contra a amputação (p=0,045). Os resultados desse trabalho permitem sugerir que os genótipos dos polimorfismos rs1544410, rs266729 e rs7539542 nos genes do receptor de Vitamina D, adiponectina e Receptor 1 de adiponectina influenciam o controle da glicemia e ocorrência de amputação em uma população no Nordeste do Brasil.

**Palavras-chave:** Amputação. Adiponectina. Polimorfismo Genético. Consumo alimentar habitual. Receptores de Vitamina D. Retinopatia diabética.

## ABSTRACT

Diabetic Retinopathy is a microvascular complication of Diabetes Mellitus and is one of the main causes of blindness in the working-age population. Retinopathy is closely related to the control of glycemic targets, the duration of diabetes and other complex clinical and genetic aspects that are still not fully understood. Vitamin D, the adipokine Adiponectin and their respective genetic variants, namely VDR, ADIPOQ and ADIPOR1, play important roles in the context of Type 2 Diabetes Mellitus and its complications and, for this reason, are the subject of interest and study. The objective of this work was to analyze the association between the genotypes of the polymorphisms located in the VDR (rs1544410), Adiponectin (rs266729) and adiponectin receptor 1 (rs7539542) genes and Diabetic Retinopathy with the clinical stages of the disease, clinical, biochemical, anthropometric, physical activity and food consumption. Patients with type 2 Diabetes Mellitus, with at least 5 years of diagnosis were recruited and submitted to retinal examination for clinical classification (with or without retinopathy and disease stage) generating the following experimental groups: without retinopathy (n= 139), with retinopathy (n=221) the second group being subdivided into non-proliferative retinopathy (RDNP) n=144 and proliferative retinopathy (RDP) n=77. Biochemical parameters (blood glucose, glycated hemoglobin, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine), anthropometric data, food intake and physical activity were collected and molecular analyzes were performed to determine the genotypes of the polymorphisms of interest. The genotypic and allelic distribution of the polymorphisms studied did not differ between groups without retinopathy compared to those with retinopathy, RDNP and RDP for all genes. However, the presence of the b allele of rs1544410 (Bb+bb) of the VDR gene was associated with higher levels of fasting glucose (p=0.04) and use of insulin therapy (p=0.01) in the group of patients with retinopathy suggesting that it is indicative of a less effective glycemic control than in carriers of the BB genotype. With regard to adiponectin, the presence of the G allele of the rs266729 polymorphism was a risk factor for limb amputation (p=0.009), and the CC genotype for the rs7539542 polymorphism of the adiponectin receptor 1 was a protective factor against amputation (p=0.045). The results of this work suggest that the genotypes of the polymorphisms rs1544410, rs266729 and rs7539542 in the genes of the Vitamin D receptor, adiponectin and Adiponectin Receptor 1 influence glycemic control and the occurrence of amputation in a population in Northeast Brazil.

**Keywords:** Amputation. Adiponectin. Genetic Polymorphism. Habitual food consumption. Vitamin D Receptors. Diabetic Retinopathy

## LISTA DE TABELAS DA TESE

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Parâmetros para análises dos Polimorfismos dos genes <i>VDR</i> , <i>ADIPOQ</i> e <i>ADIPOR1</i> ..... | 52 |
| <b>Tabela 2-</b> Classificação do Índice de massa corporal e Circunferência Abdominal.....                              | 54 |

## LISTA DE QUADROS DA TESE

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1-</b> Indicação para rastreio de DM2 em indivíduos assintomáticos..... | 21 |
| <b>Quadro 2-</b> Descrição dos estágios da RD.....                                | 24 |

## LISTA DE FIGURAS DA TESE

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1-</b>  | Fisiopatologia da <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2.....   | 20 |
| <b>Figura 2-</b>  | Características da Retinopatia Diabética.....  | 22 |
| <b>Figura 3-</b>  | Estágios da Retinopatia Diabética.....   | 24 |
| <b>Figura 4-</b>  | Fisiopatologia da Retinopatia Diabética.....   | 28 |
| <b>Figura 5-</b>  | Mecanismos subjacentes ao efeito da hiperglicemia.....   | 33 |
| <b>Figura 6-</b>  | Representação da biossíntese e metabolismo da vitamina D.....  | 38 |
| <b>Figura 7-</b>  | Estrutura do gene <i>VDR</i> e localização do rs1544410.....   | 41 |
| <b>Figura 8-</b>  | Funções da adiponectina.....   | 43 |
| <b>Figura 9-</b>  | Estrutura do gene <i>ADIPOQ</i> e localização do rs266729.....   | 44 |
| <b>Figura 10-</b> | Estrutura do gene <i>ADIPOR1</i> e localização do rs7539542.....   | 46 |
| <b>Figura 11-</b> | Desenho do estudo.....   | 51 |
| <b>Figura 12-</b> | Eletroforeses demonstrativas dos perfis adotados para obtenção dos genótipos de <i>VDR</i> BsmI (rs1444410), <i>ADIPOQ</i> (rs266729) e <i>ADIPOR1</i> (rs7539542) ..... | 53 |

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>16</b>  |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>  | <b>18</b>  |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>  | <b>19</b>  |
| 3.1 <i>DIABETES MELLITUS</i> .....   | 19         |
| 3.2. RETINOPATIA DIABÉTICA (RD).....   | 22         |
| 3.2.1 FATORES DE RISCO PARA RD.....  | 25         |
| 3.3 FISIOPATOLOGIA.....  | 27         |
| 3.3.1 MECANISMOS SUBJACENTES AO EFEITO DA HIPERGLICEMIA.....   | 29         |
| 3.4 <b>Consumo Alimentar e Retinopatia Diabética</b> .....   | 34         |
| 3.5 VITAMINA D.....  | 36         |
| 3.5.1 <b>O gene receptor da vitamina D (VDR) e o polimorfismo rs1544410</b> .....                                    | 38         |
| 3.6 ADIPONECTINA.....  | 41         |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>48</b>  |
| 4.1 DESENHO DO ESTUDO.....   | 48         |
| 4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....   | 48         |
| 4.2.1 <b>Avaliação de Riscos e Benefícios</b> .....  | 48         |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....  | 49         |
| 4.4 ANÁLISE DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS.....  | 50         |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS.....  | 51         |
| 4.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E DO CONSUMO ALIMENTAR...  | 53         |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 55         |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>56</b>  |
| <b>APÊNDICE A – Artigo 1.....</b>  | <b>80</b>  |
| <b>APÊNDICE B – Artigo 2.....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>APÊNDICE C – TCLE .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>APÊNDICE D – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS<br/>SOCIODEMOGRÁFICOS.....</b>                                      | <b>112</b> |
| <b>APÊNDICE E - Estudos com Vitamina D e com polimorfismos em VDR no contexto<br/>de Diabetes e Retinopatia.....</b> | <b>114</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>APÊNDICE F - Estudos com adiponectina e suas variantes <i>ADIPOQ</i> e <i>ADIPOR1</i> no contexto Diabetes e Retinopatia.....</b> | <b>126</b> |
| <b>ANEXO A – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO ÉTICA.....</b>  | <b>133</b> |
| <b>ANEXO B – RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24h.....</b>  | <b>134</b> |
| <b>ANEXO C- QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA.....</b>  | <b>135</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os dados da Organização mundial de saúde relatam que o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) tornou-se uma patologia metabólica de crescimento exponencial e exerce grande impacto na saúde dos indivíduos, sendo uma das maiores causas de morte e hospitalização, gerando significativos custos aos órgãos de saúde pública (WHO, 2021). Existe um entusiasmo científico sobre a identificação de marcadores de estágio precoce para a DM2 e suas complicações, que por apresentarem natureza multifatorial pressupõe uma variedade de processos fisiopatológicos envolvidos (OGURTSOVA *et al.*, 2017).

Além dos já reconhecidos fatores de riscos clínicos, que englobam a presença de sobrepeso/obesidade, sedentarismo, histórico familiar de *Diabetes Mellitus* (DM), hipertensão arterial, dislipidemias, histórico de DM gestacional, tabagismo e etilismo (BRASIL 2013; BRASIL 2017; MARTIN, 2017; IDF, 2019; KOLB), mecanismos moleculares também têm sido explorados, sendo identificadas alterações genéticas e epigenéticas associadas à ocorrência de DM e suas complicações (ZHENG *et al.*, 2017; EZHILARASI; DHAMODHARAN; VIJAY, 2018; SANTANA BEZERRA *et al.*, 2019). A identificação destes fatores além de auxiliar na escolha do tratamento, pode predizer o risco de futuras complicações, a exemplo da Retinopatia Diabética (RD), constituindo um passo para um acompanhamento personalizado (SHEPHERD *et al.*, 2016; AGUIAR; DUARTE; CARVALHO, 2019).

Nesse sentido, esforços vêm sendo empregados para identificar genes com padrões diferenciais de metilação (AGARDH *et al.*, 2015) e polimorfismos (LIEW; GUPTA, 2015; ZHONG *et al.*, 2015; LUO; GAO; QIN, 2017), entre pacientes diabéticos e portadores de RD, constatando-se padrões típicos de ocorrência da complicação em grupos de pacientes com diabetes.

A vitamina D (1,25-diidroxivitamina D) tem sido citada como fator influenciador da resistência insulínica (CONTRERAS-BOLÍVAR *et al.*, 2021). Possivelmente atuando no contexto metabólico do controle glicêmico, a intervenção com Vitamina D (VD) tem demonstrado reduzir o risco de DM2 em indivíduos intolerantes à glicose (ZHANG *et al.*, 2020). Baixas concentrações plasmáticas dessa vitamina tem demonstrado influenciar na ocorrência e progressão de RD (TECILAZICH *et al.*, 2021). Para desempenhar seu papel biológico, a VD depende da interação com seu receptor celular (VDR), cujos polimorfismos genéticos têm sido estudados como fatores de risco para DM2 (AL SAFAR *et al.*, 2017), patogênese (MOTOHASHI *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2015; EZHILARASI;

DHAMODHARAN; VIJAY, 2018) e progressão de RD (BUĆAN *et al.*, 2009). Contudo, no contexto da RD as evidências são heterogêneas, não havendo consenso.

Outro marcador associado a DM2 e suas complicações é a adiponectina, que é um hormônio essencialmente secretado pelo tecido adiposo (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996), e quando em concentrações elevadas já demonstrou estar associada a condições de melhorar a sensibilidade à insulina, assim como diminuir o risco para DM2 (HOTTA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2009), no entanto o papel da adiponectina no desenvolvimento da RD é pouco explorado. Estudos prévios envolvendo o gene da adiponectina humana (*ADIPOQ*), associaram o polimorfismo *ADIPOQ* com glicose em jejum, resistência à insulina e DM2 (TSCHRITTER *et al.*, 2003; RASCHE; AL-HASANI; HERWIG, 2008; ZIEMKE; MANTZOROS, 2010; HOSSAIN; MUKHEEM; KAMARUL, 2015), mais especificamente o alelo G (rs266729) foi um fator de risco para DM2 (SUN *et al.*, 2017). Variantes genéticas nos receptores da adiponectina (*ADIPOR1/R2*) também foram associados com resistência à insulina e intolerância à glicose (WANG *et al.*, 2004; HARA K *et al.*, 2005), e níveis mais baixos de adiponectina e expressão de *ADIPOR1/R2* foram associados a uma maior incidência de DM2 (ZHA; WU; PING, 2017).

O conjunto dessas informações demonstram a importância de estudar fatores genéticos que influenciam o risco de RD e condições clínicas relacionadas a essa condição, partindo da premissa que devido à clara relação que apresentam com o risco de diabetes, genes envolvidos no metabolismo e ação metabólica de vitamina D e também a adiponectina são alvos em potencial. Diante dessas constatações os objetos de estudo deste trabalho foram 1) o diagnóstico de RD; 2) os estágios de RD; 3) parâmetros bioquímicos, antropométricos, de atividade física e nutricionais; 4) parâmetros clínicos com destaque em amputação de membros, que foi onde encontramos o resultado mais promissor do estudo com adiponectina. Essas variáveis foram analisadas à luz de genótipos e distribuição alélica de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) nos genes *VDR* (rs1544410), *ADIPOQ* (rs266729) e *ADIPOR1* (7539542).

## 2 OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Analisar a associação entre genótipos de polimorfismos localizados nos genes *VDR* (rs1544410), *ADIPOQ* (rs266729) e *ADIPOR1* (7539542) na Retinopatia Diabética, e comparar com estágios clínicos da doença, aspectos clínicos, bioquímicos, antropométricos, de atividade física e de consumo alimentar.

### **Objetivos específicos**

- Verificar dados clínicos, antropométricos, bioquímicos, atividade física e de consumo alimentar nos pacientes recrutados;
- Testar a distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos rs1544410, rs266729 e 7539542 nos grupos clínicos estudados;
- Testar a distribuição genotípica e alélica de rs1544410, rs266729 e 7539542 nos grupos clínicos sem RD, com RD e nos subtipos RDNP e RDP;
- Analisar a influência dos genótipos rs1544410, rs266729 e 7539542 nos aspectos clínicos, antropométricos e bioquímicos estudados, levando em consideração a atividade física e consumo alimentar.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *DIABETES MELLITUS*

As estimativas de prevalência global de diabetes em adultos de 20 a 79 anos padronizadas pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) no ano de 2021, indicavam haver 537 milhões de pessoas com diabetes, sendo 10,8% em homens e 10,2% em mulheres (IDF, 2021; SUN *et al.*, 2022). A doença foi causa direta de 1,5 milhões de mortes, e grande parte desse número ocorreu nos países em desenvolvimento, possivelmente devido ao crescimento populacional, envelhecimento, hábitos alimentares inadequados, obesidade e estilo de vida sedentário (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021), o que torna o DM um grave problema de saúde pública.

No Brasil, segundo dados da IDF, nos últimos dez anos houve um aumento de 26,61% no número de pacientes diabéticos e atualmente, o país ocupa a sexta posição no *ranking* mundial (SUN *et al.*, 2022). De acordo com dados do IBGE em seu último censo, João Pessoa, capital da Paraíba, contava com 800.323 habitantes (IBGE, 2018), destes, cerca de 6,8% de toda população  $\geq 18$  anos possuíam diagnóstico referido de *Diabetes Mellitus* no ano de 2019, de acordo com o VIGITEL do referido ano (BRASIL, 2020). Em uma projeção estimada, cerca de 49.199 habitantes apresentavam diagnóstico de DM na referida capital.

Entre os tipos mais frequentemente encontrados, o DM2 é a forma mais prevalente da doença. Nos estágios iniciais as células  $\beta$  secretam insulina normalmente, porém, a demanda prolongada e persistente de produção para compensar a resistência periférica pode conferir esgotamento das células  $\beta$  acarretando à uma deficiência secundária na produção e secreção do hormônio (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; WEIR; GAGLIA; BONNER-WEIR, 2020). Nesta condição, ocorre a dessensibilização dos receptores de insulina frente ao hormônio, levando a uma deficiência no organismo quanto a captação e absorção da glicose (BLAKE; TROUNCE, 2014) (Figura 1).

A fisiopatologia do DM2 não apresenta, necessariamente, indicadores específicos da doença. Em pelo menos 80 a 90% dos casos, associa-se ao excesso de peso e a outros marcadores comuns da síndrome metabólica (NEWTON; RASKIN, 2004; PINTO *et al.*, 2020). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2020), os fatores de risco consolidados para DM2 são: história familiar da doença, idade, obesidade, sedentarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou DM gestacional (DMG) e presença de componentes da síndrome metabólica (dislipidemias e hipertensão arterial). A *American Diabetes Association* (2023) (ELSAYED *et al.*, 2023), apresentou uma proposta para rastreamento de DM2, baseada em sinais, sintomas e

exames laboratoriais para confirmação diagnóstica de DM2, e afirma que mesmo em indivíduos assintomáticos a presença de fatores de risco já impõe rastreamento para diagnóstico precoce (Quadro 1).

**Figura 1** - Fisiopatologia da *Diabetes Mellitus* tipo 2

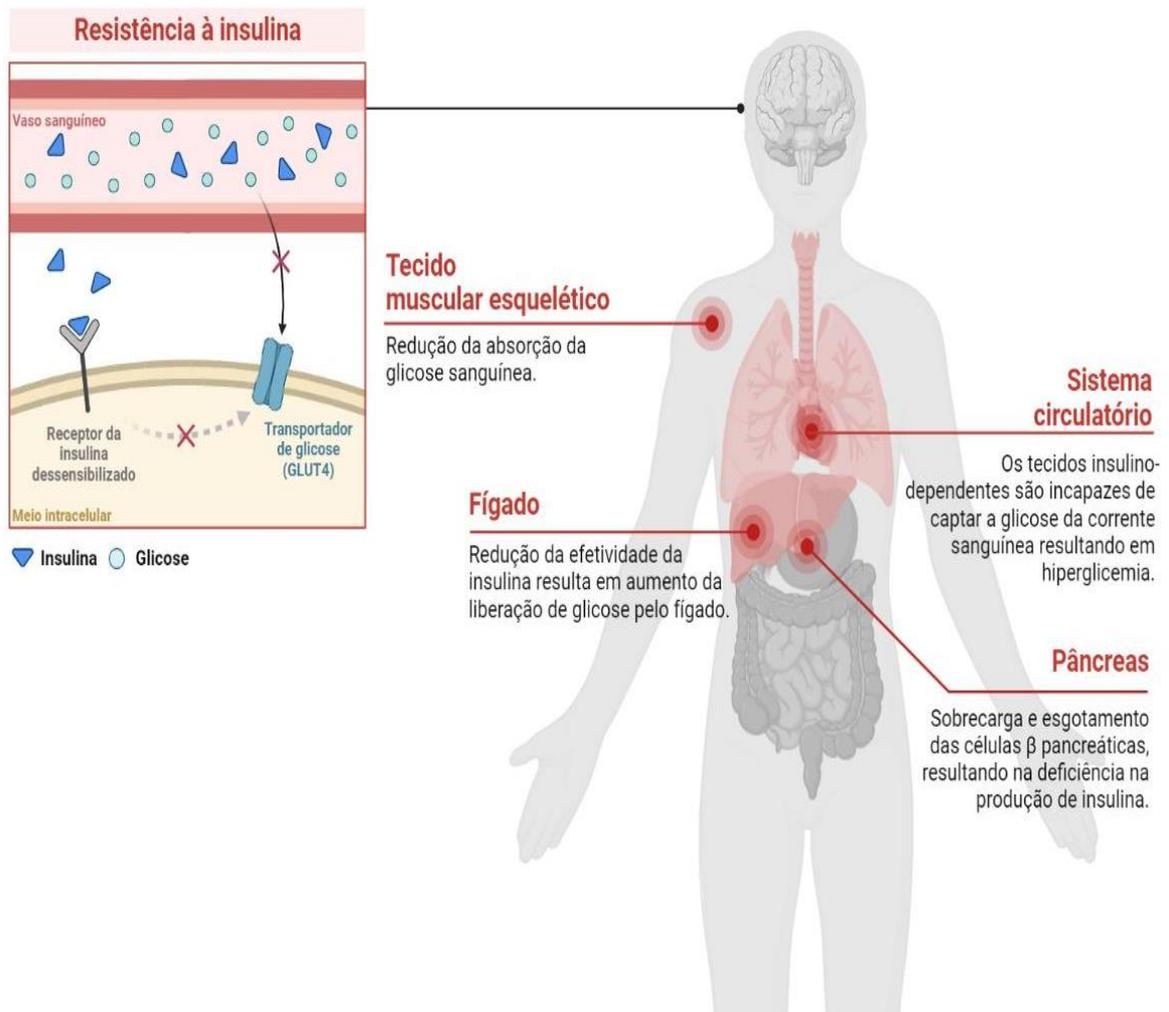


Figura 1 representando a Fisiopatologia da *Diabetes Mellitus* tipo 2 com esgotamento das células  $\beta$ , acarretando em diminuição na produção e secreção de insulina, levando a uma deficiência no organismo quanto a captação e absorção de glicose. Fonte: Elaborada pela autora, com informações de JAVEED; MATVEYENKO, 2018. Criado com (BioRender.com).

O diagnóstico da DM se dá a partir da concentração de glicose plasmática, com valores  $\geq 126\text{mg/dL}$  no jejum e/ou  $\geq 200\text{mg/dL}$  2 horas após ingestão de 75g de glicose (teste de tolerância à glicose oral/ curva glicêmica) e/ou glicemia ao acaso  $\geq 200\text{mg/dL}$  associada a sinais e sintomas inequívocos de hiperglicemia (poliúria, glicosúria e cetoacidose). Além destes, outro marcador importante é a determinação de hemoglobina glicada (HbA1c %)  $\geq 6,5$  %, que irá fornecer uma estimativa da glicemia média dos últimos 120 dias anteriores à sua medição, que

é o tempo médio vital de uma hemácia na circulação (ELSAYED *et al.*, 2019; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

**Quadro 1-** Indicação para rastreio de DM2 e pré-diabetes em indivíduos assintomáticos

| <b>Critérios para rastreio do DM2</b>  |
|--|
| <p>Sugere-se rastreamento de DM2 em indivíduos (de forma geral com 35 anos) com sobrepeso ou obesidade e que apresentem mais um fator de risco para DM dentre os seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parente de primeiro grau com diabetes;</li> <li>• Raça/etnia de alto risco para DM (afro-americano, latino, nativo americano, asiático-americano);</li> <li>• Histórico de doença cardiovascular;</li> <li>• Hipertensão arterial (<math>\geq 130/80</math> mmHg ou em terapia para hipertensão);</li> <li>• HDL-c <math>&lt; 35</math> mg/dL e/ou triglicérides <math>&gt; 250</math>mg/dL</li> <li>• Síndrome de ovários policísticos;</li> <li>• Inatividade física;</li> <li>• Obesidade grave e Acanthose <i>nigricans</i>;</li> <li>• Pré-diabetes (HbA1c <math>\geq 5,7\%</math>);</li> <li>• <i>Diabetes Mellitus</i> gestacional deve ser testada ao longo da vida pelo menos a cada 3 anos;</li> <li>• Pessoas com vírus da imunodeficiência humana (HIV).</li> </ul> |

*Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2); HDL colesterol (HDL-c); Hemoglobina Glicada (HbA1c). Fonte: Adaptado de American Diabetes Association (ELSAYED *et al.*, 2023).

As complicações crônicas do DM são decorrentes principalmente do controle inadequado dos valores bioquímicos, especialmente das metas glicêmicas, do tempo de evolução e de fatores genéticos da doença. As complicações crônicas microvasculares englobam a Nefropatia Diabética, a RD e a Neuropatia Diabética (NATHAN *et al.*, 2009; LITWAK *et al.*, 2013; DUH; SUN; STITT, 2017; TAURONE *et al.*, 2020; BUNCH *et al.*, 2022).

Se torna evidente a importância do controle glicêmico intensivo a longo prazo, desde que feito a partir dos primeiros anos da doença, com intuito retardar ou inibir o aparecimento de complicações macro e microvasculares (NATHAN *et al.*, 2009; HOLMAN; SOURIJ; CALIFF, 2014; WANG; LO, 2018; BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2018; CHATZIRALLI, 2018). Caso o controle glicêmico seja realizado apenas de forma tardia, o papel benéfico desse controle pode não ser como esperado, possivelmente relacionado a um mecanismo denominado de “memória metabólica”, com a hipótese que haja envolvimento de mecanismos epigenéticos (REDDY; ZHANG; NATARAJAN, 2015; BOLOTSKAYA *et al.*, 2017; KOWLURU 2017; SINGH *et al.*, 2020).

### 3.2 RETINOPATIA DIABÉTICA (RD)

O olho é um dos principais órgãos lesados em indivíduos com DM, sendo a RD uma das mais conhecidas complicações microvasculares relacionadas ao DM (HENRIQUES *et al.*, 2015). É uma doença neurodegenerativa que gera lesões microvasculares na retina e causa cegueira adquirida na população em idade ativa (ALTMANN; SCHMIDT; MIRKO, 2018). Esta complicação microvascular específica da retina afeta arteríolas, capilares e vênulas retinianas em resposta à hiperglicemia duradoura (RACZYŃSKA; RACZYŃSKA, 2013; WONG *et al.*, 2016; ZORENA) (Figura 2).

**Figura 2** – Características da Retinopatia Diabética

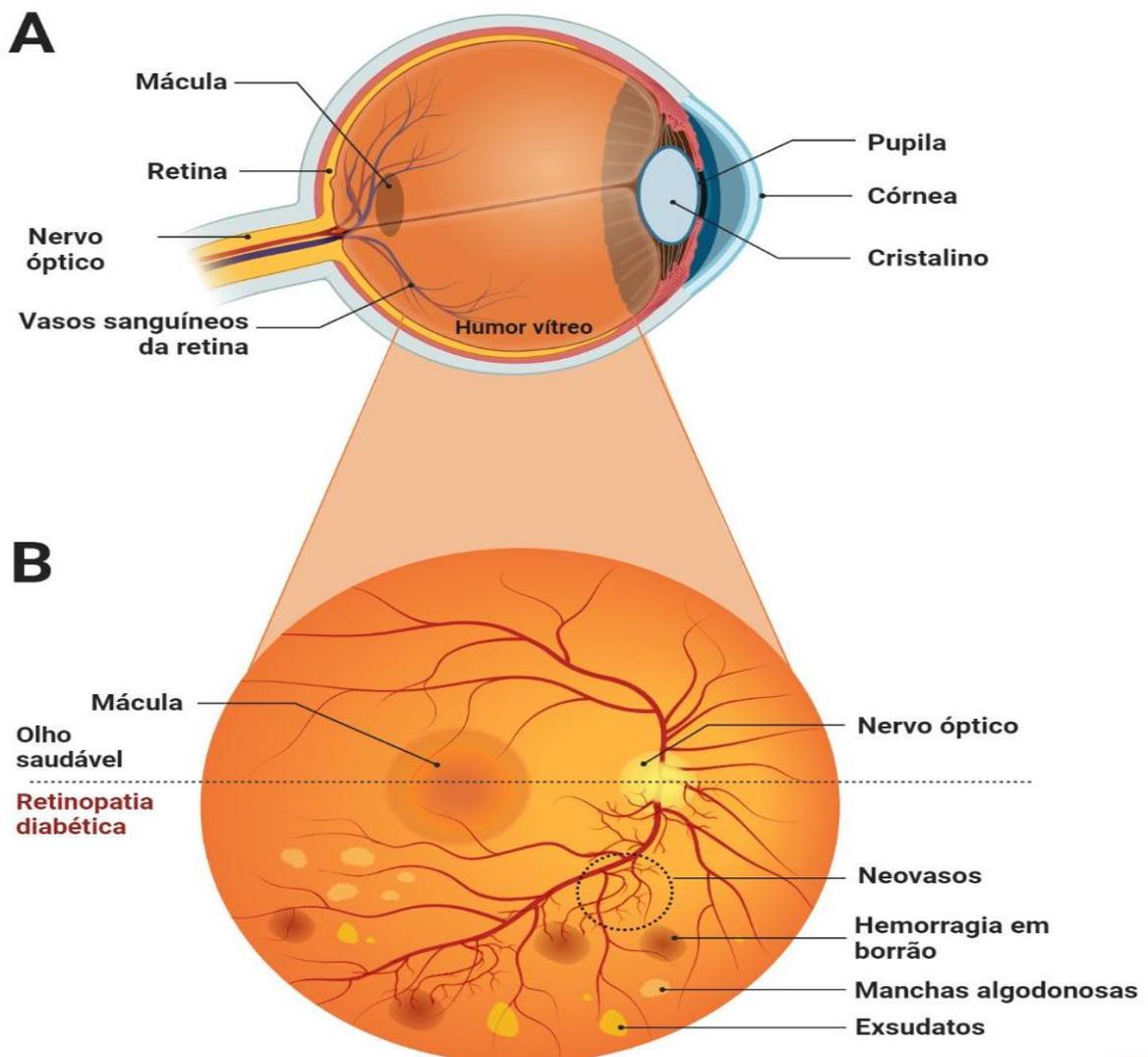


Figura 2. Características da Retinopatia Diabética. A figura mostra que a patologia apresenta alterações iniciais na área temporal da mácula pela presença de microaneurismas (pequenos pontos vermelhos, com bordos bem definidos), seguidos por manchas algodinosas (manchas brancas mais superficiais), exsudatos duros (pontos amarelos bem circunscritos e profundos) e as hemorragias decorrem de lesão da parede vascular. Fonte: Elaborada pela autora, com informações de PRATT *et al.*, 2016; WANG; LO, 2018. Criado com (BioRender.com).

Um maior tempo de evolução do DM2 por si só é um fator de risco para RD, chegando a mais de 60 % nos pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2, e o efeito combinado de maior tempo de evolução da DM2 e controle glicêmico inadequado, exacerbam esse risco e aumentam a gravidade da RD (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

O *Global Burden of Disease Study*, um estudo de magnitude global revelou que a Retinopatia Diabética foi a quinta causa mais comum de cegueira evitável e a quinta causa mais comum de deficiência visual moderada a grave em pessoas com 50 anos ou mais para o ano de 2020 (STEINMETZ *et al.*, 2021). Em uma projeção estimada, até o ano de 2045 haverão cerca de 160,50 milhões (95% CI, 143,70–178,60 milhões) de adultos com Retinopatia Diabética no mundo (TEO *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se que a RD afeta cerca de 35 a 40% dos pacientes com *Diabetes Mellitus*, o que reflete em um número aproximado de 4 milhões de brasileiros com algum grau de comprometimento relacionado à RD (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Embora a incidência de Retinopatia Diabética esteja fortemente relacionada com a duração do diabetes, e controle glicêmico inadequado ( $HbA1c \geq 7\%$ ), outros fatores como a presença de hipertensão arterial, maiores índices de IMC ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), bem como cirurgia de catarata, podem de alguma forma, influenciar o aparecimento ou o curso natural dessa complicação (WONG *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017; BAIN *et al.*, 2020). 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 (BEK, 2017) (Figura 2).

A Escala Clínica Internacional de Gravidade da RD (*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*) é atualmente utilizada para estabelecer os estágios clínicos (WILKINSON *et al.*, 2003). Essa escala representa versão reduzida da classificação da Retinopatia Diabética do *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS, 1991), adotada em 2003 pela Academia Americana de Oftalmologia e amplamente utilizada em estudos clínicos (dentre eles, o do ETDRS). Essa escala foi desenvolvida em reconhecimento à necessidade de uma classificação clínica que refletisse a ameaça à visão ocasionada pela RD. À escala descreve três estágios de Retinopatia não proliferativa (RDNP) de baixo risco, o quarto estágio de Retinopatia não proliferativa, que é considerada severa e o quinto e último estágio que já consiste na retinopatia proliferativa (RDP), o estágio mais grave da doença (Quadro 2; Figura 3).

**Quadro 2-** Descrição dos estágios da RD

| Figuras  | Estágio  | Características   |
|----------|--|---|
| <b>A</b> | Ausência de Retinopatia  | Ausência de sinais aparentes de RD  |
| <b>B</b> | Retinopatia Diabética não proliferativa leve (RDNP leve)         | Microaneurismas.  |
| <b>C</b> | Retinopatia Diabética não proliferativa moderada (RDNP moderada) | Presença de exsudatos, hemorragias superficiais, hemorragias puntiformes ( <i>dot</i> ), hemorragias em borrão ( <i>blot</i> ) e alterações venosas (dilatação e tortuosidade generalizadas, segmentação <i>-beading ou sausage-like</i> – e formação de alças <i>looping</i> ), sem, contudo, atingir as características que definem a RDNP severa. Hemorragias intrarretinianas profundas (arredondadas e mais escuras que as mais superficiais) podem estar presentes, indicando isquemia progressiva. |
| <b>D</b> | Retinopatia Diabética não proliferativa severa (RDNP severa)     | 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.  |
| <b>E</b> | Retinopatia Diabética proliferativa (RDP)                        | Presença de neovasos no fundus e/ou hemorragia vítrea ou préretiniana. Os neovasos podem ser de disco óptico (no disco ou dentro de um diâmetro de disco do disco óptico) ou NVE ( <i>neovascularization elsewhere</i> neovascularização em qualquer outra região do fundus).   |

Fonte: Adaptado de Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (WILKINSON *et al.*, 2003).

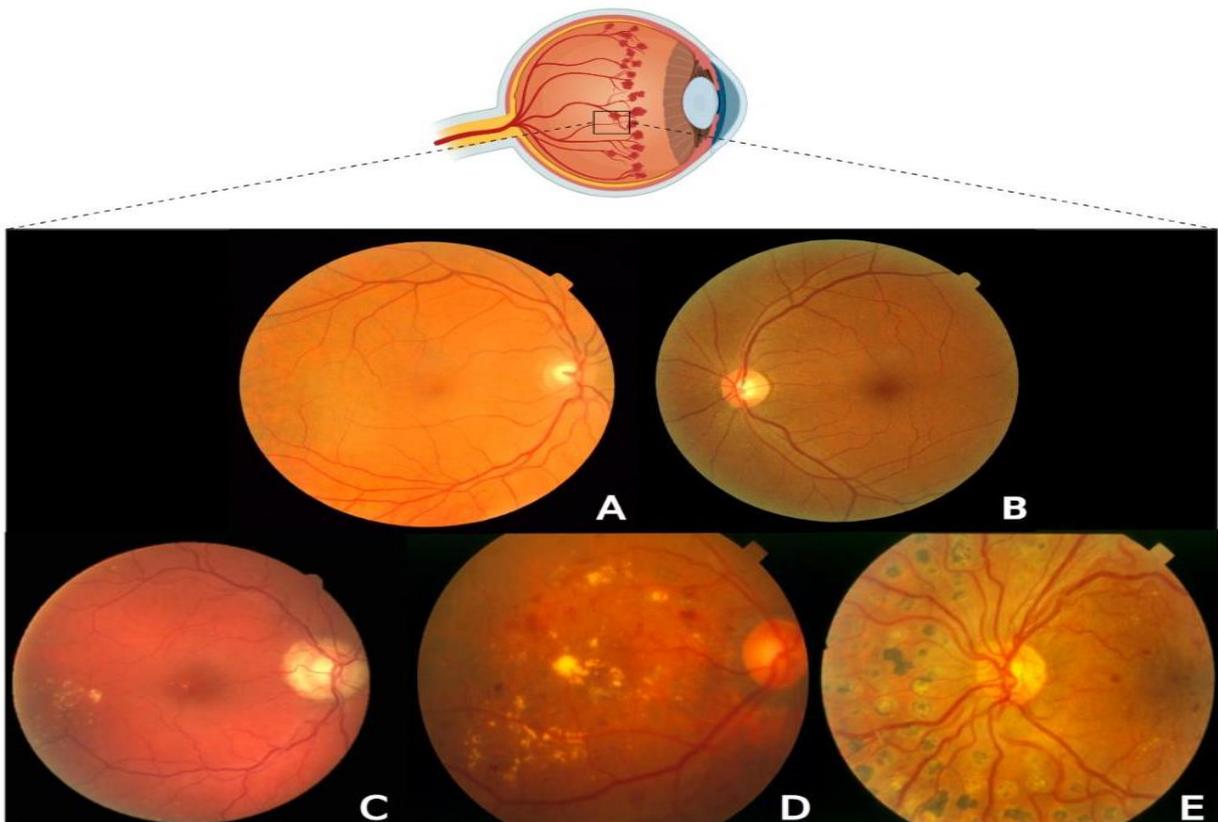
**Figura 3-** Estágios da Retinopatia Diabética

Figura 3. **A-** representa ausência de Retinopatia Diabética; **B-** representa Retinopatia Diabética não proliferativa leve; **C-** representa Retinopatia Diabética não proliferativa moderada; **D-** representa Retinopatia Diabética não proliferativa Severa e **E-** Retinopatia Diabética proliferativa. Fonte: Adaptado de NAGPAL *et al.*, 2022; MANSOUR, 2018. Criado com (BioRender.com).

As alterações da RD iniciam-se na área temporal à mácula, por ser uma área crítica na circulação retiniana onde ocorre o fechamento dos capilares retinianos adjacentes à área foveal avascular, os sinais incluem microaneurismas que resultam da oclusão capilar. São vistos à fundoscopia como pequenos pontos vermelhos, com bordos bem definidos. O microaneurismas (MAs) ocorrem devido à proliferação de células endoteliais a partir do leito venoso dos capilares e correspondem à primeira alteração oftalmoscópica da RD; As manchas algodonosas (ou exsudatos moles), podem ser vistas como manchas brancas mais superficiais, bem delimitadas de bordos irregulares, que tendem a desaparecer em semanas ou meses. Resultam da isquemia microvascular na camada de fibras nervosas da retina, causando infarto e destruição dos axônios. Histologicamente correspondem a acúmulo de organelas, pela alteração no transporte axoplasmático das fibras acometidas; Os exsudatos duros são depósitos de lipídios e/ou lipoproteínas e indicam aumento da permeabilidade vascular retiniana. São vistos como pontos amarelos bem circunscritos e profundos em relação aos vasos da retina; e as hemorragias decorrem de lesão da parede vascular. Quando puntiformes são indistinguíveis dos microaneurismas sem o auxílio da angiografia fluoresceínica. As hemorragias também podem ocorrer na camada de fibras nervosas, assemelhando-se à "chama de vela", ou ainda originarem-se do plexo capilar profundo, com aspecto "em borão" (ANTCLIFF; MARSHALL, 1999).

Clinicamente a RD é identificada pela presença de algumas ou todas das seguintes lesões: microaneurismas, hemorragias, exsudatos duros de lipídios, manchas algodonosas, edema macular, oclusão capilar e neovascularização. A neovascularização marca a progressão para o último e pior estágio prognóstico da doença, o de RDP (PRATT *et al.*, 2016; WANG; LO, 2018) (Figura 3).

### 3.2.1 FATORES DE RISCO PARA RD

O desenvolvimento da RD está fortemente relacionado a fatores de risco modificáveis e não modificáveis. O controle glicêmico é um fator modificável, seguido pela duração do DM e hipertensão arterial, que são não modificáveis (WANG; LO, 2018; BRANDÃO-LIMA *et al.*, 2018; CHATZIRALLI, 2018).

O controle glicêmico é principalmente avaliado por meio dos valores da hemoglobina glicada (HbA1C %), tendo em vista que esta reflete a média dos valores da glicemia, aproximadamente, dos últimos 3 meses (LAITEERAPONG *et al.*, 2018). A recomendação de HbA1c refere que uma taxa de 7% ou inferior a esse valor é primordial no controle da glicemia na maioria dos pacientes, podendo haver melhora se permanecer com um valor menor do que

6,5% (FLAXEL *et al.*, 2019). As recomendações da ADA possuem variações dependentes da história clínica do paciente, variando os objetivos glicêmicos de HbA1c <7% em pacientes adultos (não grávidas), <8% em casos de pacientes com história de hipoglicemias severas, doença vascular avançada ou com DM de longa data; para pacientes com baixas taxas de comorbidades relacionadas com a doença e sem histórico de hipoglicemias, recomenda-se um valor alvo de HbA1c inferior a 6,5% (ELSAYED *et al.*, 2023).

Um grande estudo prospectivo randomizado afirmou que um bom controle glicêmico (HbA1C <7%) esteve associado a uma redução de cerca de 50-76% das taxas de desenvolvimento e progressão de complicações microvasculares da DM, entre elas a RD (LACHIN *et al.*, 2015). Ainda no mesmo estudo, quando o percentual de HbA1c foi reduzido de 9% para 8%, houve uma diminuição no risco de RD entre 30 a 40%, redução de 25% na necessidade de tratamento com laser e redução de 15% nas taxas de cegueira. Atingir a meta glicêmica de HbA1c em <7% demonstrou reduzir o risco para complicações microvasculares em pacientes com DM1 e com DM2, especialmente quando alcançada em fase inicial da doença (SELVIN, 2016).

A duração do DM é o fator de risco não modificável amplamente reconhecido e, provavelmente, um dos mais importante para o desenvolvimento e progressão da RD (ZHANG *et al.*, 2017; HAINSWORTH *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2020; MALERBI *et al.*, 2022). Há relatos de que 5 anos após o diagnóstico de DM, cerca de 25% dos indivíduos com Diabetes tipo 1 terão RD e, após 10 anos de duração da doença, quase 60% irão desenvolver RD (KLEIN *et al.*, 1984) e após 15 anos, 80% terão RD (VARMA *et al.*, 2004). Uma vez estabelecida a RD, a duração da DM parece ser um fator de risco menos importante do que o controle glicêmico para a progressão para fases mais avançadas de RD (LEE; WONG; SABANAYAGAM, 2015).

A relação entre o controle da hipertensão arterial e RD, vem sendo confirmada (ADA, 2019). O UKPDS (*UK Prospective Diabetes Study Group*) mostrou que, após 9 anos de acompanhamento de um grupo com controle rígido da pressão arterial, levou a uma redução de 34% no risco da progressão da RD e redução de 47% de declínio da acuidade visual (UKPDS, 1998). Ao longo dos anos essa relação de hipertensão e RD se consolidou e um estudo de base populacional envolvendo 13.476 pacientes com DM2, afirmou que a hipertensão foi um fator de risco independente para RD leve a moderada (LIU *et al.*, 2017).

Um grupo de estudos em retina, em um estudo multicêntrico, relatou que pacientes com DM2 com hipertensão controlada, por um período médio de 8,4 anos, levou a uma redução de 34% na taxa de progressão da RD e de 47% de redução na taxa de declínio da acuidade visual (QUINTÃO *et al.*, 2017). Tais benefícios apenas se verificam na presença do controle

continuado e de longa duração nos valores de pressão arterial, apesar de que valores alvo muito restritivos (<120/mmHg) não demonstraram acrescentar qualquer benefício adicional (GUBITOSI-KLUG *et al.*, 2016).

### 3.3 FISIOPATOLOGIA

A RD é basicamente a manifestação retiniana de uma microangiopatia sistêmica. Os fatores que levam às alterações da complicação, geradas principalmente pela deficiência de insulina e consequente hiperglicemia são: aumento da HbA1c, o que bloqueia a liberação de oxigênio para células; seguido pelo aumento do sorbitol intracelular que leva ao aumento da pressão osmótica e ao aparecimento do edema celular, que ao destruir os pericitos aumentam a permeabilidade capilar, gerando o espessamento das membranas basais dos capilares, o que favorece fenômenos oclusivos, sendo estas as alterações iniciais que apontam para o desenvolvimento da RD (RÜBSAM; PARIKH; FORT, 2018).

A exposição prolongada à hiperglicemia e a processos neurodegenerativos e inflamatórios, leva a neovascularização da retina, formação de microaneurismas, presença de exsudatos proteicos no vítreo e, finalmente, um declínio constante na acuidade visual dos pacientes (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010; TANG; KERN, 2011; WANG; LO, 2018). Diversas vias metabólicas são reconhecidas por estarem comprovadamente implicadas nos danos vasculares que são induzidos pelo estado constante de hiperglicemia em pacientes com DM, tais como as vias do polioliol e sorbitol, acumulação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), via da proteína cinase C (PKC), via da hexosamina, e sistema renina-angiotensina (TARR *et al.*, 2013; WANG; LO, 2018), resultando em aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células e agravamento do estresse oxidativo na retina e inflamação (WHITEHEAD *et al.*, 2018).

A inflamação de baixo grau provoca diversas anormalidades celulares e lesões teciduais que afetam a retina (ALTMANN; SCHMIDT, 2018; RÜBSAM *et al.*, 2018; WANG; LO, 2018; WHITEHEAD *et al.*, 2018), como mediadores pró-inflamatórios, moléculas de adesão, quimiocinas e fatores de crescimento, que se encontram aumentados e diretamente envolvidos na patogênese da RD (ALTMANN; SCHMIDT, 2018; LU *et al.*, 2018; RÜBSAM *et al.*, 2018; WANG; LO, 2018). As células inflamatórias na retina também respondem a lesões e estresse. Estímulos nocivos ativam células endoteliais e pericitos para secretarem fatores pró-inflamatórios, recrutando leucócitos que aderem ao endotélio vascular, causando leucostase e subsequente não perfusão capilar (SPENCER *et al.*, 2020). Células gliais, que fornecem suporte

estrutural na retina normal, também são ativadas no início da RD e participam da regulação da homeostase microambiental (RÜBSAM *et al.*, 2018; SORRENTINO *et al.*, 2016). Na RD, a micróglia prolifera e migra da retina interna para a externa e secreta múltiplas citocinas inflamatórias. Estas podem aumentar a permeabilidade vascular e induzir o acúmulo de fluido intra-retiniano, interrompendo as proteínas da junção justa e desencadeando a quebra da barreira hemato-retiniana (BRB) (TANG *et al.*, 2022) (Figura 4).

**Figura 4-** Fisiopatologia da Retinopatia Diabética

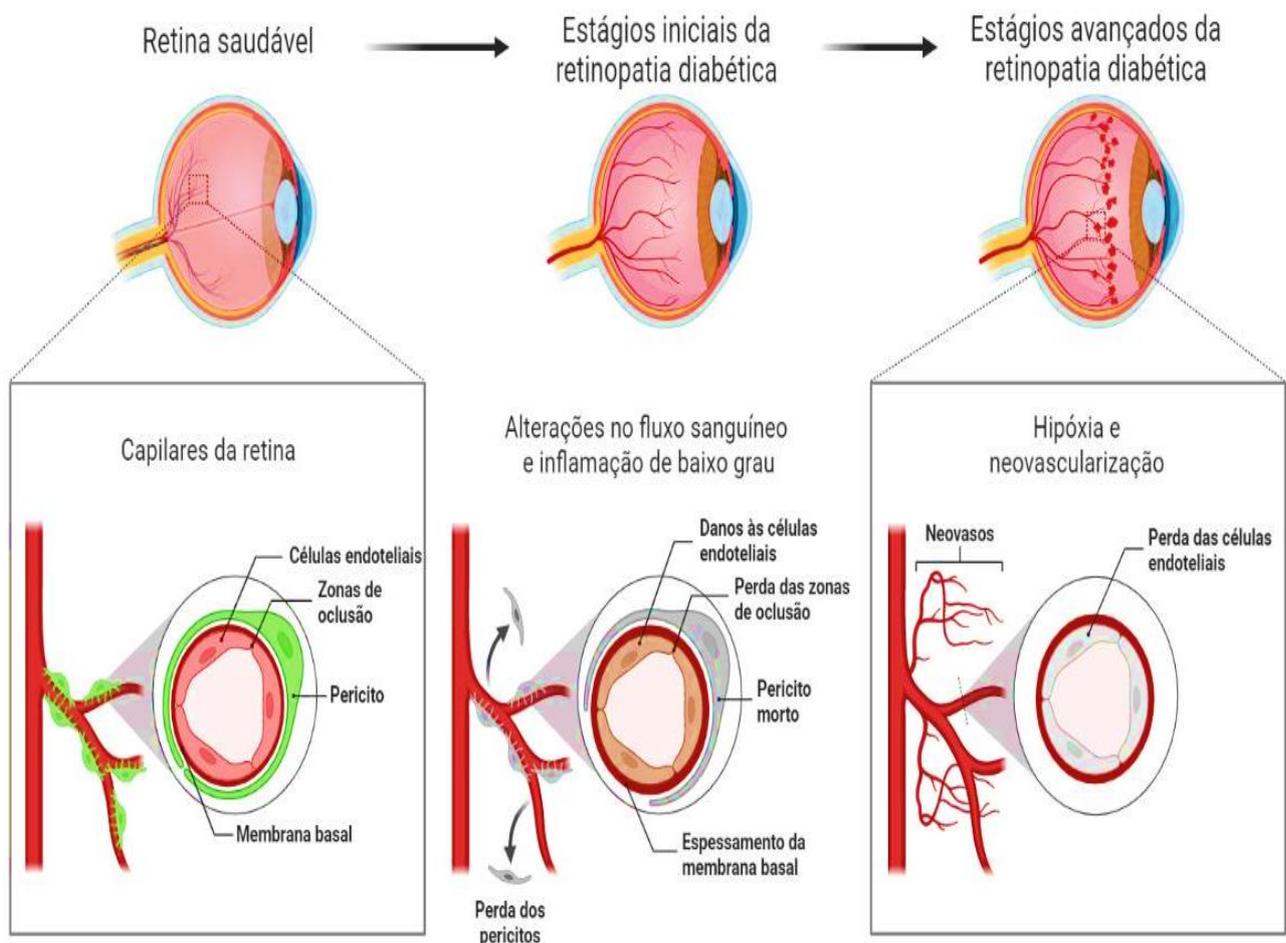


Figura 4. Fisiopatologia da Retinopatia Diabética, a primeira imagem da esquerda representando características da retina saudável; imagem do meio correspondendo a aos estágios iniciais de Retinopatia Diabética e a imagem a direita representando a retina em estágios avançados da Retinopatia Diabética. Fonte: Elaborada pela autora com informações de MANSOUR, 2018; NAGPAL *et al.*, 2022. Criado com (BioRender.com).

Como resposta à hiperglicemia prolongada há uma dilatação dos vasos retinianos e alterações na corrente sanguínea, que por sua vez aumentam o metabolismo da retina de pacientes com DM (BEK, 2017). Outras consequências da hiperglicemia prolongada, são a perda de pericitos, que são responsáveis pelo suporte estrutural dos capilares e a sua perda leva a evaginações na parede dos mesmos e consequente perda de regulação do tônus vascular

retiniano, além dessas consequências, a diminuição da perfusão capilar e subsequente isquemia, induz a hipóxia que desencadeará uma série de danos ao tecido (CURTIS *et al.*, 2009). Este processo está associado à formação de microaneurismas que representa o primeiro sinal clínico de RD (AUGUSTIN *et al.*, 2002; CHEW; FERRIS, 2006) (Figura 4).

Com a natural progressão da doença, ocorre a oclusão capilar e consequente isquemia, alterações que são responsáveis pela consequente cascata de acontecimentos metabólicos extremamente nocivos para a retina – a hipóxia leva a um aumento da ativação do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor* - VEGF) através da ativação do fator induzido pela hipóxia (HIF-1) (HUANG *et al.*, 2015). O VEGF é crucial na progressão da doença para o estágio de RDP e edema macular diabético, encontrado no vítreo de pacientes com RD. O VEGF é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e, principalmente, atua como fator angiogénico, promovendo a proliferação de células endoteliais pela ativação das proteínas de ativação mitogénica (MAP), levando a derrames vasculares característicos da RD (MITCHELL *et al.*, 2012; CHAWLA; CHAWLA; JAGGI, 2016).

### 3.3.1 MECANISMOS SUBJACENTES AO EFEITO DA HIPERGLICEMIA

#### - A via do poliol

O termo poliol é geralmente aplicado ao produto da redução de um carboidrato. A via poliol envolve a redução da ação enzimática da aldose-redutase de um hidrato de carbono (como a glicose) a um poliol acíclico (como o sorbitol) (BARREIROS *et al.*, 2005). Em alguns tecidos insulino-independentes (neurônio, cristalino, retina, célula de *Schwann* do nervo periférico, rim e vaso sanguíneo), a hiperglicemia leva a um aumento na glicose intracelular. A glicose, por sua vez, em excesso é então metabolizada a sorbitol e a frutose. Estes acumulados dentro da célula causam um aumento da osmolaridade, ocasionando o influxo de água e consequências funcionais gravíssimas para a célula, que podem comprometer sua homeostase. Além disso, no cristalino, a água absorvida osmoticamente causa tumefação e opacidade. Este mecanismo pode ser responsável por lesões dos pericitos dos capilares retinianos (FEENER; KING, 1997).

Os pericitos são células localizadas ao longo da superfície externa dos capilares e compartilham da lâmina basal das células endoteliais, possuem tropomiosina, isomiosina e proteína-quinase, todas relacionadas à contração que regula o fluxo de sangue através dos capilares (GARTNER; HIATT, 1999). Essas estruturas são essenciais para o controle da microcirculação retiniana. O papel do sorbitol na morte dos pericitos tem sido discutido e acredita-se que hiperglicemia desempenhe um efeito inibitório na proliferação dessas células.

Estas importantes alterações podem causar microaneurismas retinianos (CORREA; EAGLE, 2005).

No diabetes, a via do poliol metaboliza o excesso de glicose. A ativação da via do poliol, também conhecida como via sorbitol-aldose redutase, representa um dos processos observados nas condições de estresse oxidativo induzido por hiperglicemia durante a patogênese da RD (LORENZI, 2007; ALTMANN; SCHMIDT, 2018). Nesta fase, a glicose é reduzida a sorbitol e em seguida oxidada a frutose, com a ajuda de duas enzimas: a aldose redutase (que converte a glicose em sorbitol) e a sorbitol desidrogenase (que oxida o sorbitol em frutose) (LORENZI, 2007). A aldose redutase e a sorbitol desidrogenase necessitam de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) para converter glicose em frutose (DUNLOP, 2000).

Em estados de hiperglicemia constante, a atividade da via poliol aumenta, seguida por uma redução nos níveis de NADPH que pode regenerar um antioxidante intracelular (GSH) (SCHMIDT *et al.*, 2005). Considerando os efeitos da aldose redutase na retina, a patogênese da Retinopatia Diabética é induzida pela atividade da aldose redutase juntamente com as mudanças na pressão osmótica causada pelo acúmulo de álcool polihídrico e a segunda etapa da via do sorbitol, na qual o SDH catalisa a oxidação de sorbitol em frutose (FERREIRA *et al.*, 2013). A redução de  $\text{NAD}^+$  em NADH, devido à hipóxia e desequilíbrio redox, aumenta os níveis intracelulares de NADH, levando a edema celular, alterações estruturais, distúrbios metabólicos e lesão microvascular (ELLIS *et al.*, 2002).

#### - Formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs)

Os produtos finais de glicosilação avançada são formados como resultado de uma reação clássica de *Maillard* quando açúcares redutores reagem não enzimaticamente com um grupo amino de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e subseqüentes modificações oxidativas (glicoxidação) para produzir AGEs (PÉREZ-BURILLO; RUFÍAN-HENARES; PASTORIZA, 2019). Em condições fisiológicas normais, há produção moderada de AGEs, mas o processo é acelerado em condições hiperglicêmicas persistentes (como ocorre no Diabetes e na Retinopatia), devido ao aumento da disponibilidade de glicose (FISHMAN *et al.*, 2018), além disso, quando se estabelece a ligação de AGEs ao seu receptor cognato (RAGE), ocorre a ativação de múltiplos sinais que podem afetar a função celular e o metabolismo por meio da regulação positiva da inflamação e do estresse oxidativo (WU *et al.*, 2018; ASADIPOOYA, 2019).

## - Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas quimicamente reativas, formadas como um subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio e têm um papel importante na sinalização celular e na homeostase. No entanto, as EROs são induzidas pela hiperglicemia em pacientes diabéticos, e quando em níveis elevados provocam estresse oxidativo e lesão celular (KOHNET; FREYSE; SALZSIEDER, 2012; DI ROSA 2016; LIANG *et al.*, 2017).

É comum ao DM1 e DM2 que haja baixa capacidade antioxidante das células  $\beta$  pancreáticas, que resulta em falência das células pancreáticas (KANETO *et al.*, 2007; ARIBEYG *et al.*, 2020). O estresse oxidativo favorece a ocorrência da resistência à insulina e, no DM2 ocorre, principalmente, por disfunção e apoptose de células  $\beta$  pancreáticas (YARIBEYGI *et al.*, 2020; SIDARALA *et al.*, 2020). A hiperglicemia persistente favorece ainda à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), resultando no acúmulo de radicais livres (LIGUORI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), sendo a intervenção antioxidante uma ação importante para diminuir ou evitar o acúmulo de ROS (ZHANG *et al.*, 2020). O estresse oxidativo é considerado um fator crucial na patogênese de RD. A retina é suscetível a EROs por causa das exigências de alta energia e exposição à luz. Quando o equilíbrio é quebrado, as EROs provocam lesão nas células da retina através da interação com componentes celulares (CALDERON *et al.*, 2017; DATTA *et al.*, 2017).

## - Fluxo da via da hexosamina

Na via da hexosamina o intermediário glicolítico frutose-6-fosfato é convertido em glucosamina-6-fosfato por meio da ação da glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase, que é a enzima que regula a velocidade dessa via (FIGUEROA-ROMERO; SADIDI; FELDMAN, 2008). As etapas enzimáticas posteriores levam à acetilação e produção do amino açúcar UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (DENZEL; ANTEBI, 2015), UDP-GlcNAc, por sua vez, é um composto metabólico essencial na formação de cadeias glicosil tanto de proteínas quando de lipídios (IGHODARO, 2018). Além disso, sob a ação da O-glicosiltransferase (OGT), o UDP-GlcNAc pode modificar a proteína o-GlcNAc (AKELLA; CIRAKU; REGINATO, 2019).

Em pacientes diabéticos, o excesso de frutose-6-fosfato é desviado para a via da hexosamina, e por sua vez, o aumento no fluxo desta via leva a um aumento nos níveis de UDP-GlcNAc, levando a um aumento nos níveis de O-GlcNAc (O-GlcNAc transferase) (PADBERG

*et al.*, 2014; IGHODARO, 2018), levando à desregulação imune por meio da superexpressão de O-GlcNAc (YANG *et al.*, 2020).

#### **- Via da proteína cinase C (PKC)**

A hiperglicemia também acarreta aumento no fluxo de glicose pela via da glicólise. A via da proteína cinase C (PKC) é ativada pela elevação da síntese de diacilglicerol (DAG), este, por sua vez, é o ativador crítico de PKC nas células (WANG, 2006). A PKC medeia diversas vias de sinalização bioquímica e, como resultado, afeta vários processos moleculares quando regulada positivamente na RD, incluindo a ativação dos fatores de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), o que leva a uma expressão aumentada de proteínas que estão ligadas ao estresse oxidativo (ROSSE *et al.*, 2010). A família de PKCs contém 12 isoformas, nas quais foi relatado que PKC- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  e - $\epsilon$  são ativados durante o desenvolvimento de DR (GRAY; DONNELLY, 2001; GRINER; KAZANIETZ, 2007; IDRIS).

A regulação de diversos processos fisiológicos nas células da retina está intimamente relacionada à via da PKC, incluindo hemodinâmica da retina, ativação e adesão aumentada de leucócitos (leucostase), permeabilidade endotelial e expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no tecido da retina (AIELLO *et al.*, 2006; TITCHENELL; ANTONETTI, 2013; YUAN *et al.*, 2019).

#### **- Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)**

A cascata do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) sistêmico tem início com o angiotensinogênio hepático (AGT), que é convertido em Angiotensina I (ANG I) pelo hormônio renina. A enzima conversora de angiotensina (ECA), secretada pelos pulmões e rins, converte ANG I em Angiotensina II (ANG II), enquanto a enzima conversora de angiotensina II (ACE2) cliva ainda mais ANG II em ANG. O equilíbrio entre a atividade da ECA e da ACE2 influencia o efeito final do SRAA, uma vez que ANG II promove vasoconstrição e proliferação enquanto a ANG I estimula vasodilatação e apoptose (COOPER, 2004; ROMANÍ-PÉREZ *et al.*, 2015).

A hiperglicemia induz a síntese do Receptor AT1R (medeia as ações clássicas do ANG II, como vasoconstrição, liberação de aldosterona e retenção de sódio e água), e a expressão de AT1R em células mesangiais e podócitos, induzida por altos níveis de glicose, promove a expressão intracelular de mediadores pró-fibróticos e pró-inflamatórios, como fator de crescimento transformador beta, VEGF e interleucina-6, levando à hiperplasia e hipertrofia,

principalmente do túbulo proximal, juntamente com a produção de matriz extracelular (CASTAÑEDA *et al.*, 2021).

Ainda como efeito da hiperglicemia, foi sugerido que o SRAA intra renal seja o principal responsável por injúrias locais no diabetes, pois esse estado de hiperglicemia persistente pode aumentar as ações pró-inflamatórias e pró-fibróticas (PUTNAM *et al.*, 2012). Além disso, a hiperglicemia no túbulo proximal também foi relatada como sendo causa do aumento da reabsorção de glicose, sódio e água em pacientes com DM (ANSARY; NAKANO; NISHIYAMA, 2019). O SRAA local foi mencionado como contribuinte para resistência à insulina no tecido adiposo (SAXENA *et al.*, 2019) e os componentes do SRAA são altamente expressos no tecido adiposo na presença de hiperglicemia e no DM2 (GOOSSENS *et al.*, 2012) (Figura 5). Além disso, no DM2 as alterações órgão-específico no SRAA têm sido evidenciadas no tecido adiposo, pâncreas, fígado, músculo esquelético, rim e coração (LAVOIE; SIGMUND, 2003; GOOSSENS; BLAAK; VAN BAAK, 2003; MARCUS; SHEFER; STERN, 2013).

**Figura 5-** Mecanismos subjacentes ao efeito da hiperglicemia

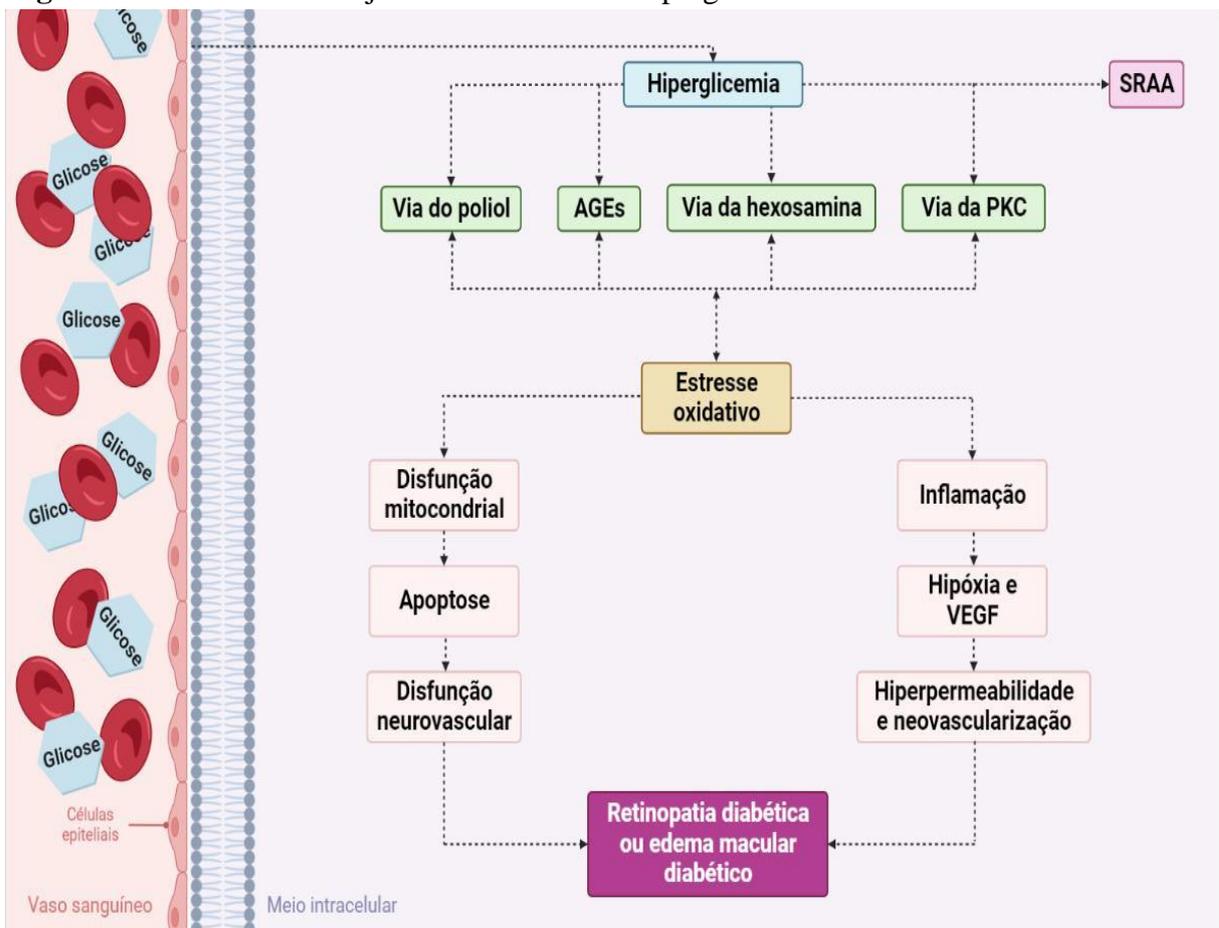


Figura 5 representando os mecanismos subjacentes ao efeito da hiperglicemia; SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; AGEs: Produtos finais de glicação avançada; Via da PCK: Via da proteína cinase C; VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial. Fonte: Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2018. Criado com (BioRender.com).

### 3.4 Consumo Alimentar e Retinopatia Diabética

Recentes descobertas evidenciaram o consumo alimentar inadequado como fator de risco associado ao desenvolvimento de DM e suas complicações (DEEPA; ANJANA; MOHAN, 2017; BARRIÈRE *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2018). Em destaque, a ingestão de açúcar adicionado, e especialmente o consumo de frutose a partir de sacarose ou xarope de milho rico em frutose encontrado em refrigerantes e alimentos adoçados com açúcar, tem sido associado a complicações metabólicas relacionadas ao diabetes (JOHNSON *et al.*, 2013; MALIK; HU, 2015). A frutose promove resistência à insulina, metabolismo prejudicado da glicose, dislipidemia, além de disfunções cardíacas e renais (STANHOPE *et al.*, 2009; NAKAYAMA *et al.*, 2010).

Um grande número de pacientes com DM2 e RD possui sobrepeso ou obesidade, o que evidencia que mudanças no estilo de vida são essenciais no controle dos níveis de glicose, a fim de exercer efeitos positivos em termos de aumentar a expectativa de vida (MILECH *et al.*, 2016), e reduzir a incidência de doenças relacionadas a idade (COLMAN *et al.*, 2014).

A análise dos dados de 31 estudos revelaram que maiores ingestões de fibra dietética, peixes oleosos e maior adesão a uma dieta do tipo mediterrânea foram fatores protetores para RD, enquanto que a alta ingestão calórica total esteve associada a maior risco de RD. No entanto, no que diz respeito à ingestão geral de carboidratos, vitamina D e sódio, não foram encontradas associações com a RD (WONG *et al.*, 2018). Outra revisão evidenciou que a adesão à dieta tipo mediterrânea e a alta ingestão de frutas, vegetais e peixes podem proteger contra o desenvolvimento de RD (DOW *et al.*, 2018). Em um estudo conduzido com pacientes asiáticos com DM2 sem RD e com grupos de RD moderada e Severa/Proliferativa mostrou que o maior consumo na ingestão de peixe pela dieta no grupo com DM2 foi associado a um menor risco de RD e que a maior ingestão de peixe também foi associada ao maior calibre vascular da retina entre os diabéticos sem sinais de RD. Ainda não está claro se a relação entre a ingestão de peixe na dieta com a microvascularização da retina e a RD é resultado de uma causa ou consequência, mas os autores sugerem possíveis ligações por meio de mecanismos de inflamação (CHUA *et al.*, 2018).

Em estudo conduzido com modelos murinos, utilizando camundongos *db*, uma dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos aumentou os níveis de glicose no sangue e exacerbaram as manifestações renais, em comparação com uma dieta pobre em proteínas e rica em carboidratos (ARIMURA *et al.*, 2017). Outro estudo, também com camundongos *db*, mostrou que uma dieta rica em proteínas e com baixo teor de carboidratos afetou as

manifestações retinianas. A expressão de *CD11* (Integrina expressa nos Leucócitos), nos genes *Ace* e *Ager* na retina foi regulada positivamente por diferentes teores de proteína e carboidratos da dieta, enquanto a expressão do gene *Agt* foi regulada negativamente em condições de dieta rica em proteínas, independentemente dos genótipos (ARIMURA *et al.*, 2018).

Um estudo com mais de 400 indivíduos chineses com DM2 com e sem RD, realizou registro alimentar dos participantes e mostrou que a maior ingestão de vitamina E e Selênio parecem ser fatores de proteção para RD (SHE *et al.*, 2021). Outro estudo, com mais de 200 pacientes com DM2 com 106 destes tendo RD, revelou que a duração do DM, consumo de peixe (vezes na semana), ovo (sim/não), arroz almoço (sim/não), arroz jantar, arroz (cozido/branco) e ingestão calórica total estiveram associados à RD. Quando realizada uma análise multivariada, os homens, maior duração do diabetes, ingestão de antioxidantes e o consumo de arroz, mostraram ter associação significativa com RD, sendo três vezes maior a chance de desenvolver RD nesses pacientes. No mesmo estudo, as chances de desenvolver RD foram menores naqueles pacientes com o consumo mais frequente (> 2 vezes/semana) de peixe e em pacientes em tratamento farmacológico para DM (KADRI *et al.*, 2021).

Uma revisão de 15 estudos com total de 4.094 participantes com DM, mostrou que houve uma associação inversa entre os níveis plasmáticos de vitamina C com RD em 5 estudos envolvendo pacientes recrutados em hospitais, enquanto que em estudos de base populacional nenhuma associação foi encontrada entre ingestão alimentar e RD (LEE *et al.*, 2010).

Outros estudos sugerem que a realização de restrições nutricionais poderiam atuar aumentando a longevidade, porém, estes não se encontram totalmente elucidados. Alguns desses têm focado a atenção na desregulação da via da insulina, uma vez que o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças associadas ao mesmo vem acompanhado de comprometimento na homeostase da glicose (LOPEZ-TORRES *et al.*, 2002; BJEDOV; PARTRIDGE, 2011; PERLUIGI; DI DOMENICO; BUTTERFIELD, 2015).

Um grande estudo conhecido como CALERIE (*Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*) teve como objetivo mostrar os efeitos da restrição calórica em indivíduos saudáveis. Já foi mostrado que em um período de dois anos, este tipo de intervenção foi eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina (FONTANA; KLEIN; HOLLOSZY, 2010), na redução de marcadores inflamatórios (REDMAN *et al.*, 2018) e do estresse oxidativo (II'YASOVA *et al.*, 2018). Estas características estão especialmente aumentadas em pacientes com DM2, o que sugere uma alternativa de intervenção para esses indivíduos. Evidenciando a necessidade de acompanhamento do consumo alimentar, a fim de

melhor compreender o comportamento alimentar de indivíduos com DM2 e suas complicações, visando um acompanhamento individualizado.

Apesar da consolidada relação entre saúde e nutrição, foi apenas a partir do desenvolvimento de novas tecnologias que as interações entre a composição genética, fatores ambientais e componentes dietéticos pode ser investigada (MÉPLAN, 2015; FERGUSON *et al.*, 2016). A utilização dessas tecnologias voltadas a pesquisas em nutrição acarretou no surgimento da genômica nutricional, que pode ser dividida em duas grandes áreas: a de modulação da expressão gênica pelos compostos nutricionais (nutrigenômica) e o efeito da genética do indivíduo frente a resposta aos nutrientes (nutrigenética) (TEBANI *et al.*, 2016; MÉPLAN, 2015).

### 3.5 VITAMINA D

A vitamina D (VD) é um hormônio esteroide envolvido em importantes processos fisiológicos. As necessidades corporais deste hormônio são atendidas em maior parte (80-90%) por sua síntese cutânea (colecalfiferol ou vitamina D3) a partir do precursor 7-deidrocolesterol após estimulação da luz solar e em menor parte (10-20 %) originados da dieta (ergocalciferol ou vitamina D2) (CASTRO, 2011).

A hipovitaminose D tem sido associada a DM em diversos estudos conforme evidenciado e analisado em metanálise (AFZAL; BOJESSEN; NORDESTGAARD, 2013). Da mesma forma, níveis plasmáticos mais baixos de VD têm sido encontrados em pacientes portadores de RD quando comparados a pacientes diabéticos que não desenvolveram retinopatia (TECILAZICH; FORMENTI; GIUSTINA, 2021).

O primeiro relato entre hipovitaminose D e intolerância à glicose data de mais de 20 anos atrás (PIETSCHMANN; SCHERNTHANER; WOLOSZCZUK, 1988) e desde então vários outros achados reforçam a hipótese que os níveis séricos de 25 (OH) vitamina D (25-OHD) eram mais baixos em pacientes com DM2 em comparação com controles não diabéticos (DALGÅRD *et al.*, 2011; GHATTAVI; JOHARI, 2020), e que esse padrão se repetiu em pacientes diabéticos com e sem RD. Os pacientes com RD apresentavam níveis mais baixos de vitamina D quando comparados a pacientes diabéticos sem RD (ZHANG; UPALA; SANGUANKEO, 2017; AFARID; GHATTAVI; JOHARI, 2020). Uma meta-análise de 14 estudos com 10007 pacientes com RD, revelou que houve associação entre RD e deficiência de VD em todos os subgrupos avaliados, que incluíam populações da Turquia, EUA, Japão, Itália,

Índia, Irã, Líbano, Espanha, Holanda, China, Inglaterra e Coreia (ZHANG; UPALA; SANGUANKE, 2017).

Uma meta-análise com 2.703 indivíduos relatou que houve uma redução da glicemia em jejum após a suplementação de VD ( $\geq 2.000$  UI/dia por um período de até 3 meses) em pacientes com DM2, contudo esse achado se referiu apenas a uma análise de subgrupo com pacientes do Oriente médio, correspondendo a 8 estudos de um total de 20 (LI *et al.*, 2018). Outra meta-análise, desta vez voltada ao público com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG), reuniu 6 estudos com mulheres iranianas e chinesas (n=454), e verificou uma diminuição da glicemia de jejum, aumento de HDL-c e redução de LDL no grupo que recebeu suplementação de VD (as doses variaram entre 50.000 UI de vitamina D3 a cada 2 semanas e consumo de uma bebida de iogurte suplementada com vitamina D3, fornecendo 1000 UI por dia), no entanto a qualidade das evidências encontradas foi baixa (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Outra meta-análise de 15 estudos envolvendo pacientes diabéticos (17.644 indivíduos e destes, 3.455 apresentavam RD), concluiu que pacientes com DM2 e deficiência de VD (25(OH)D  $<20$  ng/mL) tiveram risco aumentado para desenvolver RD, mas não aqueles com insuficiência de VD (25(OH)D  $<30$  ng/mL), esses dados foram de populações na Ásia, América do norte, Europa, África e um estudo conduzido em três países (Austrália, Nova Zelândia e Finlândia) (LUO; GAO; QIN, 2017). A baixa concentração de VD (25OH-D no sangue  $<50$  nmol/L) também esteve associada a doenças cardiovasculares, hipertensão, RD, nefropatia, dislipidemia e microalbuminúria, além de HbA1c, PCR-Us e IMC mais altos, em um estudo de coorte, duplo-cego, controlado por placebo em 63 centros na Austrália, Nova Zelândia e Finlândia, incluindo 9.795 pacientes com DM2 (HERRMANN *et al.*, 2015). Nesse mesmo estudo a 25OH-D sanguínea foi um preditor de risco independente, conferindo um risco de aproximadamente 23% mais chances de eventos macrovasculares nos pacientes com DM2 e concentrações mais baixas de VD (HERRMANN *et al.*, 2015).

Além disso, a VD foi associada a progressão de RD (TECILAZICH; FORMENTI; GIUSTINA, 2020); e a suplementação de VD demonstrou efeito protetor ao olho, frente ao estresse oxidativo, em pacientes com RD (VALLE; RUSSO; MALAGUARNERA, 2021). Mais informações sobre os estudos com Vitamina D no contexto de DM e RD estão compilados no Apêndice E.

Tanto a vitamina D formada na pele quanto à ingerida precisam ser metabolizadas para originar a forma ativa da vitamina D (1,25-OH<sub>2</sub>D) para que esta seja liberada na corrente sanguínea até alcançar seus tecidos-alvo. Este processo é regulado pelo paratormônio (PTH) e

pelas concentrações sanguíneas de cálcio e fósforo (HOSSEIN-NEZHAD *et al.*, 2013; MAEDA *et al.*, 2014) (Figura 6).

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tem suas ações mediadas por um receptor nuclear pertencente à família de receptores hormonais nucleares, o receptor de vitamina D (*VDR*). O *VDR* humano tem peso molecular de 50 kDa, 427 resíduos de aminoácidos e possui um domínio de ligação para a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Como o *VDR* foi encontrado em praticamente todos os tipos de células, pode explicar suas múltiplas ações em diferentes tecidos (FELDMAN; KRISHNAN; SWAMI, 2013; RAFAELLI *et al.*, 2015; CHRISTAKOS 2017; CHRISTAKOS *et al.*, 2017).

**Figura 6-** Representação da biossíntese e metabolismo da vitamina D

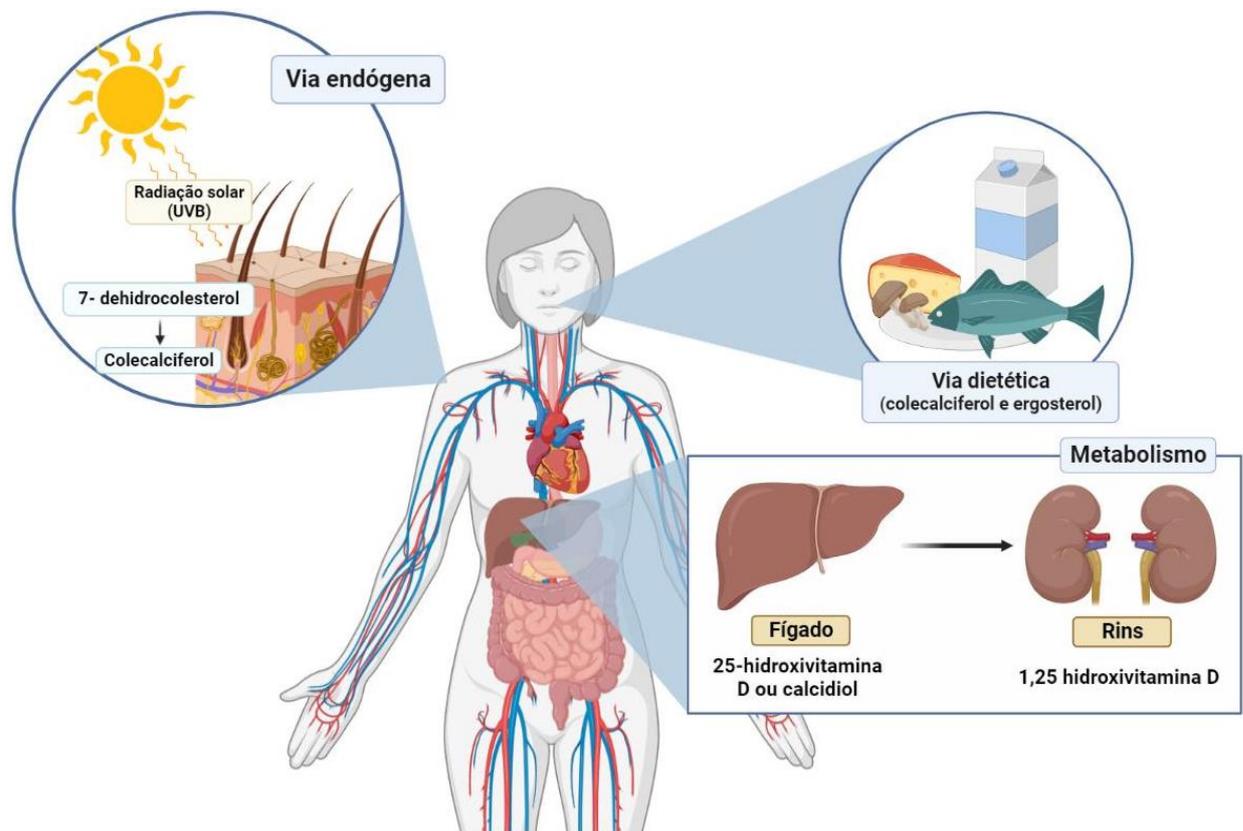


Figura 6- com a representação da biossíntese e metabolismo da vitamina D. Raios UVB: Raios Ultravioleta B. Elaborada pela autora, com informações de HOSSEIN-NEZHAD; SPIRA; HOLICK, 2013; MAEDA *et al.*, 2014. Criado com (BioRender.com).

### 3.5.1 O gene receptor da vitamina D (*VDR*) e o polimorfismo rs1544410

O gene *VDR* (HGNC Symbol:12679) está localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.11. Este gene consiste basicamente em 9 éxons e 8 íntrons distribuídos entre as regiões 5` promotora e 3` regulatória. Nesta última, existe uma longa região 3` não traduzida envolvida na modulação da expressão gênica, especialmente através da regulação da estabilidade do RNA

mensageiro (RNAm) (BAKER *et al.*, 1988; DECKER; PARKER, 1995; DURRIN *et al.*, 1999) (Figura 7).

Os éxons 2 ao 9 codificam o produto final enquanto o éxon 1, subdivididos em 1A, 1B e 1C, tem funções regulatórias. O domínio de ativação de transcrição e ligação de DNA é codificado pela região compreendida pelos éxons 2 e 3. Os éxons 7, 8 e 9 codificam para o domínio de ligação para 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. A região promotora localizada no éxon 1A não apresenta uma região TATA-box aparente mas é rica em guanina e citosina, além de apresentar vários sítios de iniciação da transcrição. A união diferencial dos éxons não codificantes 1B e 1C resulta em três isoformas de RNAm (*splicing* alternativo) cujas funções permanecem indefinidas. Além disso, há múltiplos locais de iniciação da transcrição e tradução. O VDR pode ser regulado tanto a nível transcricional quanto a nível pós-transcricional (MIYAMOTO *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos da VD são mediados pelo VDR. A forma ativa da vitamina D, a 1,25 hidroxivitamina D, liga-se às proteínas transportadoras de VD do sangue, atravessa a membrana celular e liga-se ao VDR. O complexo formado então se liga ao receptor do ácido retinóico (RXR) formando heterodímeros que atuam nos elementos resposta da vitamina D (VDREs), iniciando assim, uma cascata de interações moleculares que irão modular a transcrição de genes específicos (KIMBALL; FULEIHAN; VIETH, 2008).

Os SNPs do gene VDR têm sido identificados e investigados quanto à sua relação com fenótipos de interesse médico. Em específico o BsmI (rs1544410) tem sido relatado como estando envolvido no DM2 e RD (VEDRALOVÁ *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; FERRAREZI *et al.*, 2013). O alelo "b" do polimorfismo BsmI foi associado a níveis mais baixos de HDL e aumento do risco de DM2 e obesidade em árabes (AL-DAGHRI *et al.*, 2014), a ocorrência de RD na população croata com DM1 (BUĆAN *et al.*, 2009) e o genótipo bb conferiu maior resistência à insulina em caucasianos (OH; BARRETT-CONNOR, 2002). Como resultado de uma meta-análise, na análise de subgrupo o genótipo Bb (rs1544410) esteve associado a DM1, no entanto, esse dado reflete o resultado de apenas um estudo com população iraniana (KHODAEIAN *et al.*, 2015).

Apesar das evidências apresentadas, existem poucos estudos originais explorando a associação do rs1544410 e RD (OH; BARRETT-CONNOR, 2002; CYGANNEK *et al.*, 2006; BUĆAN *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2015; EZHILARASI; DHAMODHARAN; VIJAY, 2018). Nestes estudos, foi encontrada uma associação do alelo B com menor risco de RD em DM2 (HONG *et al.*, 2015) e dois estudos encontraram associação entre RD e o genótipo bb em DM1 (BUĆAN *et al.*, 2009) e DM2 (EZHILARASI; DHAMODHARAN; VIJAY, 2018), enquanto

outro estudo não encontrou associações genótípicas ou alélicas (CYGANNEK *et al.*, 2006), e ainda o estudo de Zhong e colaboradores (2015) que incluiu 94 pacientes com RD, não foram encontradas associações genótípicas ou alélicas entre pacientes nefropatia ou RD, em dois polimorfismos (rs1544410 e rs7975232) do gene *VDR*, mas, houve uma associação entre o alelo T ( *VDR* rs2228570) com a duração do diabetes, PAS e HbA1c com risco aumentado de RD em indivíduos de etnia Hãn (ZHONG *et al.*, 2015).

Meta-análises (ZHANG *et al.*, 2016; JIAO *et al.*, 2018) apontam para a ausência de associação entre rs1544410 e RD tanto em DM1 quanto em DM2, em chineses, caucasianos e asiáticos. No entanto, a meta-análise realizada por Song *et al.*, (2019) indica uma associação restrita à população indiana sob os modelos aditivo ( $p = 0,014$ ), alélico ( $p = 0,033$ ) e dominante ( $p < 0,001$ ), mas que é resultado de um único estudo (EZHILARASI; DHAMODHARAN; VIJAY, 2018).

Em população japonesa com DM1 o polimorfismo BsmI (*VDR*) apresentou frequência significativamente maior do alelo B, em comparação a um grupo saudável. Além disso, o grupo de pacientes com DM1 de início agudo tinham uma frequência maior do alelo B do que os controles, o que não ocorreu nos diabéticos do tipo 1 de início lento (MOTOHASHI *et al.*, 2003). Em uma coorte conduzida com 360 brasileiros com média de idade entre 12 e 17 anos, a frequência de homozigose e heterozigose para o polimorfismo BsmI foi menor no grupo DM1 do que no grupo controle saudável (MORY *et al.*, 2009).

Outro polimorfismo em *VDR* (rs739837) também foi investigado no contexto de DM2. A junção de oito estudos com chineses e um com britânicos, revelou que o alelo T e os genótipos TT+TG (*VDR* rs739837) estiveram associados ao aumento no risco tanto de DM2 quanto de DMG (ZENG *et al.*, 2022), e em população iraniana pareada por sexo e idade, o grupo com indivíduos saudáveis apresentou um número diminuído de genótipo TT (TaqI rs739837) quando comparado ao grupo com DM2. Os autores sugerem que polimorfismos em *VDR* podem estar associados a DM2 (NOSRATABADI; ARABABADI; SALEHABAD, 2011).

Em franceses com DM1 (dependentes de insulina), foi encontrada uma associação entre o genótipo TT (*VDR*- TaqI) e o baixo risco de RD grave, especialmente em pacientes com longa duração de DM; em contrapartida o genótipo Tt conferiu um alto risco de RD proliferativa em indivíduos com controle glicêmico deficiente (TAVERNA *et al.*, 2002). Outro poliformismo em *VDR* (rs10735810) foi investigado em uma coorte conduzida com 429 indivíduos italianos, e foi observada uma associação de DM1 com o genótipo ff (homozigoto), mas não com complicações microvasculares do DM (CAPOLUONGO *et al.*, 2006). Mais informações sobre

os estudos com polimorfismos do gene *VDR* no contexto de DM e RD estão compilados no Apêndice E.

**Figura 7-** Estrutura do gene *VDR* e localização do rs1544410

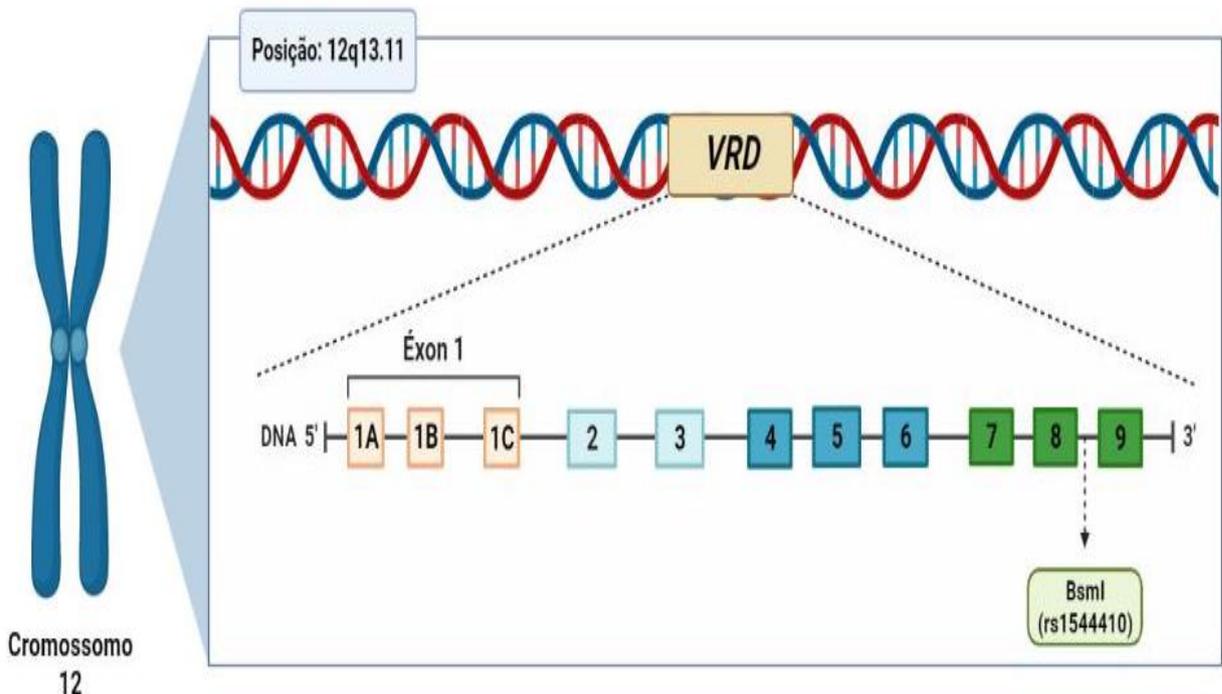


Figura 7 representando a estrutura do gene receptor de vitamina D (*VDR*) e localização do rs1544410. Fonte: Elaborada pela autora com informações de KOHAMA *et al.*, 2000; MOHAMMADI *et al.*, 2020. Criado com (BioRender.com).

### 3.6 ADIPONECTINA

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos, essencialmente secretada pelo tecido adiposo (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996) mas cujo RNA mensageiro também já foi detectado em outros tecidos humanos e animais (ACHARI; JAIN, 2017). Concentrações séricas diminuídas de adiponectina estão presentes na obesidade (ARITA *et al.*, 1999) e níveis elevados em condições de melhor sensibilidade à insulina (HOTTA *et al.*, 2000). Trata-se de uma molécula relativamente abundante na circulação apresentando concentrações na faixa de 2–20 µg/mL, e nas mulheres os níveis circulantes são entre 30 – 50% maiores do que nos homens (TURER; SCHERER, 2012).

A adiponectina é quase única entre as adipocinas porque seus níveis sistêmicos diminuem na obesidade, enquanto a maioria das outras adipocinas (em particular as adipocinas pró-inflamatórias) são liberadas em maiores quantidades com o tamanho da célula como um

importante determinante do equilíbrio entre a secreção de adipocinas pró e anti-inflamatórias (SKURK *et al.*, 2007; TURER; SCHERER, 2012) (Figura 8).

Uma meta-análise englobando uma série de estudos prospectivos, relatou que altas concentrações de adiponectina circulante estiveram associadas a um baixo risco de DM2. O risco relativo agrupado por incremento de 1 log  $\mu\text{g/mL}$  na adiponectina circulante foi de 0,72 [(IC) de 95% 0,67–0,78] com base em 14.598 participantes de 13 estudos, incluindo 2.623 casos incidentes (LI *et al.*, 2009). Em outra meta-análise de vinte oito estudos com 6.148 indivíduos, revelou que a adiponectina elevada foi associada à retinopatia e níveis mais elevados de leptina e adiponectina foram associados com macro e microalbuminúria e neuropatia (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

Nesse mesmo contexto um grupo de pesquisadores realizou um estudo de caso controle e em seguida uma meta-análise para avaliar a associação de adiponectina com DM2 em população chinesa. Os resultados revelaram que no estudo de caso-controle foi encontrada uma forte associação dose-dependente entre níveis plasmáticos mais altos de adiponectina [6,7  $\mu\text{g/mL}$  (5,2–8,3)] e menor risco de DM2, que parecia ser independente de fatores de risco estabelecidos para DM2 (lipídios, PCR-Us, glicose aleatória e insulina). Na meta-análise incluindo o estudo caso-controle realizado pelos próprios autores, os participantes no tercil mais alto de adiponectina tiveram quase metade do risco de desenvolver DM2 em comparação com aqueles no tercil mais baixo, e a associação adiponectina-DM2 pareceu ser linear (WANG *et al.*, 2018).

Uma revisão robusta que investigou estudos sobre adipocinas pró-inflamatórias, sugeriu que a adiponectina representa o único mediador imunológico que exerce uma associação inversa com risco de DM2 ao apresentar concentrações circulantes diminuídas em indivíduos que desenvolveram DM2 em comparação com controles que permanecerão sem diabetes. No entanto, o mesmo estudo sugere a necessidade de um olhar mais atento aos estudos sobre as concentrações de adiponectina na circulação e revela que sua regulação em humanos não é completamente compreendida e que a causalidade entre hipoadiponectinemia e DM2 incidente ainda deve ser melhor esclarecida (HERDER; CARSTENSEN; OUWENS, 2013).

Foi demonstrado que a adiponectina desempenha um papel protetor na prevenção de distúrbios macrovasculares e tem recebido atenção considerável devido ao seu envolvimento em doenças cardiovasculares (GOLDSTEIN *et al.*, 2004); no entanto, o papel da adiponectina no desenvolvimento da RD é desconhecido. Acredita-se que as vias de disfunção endotelial desempenhem um papel importante na patogênese da RD (VAN HECKE *et al.*, 2004), e

dados *in vitro* mostraram que a adiponectina é uma proteína secretora específica de adipócitos que modula as funções das células endoteliais (OKAMOTO *et al.*, 2000; OUCHI *et al.*, 2000).

**Figura 8-** Funções da adiponectina

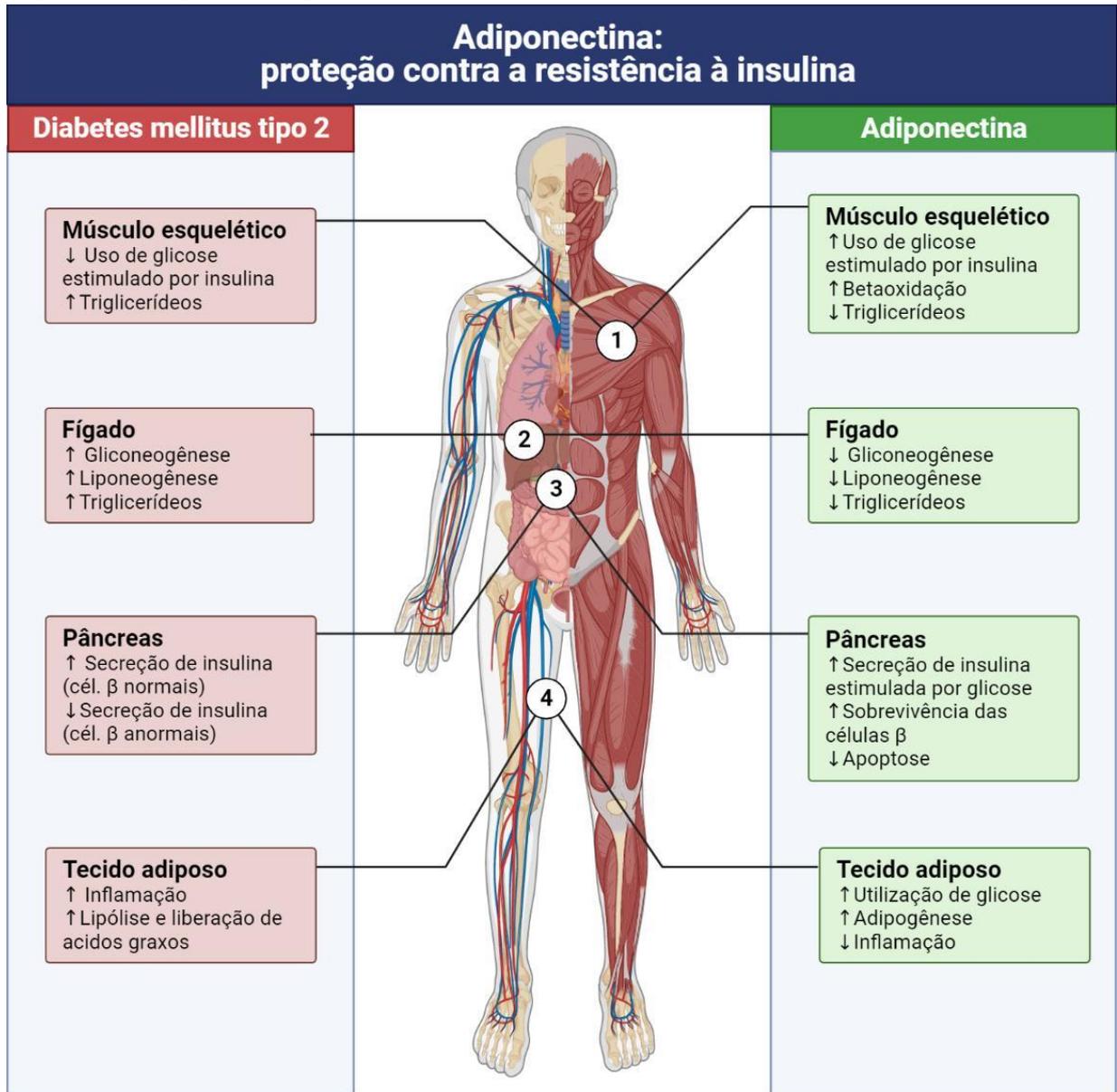


Figura 8 com as funções da adiponectina; ↑ Setas para cima indicam aumento; ↓ seta para baixo indicam diminuição. Fonte: Elaborada pela autora com informações de RUAN; DONG, 2016. Criado com (BioRender.com).

A interação gene-ambiente vem sendo explorada no contexto de DM e suas complicações e um locus de suscetibilidade para síndrome metabólica e diabetes foi previamente mapeado no cromossomo humano 3q27 (VIONNET *et al.*, 2000), onde está localizado o gene da adiponectina (KISSEBAH *et al.*, 2000; YAMAUCHI *et al.*, 2001) (Figura 9). Uma meta-análise que identificou 213 genes candidatos para DM2, destacou a adiponectina

(*ADIPOQ*) como tendo uma forte relação com DM2 (RASCHE; AL-HASANI; HERWIG, 2008). As concentrações plasmáticas de adiponectina parecem ser influenciadas por variações genéticas e isso ficou demonstrado num estudo iraniano que mostrou menores níveis plasmáticos em portadores dos genótipo GC + GG tanto em indivíduos saudáveis quanto portadores de DM2 (ALIMI *et al.*, 2021).

**Figura 9-** Estrutura do gene *ADIPOQ* e localização do rs266729

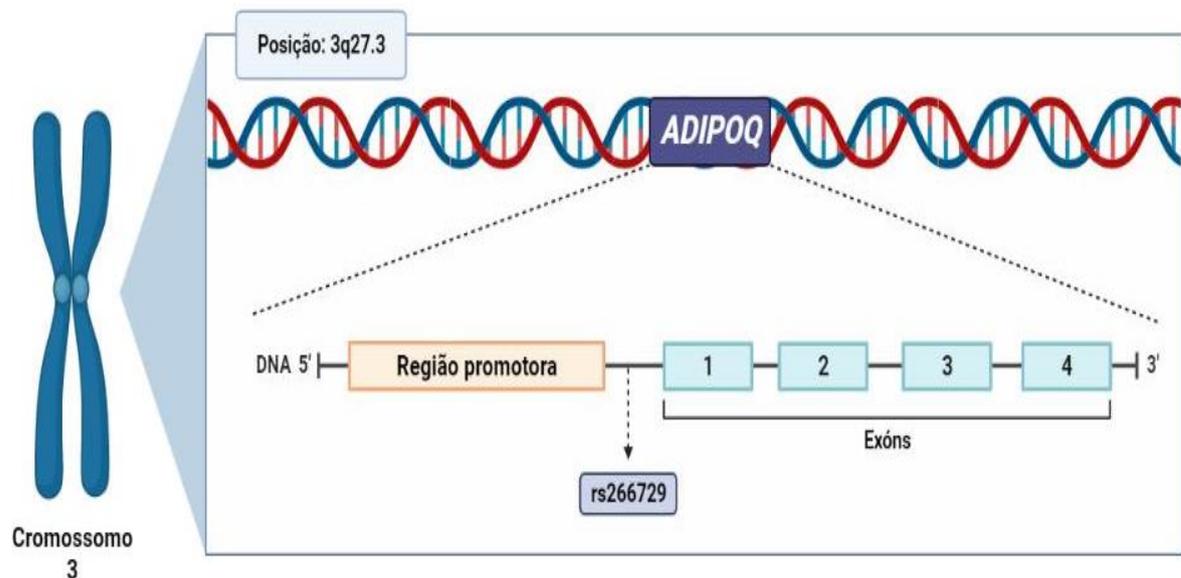


Figura 9 com a estrutura do gene *ADIPOQ* e localização do rs266729. Fonte: Elaborada pela autora com informações de ZHA; WU; GAO, 2017. Criado com (BioRender.com).

A menção de haver um locus de suscetibilidade para síndrome metabólica e diabetes (VIONNET *et al.*, 2000) onde está localizado o gene da adiponectina (KISSEBAH *et al.*, 2000; YAMAUCHI *et al.*, 2001) foi sendo evidenciada em estudos ao longo dos anos. Em um deles que se tratou de uma meta-análise incluindo 53 estudos totalizando 41.795 indivíduos entre casos e controles, relatou uma associação entre o polimorfismo rs2241766 do gene *ADIPOQ* e o DM2 em populações do Oeste e do sul da Ásia nos modelos de genes dominantes, heterozigotos e homozigotos; no mesmo estudo a presença do alelo T aumentou a incidência de DM2 na população da Ásia Ocidental, mas foi tido como alelo protetor para população do sul da Ásia (DONG *et al.*, 2020). Em outra meta-análise, desta vez com 35.355 indivíduos europeus brancos, afro-americanos e asiáticos orientais identificou evidências de associação para 10 novos loci (incluindo *ADIPOQ*) com concentrações de adiponectina, no entanto, não foram explicitadas quais seriam essas concentrações. No mesmo estudo uma variante comum (rs601339, alelo G) a jusante do gene *GPR109A* (o suposto receptor de niacina) foi associada à

adiponectina na análise lipídica global, e em análises realizadas por subgrupos étnicos foram encontradas associações no locus *ADIPOQ* com populações afro-americanas e populações do leste Asiático (DASTANI *et al.*, 2012).

Um estudo transversal de base populacional realizado em pacientes com DM2, identificou interação entre o genótipo GG (rs266729) e a terapia com insulina com aumento de risco de RD (OR 2,53, 95% CI 1.91–3.31) (LI *et al.*, 2014). Uma meta-análise incluindo 7 estudos (envolvendo asiáticos, europeus, africanos e americanos), mostrou que o alelo G (rs266729) foi um fator de risco para DM2 e pessoas com o alelo G (rs266729) tinham 1,13 vezes mais risco de desenvolver DM2 em comparação com aquelas sem o alelo G (SUN *et al.*, 2017).

Efeitos semelhantes podem ser hipotetizados para variantes genéticas nos receptores que medeiam as ações da adiponectina nos tecidos periféricos. Duas dessas moléculas receptoras já foram identificadas e são denominadas Receptor de Adiponectina 1 (*ADIPOR1*) e Receptor de Adiponectina 2 (*ADIPOR2*). São proteínas de sete domínios transmembranares pertencentes a uma nova classe de moléculas com similaridade com proteínas que funcionam como receptores de progesterona (família de receptores de progesterona/adiponectina/*ADIPOQ*) (YAMAUCHI *et al.*, 2003).

Alguns achados verificaram que polimorfismos nos genes receptores *ADIPOR1* e *ADIPOR2* estiveram associados a traços de resistência à insulina e intolerância à glicose (WANG *et al.*, 2004; HARA *et al.*, 2005). Um estudo prospectivo afirmou que concentrações mais baixas de adiponectina estão associados a uma maior incidência de diabetes e se correlacionam com a resistência à insulina e o desenvolvimento de DM2, e que a obesidade diminui não apenas os níveis plasmáticos de adiponectina, mas também a expressão de *ADIPOR1/R2*, reduzindo assim a sinalização da adiponectina e levando à resistência à insulina (KADOWAKI *et al.*, 2006). Uma revisão ampla que reuniu estudos clínicos e em modelos animais de diabetes/obesidade demonstrou que concentrações mais baixas de adiponectina e expressão de *ADIPOR1/R2* estiveram associados a uma maior incidência de DM2 (ZHA; WU; PING, 2017).

Estudos em modelo animal mostraram que o *ADIPOR1* foi associado ao aumento sensibilidade à insulina e diminuição de tolerância à glicose e gasto de energia (BJURSELL *et al.*, 2007), e que houve uma diminuição significativa na concentração de adiponectina circulante associada a diminuição na expressão de *ADIPOR1/ADIPOR2* no músculo e nos tecidos adiposos de camundongos ob/ob resistentes à insulina, o que pode estar relacionado à resistência à insulina e metabolismo lipídico disfuncional (TSUCHIDA *et al.*, 2004). Esses

eventos foram acompanhados pela diminuição da ativação da via de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que diminui ainda mais a expressão de *ADIPOR*, o que resulta no aumento na síntese de ácidos graxos que contribuem para a progressão do DM2 (HANDA *et al.*, 2014).

Outros achados revelaram que a adiponectina regulou positivamente o receptor *ADIPOR1* em células musculares esqueléticas primárias diferenciadas de indivíduos com peso normal, mas não em diabéticos, obesos ou com perda de peso (MCAINCH *et al.*, 2006), além disso foram encontradas associações entre variações genéticas em *ADIPOR1* com triglicerídeos séricos elevados e DM2 em população latino-americana mista (MORA-GARCÍA *et al.*, 2017).

O rs7539542 é um SNP localizado na região codificadora do gene *ADIPOR1* (Figura 10), que já foi mencionado pro estar associado a doença arterial coronariana em pacientes não diabéticos (LI *et al.*, 2016) e também em pacientes DM2 (SOCCIO *et al.*, 2006). Também apresentou associação com insulina e glicemia de jejum mais elevadas em portadores do genótipo CC no Estudo Finlandês de Prevenção de Diabetes em indivíduos com intolerância à glicose (SIITONEN *et al.*, 2006), mostrando uma conexão com o controle glicêmico. Somado a isso, em população mexicana, o alelo G foi associado com maior soma de dobras cutâneas, índice de massa corporal e circunferência da cintura (RICHARDSON *et al.*, 2006). Não há nenhum estudo publicado explorando o rs7539542 e o desfecho RD em qualquer de suas dimensões.

**Figura 10-** Estrutura do gene *ADIPOR1* e localização do rs7539542

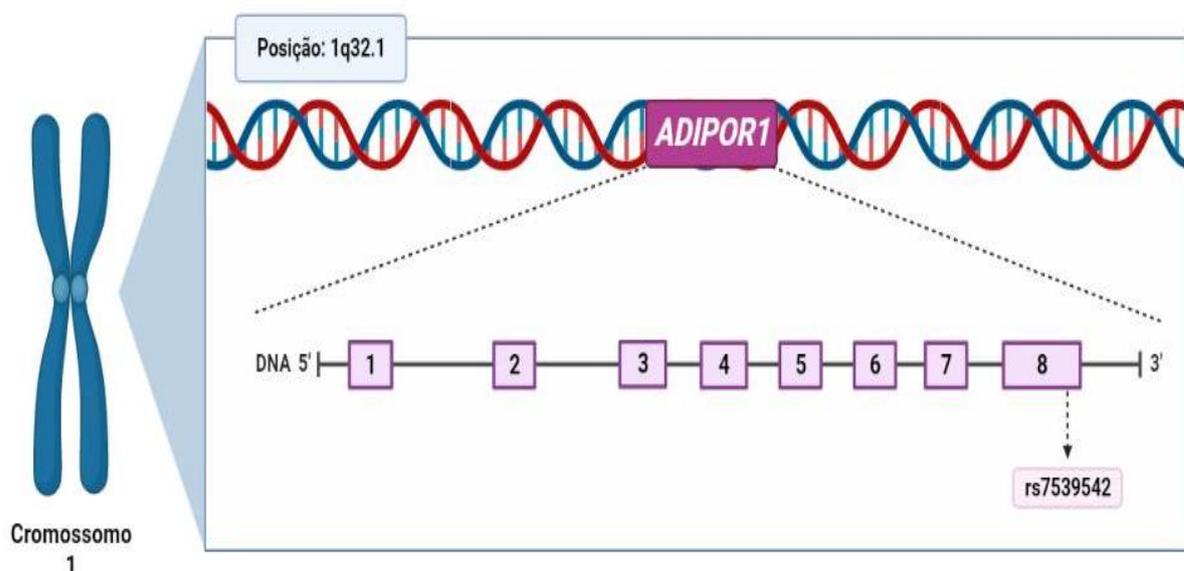


Figura 10 representando a estrutura do gene receptor 1 de adiponectina (*ADIPOR1*) e localização do rs7539542. Fonte: Elaborada pela autora com informações de RICHARDSON *et al.*, 2006. Criado com (BioRender.com).

Outros polimorfismos no gene receptor de adiponectina (*ADIPOQ*) também já foram investigados. Um grupo de pesquisadores realizou um estudo de caso-controle seguido por meta-análise em população chinesa Han. Os dados do ensaio de caso-controle evidenciaram que parâmetros antropométricos (IMC e circunferência da cintura) estiveram significativamente maiores em pacientes com DM2 do que em indivíduos controle sem DM, no entanto, não encontraram associação do SNP+276 (G>T (rs1501299)) com nenhum desfecho clínico. Em seguida, os mesmos pesquisadores realizaram uma meta-análise incluindo seu próprio estudo de caso-controle e demonstraram que o alelo G SNP+45 (rs2241766 T>G) pode ser um alelo de suscetibilidade para DM2 em população Chinesa Han, porém, mesmo sendo de uma mesma etnia, os resultados apresentaram certa heterogeneidade (LI *et al.*, 2011).

Em uma meta-análise de 44 estudos com 9.786 indivíduos com caucasianos e asiáticos, revelou que o alelo G de *ADIPOQ* SNP+45 T>G (rs16861194) se revelou como fator predisponente para DM2 na população asiática, mas não para população caucasiana (FAN *et al.*, 2014). Mais informações sobre os estudos com adiponectina e suas variantes *ADIPOQ* e *ADIPOR1* no contexto de DM e RD estão compilados no Apêndice F.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo epidemiológico do tipo transversal, caracterizado por observação direta de determinado fator e efeito em uma população em uma única oportunidade (ESTRELA, 2018), com abordagem caso-controle, vinculado a um projeto maior, intitulado ‘Epigenética + genética: identificação de marcadores para Retinopatia Diabética’. O início da coleta de dados ocorreu em outubro de 2019 e terminou em meados de setembro de 2022. Foram incluídos pacientes portadores de DM2 atendidos nos serviços de Endocrinologia e Oftalmologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB).

A amostra foi constituída de 360 indivíduos recrutados no ambulatório de Endocrinologia e na Unidade da Visão do HULW/UFPB. Foram incluídos pacientes com DM2 de ambos os sexos, com no mínimo 5 anos de diagnóstico da doença. Os indivíduos foram examinados quanto à presença de RD o que permitiu a separação em dois grupos: sem RD (n=139) e com RD (n=221). De acordo com as características das lesões identificadas na retina, os pacientes RD foram subdivididos em Retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) (n=144) e Retinopatia diabética proliferativa (RDP) (n=77). Foram excluídos do estudo indivíduos que desistiram de realizar etapas da coleta de dados ou com DNA insuficiente ou insatisfatório para análises moleculares.

### 4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (parecer: 3.053.068) (Anexo A) e todos os procedimentos seguiram os padrões éticos da instituição e estiveram em cumprimento com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Todos os participantes envolvidos no estudo foram previamente esclarecidos quanto aos propósitos e procedimentos expressaram anuência assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice C).

#### 4.2.1 Avaliação de Riscos e Benefícios

Quanto aos riscos, a coleta de sangue pode trazer um leve desconforto que de forma geral não levou a maiores consequências. No caso de aparecimento de hematomas em função do procedimento de coleta, o paciente recebeu orientações de aplicação de compressas e

medicamentos tópicos para alívio do desconforto. Quanto aos benefícios, os dados gerados a partir dessas coletas podem contribuir para a possibilidade de identificação de importantes marcadores dos estágios de RD e podem refinar dados importantes para o Sistema Único de Saúde e seus usuários.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

Todos os participantes da pesquisa apresentavam DM2 e eram usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) em atendimento no HULW nos ambulatórios de Endocrinologia e na Unidade da Visão. Os pacientes abordados realizaram consulta oftalmológica pré-agendada.

Para análise da retina foram empregados biomicroscopia de fundo de olho e oftalmoscopia binocular indireta. Para isso, foram utilizados colírio de tropicamida 1% (midriático) e colírio anestésico. Os exames de classificação foram realizados por duas médicas oftalmologistas parceiras do projeto.

Para a classificação da RD, foi utilizada a Escala Clínica Internacional de Gravidade da RD (*International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale*). Tal escala representa 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 (dentre eles, o do ETDRS) (WILKINSON *et al.*, 2003). Foi desenvolvida em reconhecimento à necessidade de uma classificação clínica que refletisse a ameaça à visão determinada pela RD. A escala descreve três estágios de retinopatia não proliferativa de baixo risco, 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 elsewhere* neovascularização em qualquer outra região do fundus) (WILKINSON *et al.*,2003).

Informações sobre características socioeconômicas, demográficas e epidemiológicas, hábitos de vida e aferição de medidas antropométricas e de pressão arterial, foram obtidas no momento da avaliação clínica no setor de oftalmologia (APÊNDICE D).

#### 4.4 ANÁLISE DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

As coletas sanguíneas ocorreram em laboratório terceirizado, em dias acordados com o paciente. Todas as amostras foram codificadas a fim de resguardar o direito à privacidade dos participantes. O sangue foi coletado por meio de punção venosa realizada em jejum de 12 horas. A centrifugação (3.200rpm durante 10 minutos) foi utilizada para obtenção de plasma e soro e ocorreram em tempo inferior à 2 horas após a coleta. Alíquotas de soro e plasma foram armazenadas sob -80°C no Hemocentro da Paraíba, para análises posteriores (Figura 11).

Uma quantidade de 6 µL do sangue total foi utilizada para determinação da HbA1c. Para tanto foi utilizada a técnica imunoensaio turbidimétrico de inibição (Tina-quant® HbA1c) em analisador automatizado (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO /Brasil), com kit padronizado e seguindo as orientações recomendadas pelo fabricante (Tina-quant® HbA1c – Roche).

Uma alíquota do soro (250 µL) foi usada para determinação de glicose plasmática (método enzimático-colorimétrico) em analisador automatizado (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO /Brasil), utilizando kit comercial (Gold Analisa Diagnóstico Ltda, Belo Horizonte, MG). Em outra alíquota de soro (780 µL), foram feitas dosagens de creatinina sérica (método cinético-colorimétrico), proteína C reativa (PCR) (método por turbidimetria), HDL (método enzimático-colorimétrico direto), colesterol total (método enzimático- colorimétrico) e triglicerídeos (método enzimático- colorimétrico Trinder) em analisador automatizado (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO /Brasil)

utilizando kits comerciais de acordo com as orientações recomendadas pelo fabricante (Gold Analisa Diagnóstico Ltda, Belo Horizonte, MG). A concentração de colesterol LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald onde:  $[LDL] = [colesterol\ total] - [HDL] - [triglicerídios/5]$ .

**Figura 11-** Desenho do estudo

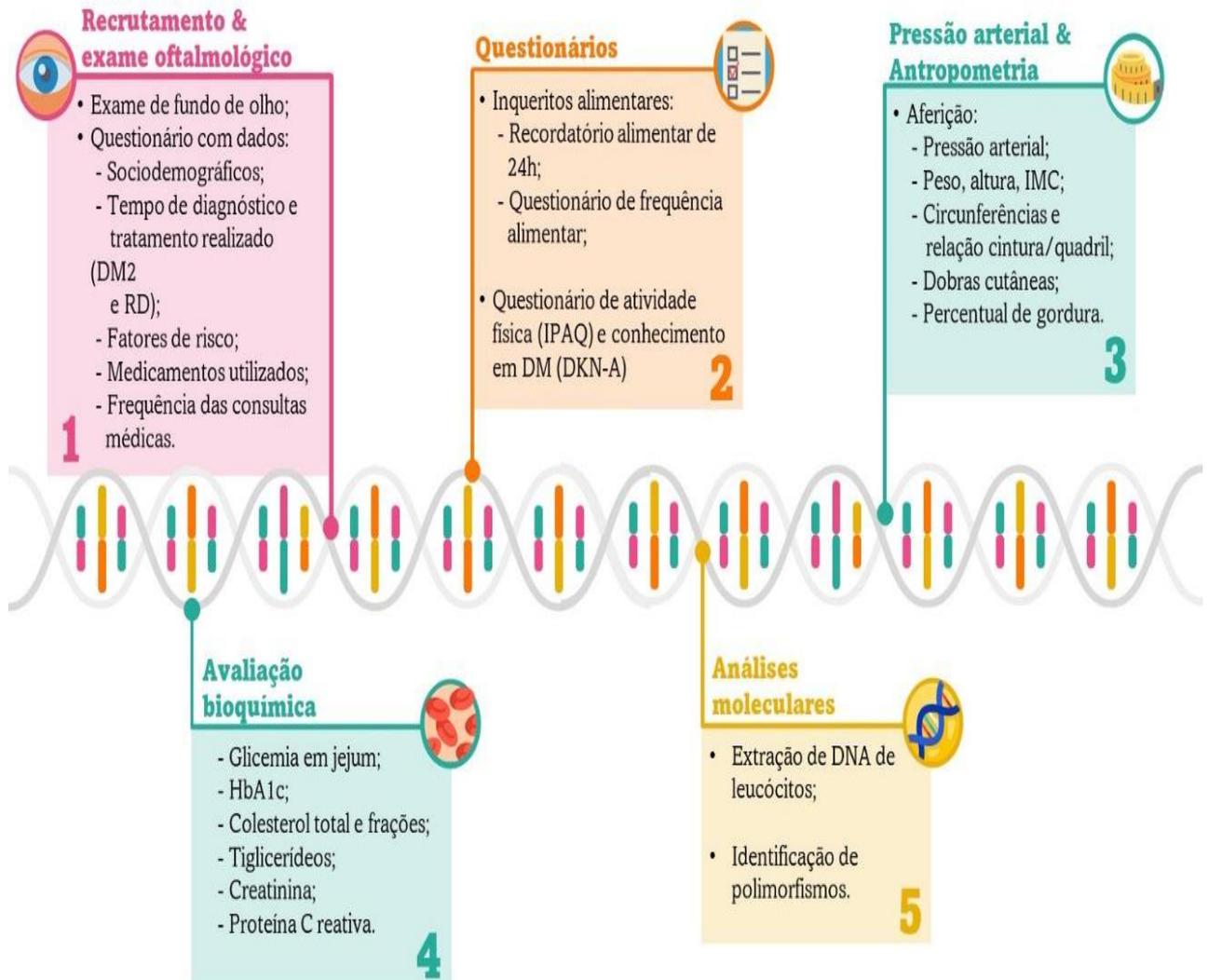


Figura 11 representando o desenho do estudo com todas as fases da coleta de dados. Fonte: elaborada pela autora com dados da pesquisa. Criada com (PowerPoint).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS

As amostras de sangue total foram coletadas na presença de EDTA, armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e foram utilizadas posteriormente para extração do DNA proveniente de leucócitos utilizando kits comerciais (DNeasy® Blood & Tissue Handbook – QIAGEN®). As amostras de DNA foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as análises moleculares.

Os genótipos foram determinados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (ou PCR do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”), gerando fragmentos de DNA contendo o polimorfismo de interesse, para posterior digestão com enzima de restrição capaz de discriminar os genótipos envolvidos em cada caso. Trata-se da técnica de Polimorfismo dos Tamanhos dos Fragmentos de Restrição cujo nome deriva do Inglês “*Restriction Fragments Length Polymorphism*” (RFLP). Os iniciadores (*primers*) empregados nas reações de PCR, as temperaturas de anelamento de cada reação e a enzima utilizada para discriminar cada genótipo estão descritos na Tabela 1, assim como os tamanhos de fragmentos esperados no processo de digestão. Todas as reações foram conduzidas em termociclador convencional, utilizando mix de PCR 2x da marca Thermo® em volume final de reação de 25 uL. Para isso, foram preparadas soluções contendo 12,5 uL de mix de PCR 2x, 1 uL de cada um dos iniciadores na concentração de 10pmol/uL, 1uL de DNA purificado e água ultrapura estéril para completar o volume de 25 uL em tubos de plástico com tampa de volume de 0,2 uL. Os tubos foram acondicionados em termociclador, cumprindo ciclos de temperatura de desnaturação, anelamento e extensão específicas para cada gene. Para a digestão, foram utilizados 3 uL do produto amplificado para cada unidade de enzima de restrição, utilizando a temperatura de digestão indicada pelo fabricante. A incubação deu-se em banho maria ou banho seco. A interpretação dos genótipos encontrados a partir da análise por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida encontra-se documentada na figura 12.

**Tabela 1-** Parâmetros para análises dos Polimorfismos dos genes *VDR*, *ADIPOQ* e *ADIPOR1*

| Polimorfismo                  | Primers<br>(5' - 3')   | Anelamento<br>(°C) | Enzima<br>de<br>digestão | Produto (pb)                                | Referência                   |
|-------------------------------|--|--------------------|--------------------------|---|------------------------------|
| <i>BsmI</i><br>(rs1444410)    | F: CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA<br>R: AACCAGCGGGAAGTCAAGGG | 58°C               | <i>BsmI</i>              | BB: 825<br>Bb: 825, 650, 175<br>bb: 650,175 | PANI <i>et al.</i> ,<br>2000 |
| <i>ADIPOQ</i><br>(rs266729)   | F: CATCAGAATGTGTGGCTTGC<br>R: AGAAGCAGCCTGGAGAACTG           | 65°C               | <i>HhaI</i>              | CC: 163<br>CG: 163, 121, 42<br>GG:121,42    | PRIOR <i>et al.</i> , 2009   |
| <i>ADIPOR1</i><br>(rs7539542) | F: GCACCCAGCCCTGAGAATCT;<br>R: CCGGCTAATCATGGAAGTGTGT        | 65°C               | <i>BsmAI</i>             | GC: 542, 349,<br>193<br>CC: 349, 193        | JIN <i>et al.</i> ,<br>2014  |

*VDR*: gene receptor da vitamina D; *ADIPOQ*: gene no promotor de adiponectina; *ADIPOR1*: gene no receptor 1 de adiponectina; F: iniciador 5' forward; R: iniciador 3'reverse; Pb: pares de base.

**Figura 12-** Eletroforeses demonstrativas dos perfis adotados para obtenção dos genótipos de *VDR BsmI* (rs1444410), *ADIPOQ* (rs266729) e *ADIPOR1* (rs7539542)

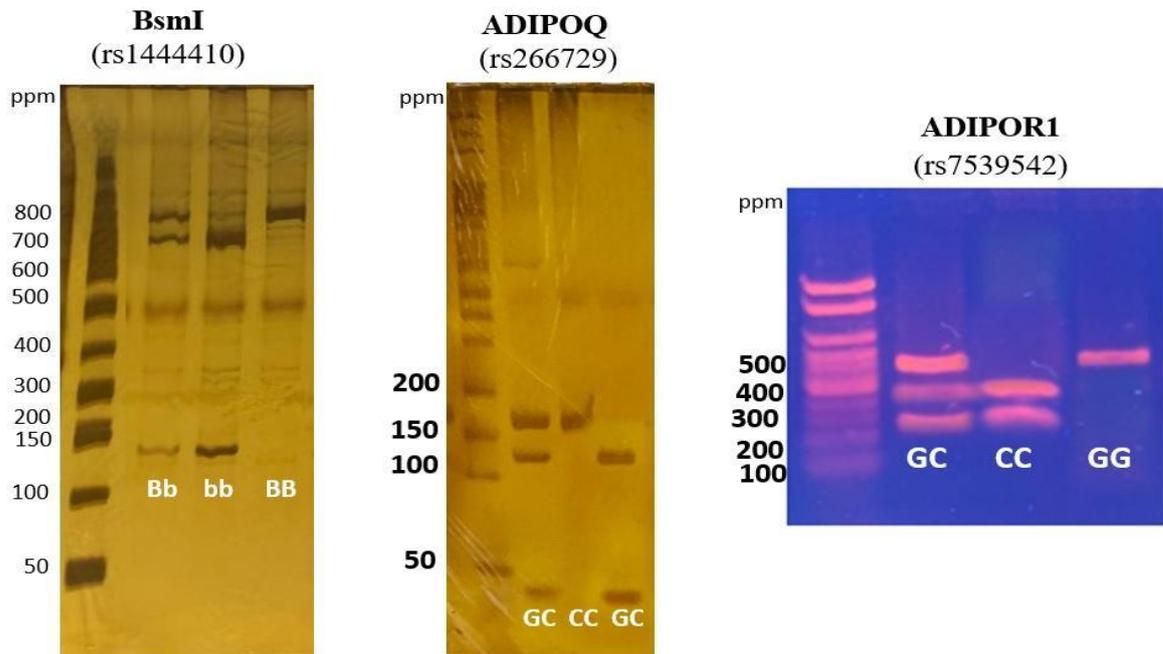


Figura 12 com as eletroforeses demonstrativas dos perfis adotados para obtenção dos genótipos de *VDR BsmI* (rs1444410), *ADIPOQ* (rs266729) e *ADIPOR1* (rs7539542); ppm: padrão de peso molécula; *VDR BsmI*: gel de poliacrilamida a 15%, corrida a 100 volts por 2h, (foram aplicados 5 uL de amostra digerida) corado com nitrato de prata. *ADIPOQ*: gel de poliacrilamida a 15%, corrida a 100 volts por 2h, (foram aplicados 5 uL de amostra digerida) corado com nitrato de prata. *ADIPOR1*: gel de Agarose a 1%, corrida a 60 volts por 50min (foram aplicados 5 uL de amostra digerida e 2 uL gel red) visualizado em transiluminador. Fonte: elaborada pela autora com dados da pesquisa.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E DO CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação nutricional dos indivíduos foi realizada por meio da coleta de peso, altura, circunferência da cintura (CC), circunferência do quadril (CQ), relação cintura quadril (RCQ), percentual de gordura e dobras cutâneas (bicipital, tricípital, subescapular e suprailíaca) (Apêndice D).

O peso foi aferido em uma balança digital com capacidade para 150kg e precisão de 100g de marca *oxer body-923*, colocada em um plano liso. O paciente foi orientado a subir com os pés descalços, roupas leves e sem nada nos bolsos, seu resultado foi dado em quilogramas (WHO, 1998). A altura foi aferida por um estadiômetro fixo na parede. O indivíduo ficou de costas para o instrumento, com os pés juntos e o calcanhar junto à parede, com o rosto na posição de 90° e o resultado foi coletado em metro (WHO, 1998).

As circunferências foram mensuradas com uma fita métrica inelástica marca Sanny® e os resultados foram expressos em centímetros. A posição do indivíduo para aferição da circunferência da cintura se deu com os pés levemente separados e a fita passando logo abaixo

da última costela flutuante. Para a circunferência do quadril, o paciente esteve com os pés juntos e a fita passou na parte mais proeminente do glúteo (WHO, 2000).

O percentual de gordura foi calculado utilizando o protocolo das 4 dobras cutâneas (tricipital, bicipital, suprailíaca, subescapular). As dobras foram aferidas utilizando adipômetro da marca Sanny® com resultado expresso em milímetros. A análise do percentual de gordura foi gerado pela equação de Durnin & Womersley (1974).

Com a coleta dos dados antropométricos foi determinado o diagnóstico do estado nutricional de cada pacientes pelo IMC (índice de massa corporal), que consiste no peso (kg) dividido por altura (m) ao quadrado, subdivididos em magreza, eutrofia, sobrepeso, obesidade grau I, II e III para adultos e magreza, eutrofia e excesso de peso para idosos, segundo WHO (1995), conforme descrito na Tabela 2. 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 0,94 para homens e 0,80 para mulheres (WHO, 2000).

**Tabela 2-** Classificação do Índice de massa corporal e Circunferência Abdominal

| <b>IMC – Adultos (20 a 59 anos)</b>      |                                |                 |
|--|--------------------------------|-----------------|
| <b>Valores Críticos</b>                  | <b>Diagnóstico Nutricional</b> |                 |
| <18,5 Kg/m <sup>2</sup>                  | Desnutrição                    |                 |
| ≥ 18,5 e <25 Kg/m <sup>2</sup>           | IMC adequado/ eutrofia         |                 |
| ≥ 18,5 e <30 Kg/m <sup>2</sup>           | Sobrepeso                      |                 |
| ≥ 30 Kg/m <sup>2</sup>                   | Obesidade                      |                 |
| <b>IMC – Idosos (a partir de 60anos)</b> |                                |                 |
| <22 Kg/m <sup>2</sup>                    | Baixo peso                     |                 |
| ≥ 22 e <27 Kg/m <sup>2</sup>             | IMC adequado/ eutrofia         |                 |
| ≥ 27 e <30 Kg/m <sup>2</sup>             | Excesso de peso                |                 |
| ≥ 30 Kg/m <sup>2</sup>                   | Obesidade                      |                 |
| <b>Circunferência abdominal (cm)</b>     |                                |                 |
| <b>Risco de complicações metabólicas</b> | <b>Homens</b>                  | <b>Mulheres</b> |
| Aumentado                                | ≥ 94                           | ≥ 80            |
| Aumentado substancialmente               | ≥ 102                          | ≥ 88            |

Fonte: WHO (2000); WHO (1998).

O inquérito alimentar foi realizado por meio de Recordatório alimentar de 24 horas (Anexo B), com informações sobre tamanho ou volume da porção ingerida, com auxílio de álbum de desenho de porções médias dos alimentos consumidos pela população adulta do município de João Pessoa (ASCIUTTI; RIVERA; COSTA, 2005; LIMA *et al.*, 2008). O recordatório foi realizado em triplicata sendo dois deles referentes à alimentação em dias da semana e um referente a um dia do final de semana, com intervalo de 15 dias entre eles. A quantificação do consumo foi realizada com o auxílio do aplicativo de informática Dietwin (versão 3.0) (REINSTEIN, 2006).

O nível de atividade física (NAF) dos pacientes foi quantificado por meio do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) em sua versão curta e validada nacionalmente (MATSUDO *et al.*, 2001), que estima o tempo semanal gasto em atividades físicas em diferentes intensidades. O instrumento foi aplicado individualmente por pesquisadores treinados. De acordo com recomendações recentes da OMS (2020), para ser classificado como ativo, são necessários pelo menos 150 minutos de atividade física moderada ou vigorosa por semana para adultos, incluindo aqueles que vivem com doenças crônicas (WHO, 2020). Os pacientes foram divididos em dois grupos (ativos e insuficientemente ativos), de acordo com a nomenclatura do IPAQ (Anexo C).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no *software* SPSS, versão 26. Variáveis com distribuição normal foram apresentadas como valores de média  $\pm$  desvio padrão, variáveis que não apresentaram distribuição normal foram expressas como valores medianos (mínimo e máximo) e as variáveis nominais expressas em números totais e porcentagem. A suposição de normalidade em variáveis contínuas foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e, para tanto, distribuições maiores que  $p > 0,05$  foram aceitas como variáveis com distribuição normal. As diferenças entre variáveis independentes normalmente distribuídas e contínuas foram avaliadas pelo teste t de amostras independentes e quando a análise contou com mais de dois grupos foi realizada por ANOVA; aquelas sem uma distribuição normal comparadas utilizando teste U de Mann-Whitney e quando a análise contou com mais de dois grupos foi realizada por kruskal wallis. Variáveis categóricas foram testadas por meio do qui-quadrado de Pearson ou pelo teste exato de fisher (quando os grupos foram compostos por quantidade igual ou inferior a cinco indivíduos), com dados expressos em valores totais e percentuais. Os equilíbrios de Hardy-Weinberg foram calculados para avaliar as frequências genotípicas e alélicas esperadas e observadas e testadas pelo qui-quadrado. Análises de regressão logística binária foram empregadas para avaliar a influência de variáveis categóricas sobre desfechos clínicos salutares para o estudo. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as análises.

## REFERÊNCIAS

- ACHARI, A.E.; JAIN, S.K. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1321, 2017.
- ADORINI, L.; PENNA, G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. **Nature clinical practice Rheumatology**, v. 4, n. 8, p. 404-412, 2008.
- AFARID, M.; GHATAVI, N.; JOHARI, M. Serum levels of vitamin D in diabetic patients with and without retinopathy. **Journal of ophthalmic & vision research**, v. 15, n. 2, p. 172, 2020.
- AFZAL, S.; BOJESEN, S.E.; NORDESTGAARD, B.G. Low 25-hydroxyvitamin D and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and meta analysis. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 2, p. 381-391, 2013.
- AGARDH, E.; *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in subjects with type 1 diabetes identifies epigenetic modifications associated with proliferative diabetic retinopathy. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.
- AGUIAR, C.; DUARTE, R.; CARVALHO, D. New approach to diabetes care: from blood glucose to cardiovascular disease. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 38, n. 1, p. 53-63, 2019.
- AIELLO, L.P. *et al.* Inhibition of PKC  $\beta$  by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 47, n. 1, p. 86-92, 2006.
- AKELLA, N.M.; CIRAKU, L.; REGINATO, M.J. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2019.
- AL-DAGHRI, N.M.; *et al.* Association of *VDR*-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. **Gene**, v. 542, n. 2, p. 129-133, 2014.
- AL SAFAR, H.; *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms among Emirati patients with type 2 *Diabetes Mellitus*. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 175, p. 119-124, 2018.
- ALBERGHINI, F.; *et al.* An epigenetic view of B-cell disorders. **Immunology and cell biology**, v. 93, n.3, p. 253-260, 2015.
- ALIMI, M.; GOODARZI, M.T.; NEKOEI, M. 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**, v. 20, p. 87-93, 2021.
- ALTMANN, C.; SCHMIDT, M.H.H. The role of microglia in diabetic retinopathy: inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 110, 2018.

ANSARY, T.M.; NAKANO, D.; NISHIYAMA, A. Diuretic effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and their influence on the renin-angiotensin system. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 629, 2019.

ANTCLIFF, R. J.; MARSHALL, J. The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. In: **Seminars in ophthalmology**. Taylor & Francis, 1999. p. 223-232.

FLAXEL, C.J.; *et al.* Diabetic retinopathy preferred practice pattern®. **Ophthalmology**, v. 127, n. 1, p. P66-P145, 2019.

ELSAYED, N.A.; *et al.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. **Diabetes Care**, v. 46, n. Supplement\_1, p. S19-S40, 2023.

ANDRUKHOVA, O.; *et al.* Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 53-64, 2014.

ARIMURA, E.; *et al.* Deteriorated glucose metabolism with a high-protein, low-carbohydrate diet in db mice, an animal model of type 2 diabetes, might be caused by insufficient insulin secretion. **European journal of nutrition**, v. 56, n. 1, p. 237-246, 2017.

ARIMURA, E.; *et al.* Effects of diets with different proportions of protein/carbohydrate on retinal manifestations in db mice. **in vivo**, v. 32, n. 2, p. 265-272, 2018.

ARITA, Y.; *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 257, n. 1, p. 79-83, 1999.

ARMSTRONG, C. JNC8 guidelines for the management of hypertension in adults. **American family physician**, v. 90, n. 7, p. 503-504, 2014.

ASADIPOOYA, K.; UY, E.M. Advanced glycation end products (AGEs), receptor for AGEs, diabetes, and bone: review of the literature. **Journal of the Endocrine Society**, v. 3, n. 10, p. 1799-1818, 2019.

ASCIUTTI, L.S.R. Manual de porções médias em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional. **João Pessoa: Editora da UFPB, 2005.**

ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. *Diabetes Mellitus* and the  $\beta$  cell: the last ten years. **Cell**. v. 148, n. 6, p. 1160-71, 2012.

AUGUSTIN, A.J.; *et al.* Correlation of blood-glucose control with oxidative metabolites in plasma and vitreous body of diabetic patients. **European journal of ophthalmology**, v. 12, n. 2, p. 94-101, 2002.

BAIN, S.; *et al.* Worsening of diabetic retinopathy with rapid improvement in systemic glucose control: a review. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 454-466, 2019.

BAKER, AR.; *et al.* Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 10, p. 3294-3298, 1988.

BARREIROS, R.C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C.E.P. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Revista de Nutrição**, v. 18, n.3, p. 377-389, 2005.

BARRIÈRE, D.A.; *et al.* Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2018.

BASILE, K.J.; *et al.* Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: follow-up of findings from genome-wide association studies. **International journal of endocrinology**, v. 2014, p.769671, 2014.

BEK, T. Diameter Changes of Retinal Vessels in Diabetic Retinopathy. **Current diabetes reports**, v.17, n.10, p. 1-7, 2017.

BISELLI, P.M.; *et al.* Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and concentrations of methylmalonic acid and folate on plasma homocysteine and risk of coronary artery disease. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 29, n. 1, p. 32-40, 2010.

BJEDOV, I.; PARTRIDGE, L. A longer and healthier life with TOR down-regulation: genetics and drugs. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 2, p. 460–5, 2011.

BJURSELL, M., *et al.* Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 583-593, 2007.

BLAKE, R.; TROUNCE, I.A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1840, n.4, p.1404-1412, 2014.

BOLOTSKAYA, L.L.; *et al.* A 20-year prospective follow-up study to evaluate the development of retinopathy and nephropathy after the onset of type 1 *Diabetes Mellitus*: Contribution of glycemic control and metabolic memory. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 89, n. 10, p. 17-21, 2017.

BOSCO, A.; GONÇALVES, E.R. *Diabetes Mellitus*: Prevenção e Tratamento da Retinopatia. **Programa Diretrizes: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia & Conselho Brasileiro de Oftalmologia**, 2004.

BRANDÃO-LIMA, P.N.; *et al.* Intakes of zinc, potassium, calcium, and magnesium of individuals with type 2 *Diabetes Mellitus* and the relationship with glycemic control. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1948, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.R.; 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.

BRASIL, Vigitel. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. **Brasília: Ministério da Saúde**, v. 160, 2017.

BRASIL, Vigitel. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito não telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco

e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico]/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2020. Disponível em:

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2019\\_vigilancia\\_fatores\\_risco.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf)  
ISBN 978-85-334-2765-5. Acesso em: 04 out. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: *Diabetes Mellitus*. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 36, 2013.

BUĆAN, K.; *et al.* Retinopathy and nephropathy in type 1 diabetic patients—association with polymorphisms of vitamin D-receptor, TNF, Neuro-D and IL-1 receptor 1 genes. **Collegium antropologicum**, v. 33, n.2, p. 99-105, 2009.

BUNCH, K.L.; *et al.* Novel Therapeutics for Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema: A Pathophysiologic Perspective. **Frontiers in Physiology**, p. 134, 2022.

CALDERON, G.D.; *et al.* Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment. **Eye**, v.31, n.8, p.1122-1130, 2017.

CASTAÑEDA, A.M. *et al.* Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i): renal implications. **International Urology and Nephrology**, v. 53, n. 2, p. 291-299, 2021.

CASTRO, L.C.O sistema endocrinológico vitamina D. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.55, n.8, p.566-575, 2011.

CAPOLUONGO, E.; *et al.* Slight association between type 1 diabetes and “ff” VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications. **Clinical biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 888-892, 2006.

CHAKRABARTI, R.; HARPER, C.A.; KEEFFE, J.E. Diabetic retinopathy management guidelines. **Expert review of ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 417-439, 2012.

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M.J. Type 2 diabetes. **The lancet**, v.389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017.

CHATZIRALLI, I.P. The role of glycemic control and variability in diabetic retinopathy. **Diabetes Therapy**, v. 9, n. 1, p. 431-434, 2018.

CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in *Diabetes Mellitus*: Distinct or continuum? **Indian Journal Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.4, p.546, 2016.

CHEHADEH, SWEH.; *et al.* Relationship between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and complications of type 2 *Diabetes Mellitus* in an Emirati population. **Meta gene**, v.9, p.70-75, 2016.

CHEN, J.; *et al.* Novel vitamin D analogs as potential therapeutics: metabolism, toxicity profiling, and antiproliferative activity. **Anticancer research**, v. 34, n. 5, p. 2153-2163, 2014.

CHEN, Y.H.; CHEN, H.S.; TARNG, D.C. More impact of microalbuminuria on retinopathy

than moderately reduced GFR among type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 35, n.4, p. 803-808, 2012.

CHENG, Z.; XIAOFENG-YANG, X.; WANG, H. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction, **Current Hypertension Review**, v. 5, n. 2, p.158–165, 2009.

CHEUNG, N.; MITCHELL, P.; WONG, T.Y. Diabetic retinopathy. **The Lancet**, v.376, p.124–136, 2010.

CHEW, E.Y; FERRIS I.I.I.F.L. Nonproliferative diabetic retinopathy. In: Ryan SJ, editor. **Retina**. 5th ed. St. Louis: Mosby; 2006. vol. II, cap. 67, seção 5. P. 1271-84.

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

CHRISTOU, G.A.; KIORTSIS, D.N. The role of adiponectin in renal physiology and development of albuminuria. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 2, p. R49-R61, 2014.

CHUA, J.; *et al.* The relationship of dietary fish intake to diabetic retinopathy and retinal vascular caliber in patients with type 2 diabetes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

COLMAN, R.J.; *et al.* Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v.5, n1, p. 1-5, 2014.

CONTRERAS-BOLÍVAR, V.; *et al.* Mechanisms involved in the relationship between vitamin D and insulin resistance: impact on clinical practice. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3491, 2021.

CORREA, Z.M.S.; EAGLE, J.R.R. Aspectos patológicos da retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, p. 410-414, 2005.

COOPER, M.E. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. S2, p. 16S-20S, 2004.

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.

CURTIS, T.M.; GARDINER, T.A.; STITT, A.W. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? **Eye**, London, v.23, n.7, p. 1496- 508, 2009.

CYGANEK, K.; *et al.* Clinical risk factors and the role of *VDR* gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. **Acta Diabetologica**, v.43, n.4, p. 114-119, 2006.

DALGÅRD, C.; *et al.* Vitamin D status in relation to glucose metabolism and type 2 diabetes in septuagenarians. **Diabetes Care**, v.34, n.6, p. 1284-1288, 2011.

DASTANI, Z.; *et al.* Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002607, 2012.

DATTA, S.; *et al.* The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non neovascular AMD. **Progress in retinal and eye research**, v.60, p.201-218, 2017.

DECKER, C.J.; PARKER, R. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, n.3, p. 386-92, 1995.

DEEPA, M.; ANJANA, R.M.; MOHAN, V. Role of lifestyle factors in the epidemic of diabetes: lessons learnt from India. **European journal of clinical nutrition**, v.71, n.7, p.825-831, 2017.

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.

DENG, R.; *et al.* Oxidative Stress Markers Induced by Hyperosmolarity in Primary Human Corneal Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v.29, n.5, p. e0126561, 2015.

DENZEL, M.S.; ANTEBI, A. Hexosamine pathway and (ER) protein quality control. **Current opinion in cell biology**, v.33, p. 14-18, 2015.

Di BELLO, P.M. *et al.* The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 471-485, 2010.

DI ROSA, M.; *et al.* Autophagy in diabetic retinopathy. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 8, p. 810-825, 2016.

dos SANTOS NUNES, M.K.; *et al.* Analysis of the DNA methylation profiles of miR - 9 - 3, miR - 34a , and miR - 137 promoters in patients with diabetic retinopathy and nephropathy. **Journal of Diabetic and its Complications**, v.32, n.6, p. 593-601, 2018.

dos SANTOS NUNES, M.K.; *et al.* Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.9, n.8, p.84, 2017.

DONG, Y.; *et al.* Meta-analysis of the association between adiponectin SNP 45, SNP 276, and type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0241078, 2020.

DOW, C.; *et al.* Diet and risk of diabetic retinopathy: a systematic review. **European journal of epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 141-156, 2018.

DUH, E.J.; SUN, J.K.; STITT, A.W. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. **JCI insight**, v. 2, n. 14, 2017.

DUNLOP, M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. **Kidney international**, v. 58, p. S3-S12, 2000.

DURNIN, J.V.G.A.; WOMERSLEY, J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 77-97, 1974.

DURRIN, L.K.; *et al.* Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1453, n. 3, p. 311-320, 1999.

EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP.; *et al.* Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics: ETDRS report number 7. **Ophthalmology**, v. 98, n. 5, p. 741-756, 1991.

EDITION, IDF Diabetes Atlas Tenth. International Diabetes Federation (IDF) Available online: [https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07.IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07.IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf) (acesso janeiro 2023).

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

ELLIS, E.A.; *et al.* Time course of NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in diabetic retinopathy in the BBZ/WOR rat. **Nitric oxide**, v. 6, n. 3, p. 295-304, 2002.

ESTRELA, C. **Metodologia científica: ciência, ensino, pesquisa**. Artes Médicas, 2018.

EZHILARASI, K.; DHAMODHARAN, U.; VIJAY, V. BSMI single nucleotide polymorphism in vitamin D receptor gene is associated with decreased circulatory levels of serum 25-hydroxyvitamin D among micro and macrovascular complications of type 2 *Diabetes Mellitus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 346-353, 2018.

FAN, Y.; *et al.* Association between ADIPOQ+ 45T> G polymorphism and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 704-723, 2014.

FEENER, E.P.; KING, G.L. Vascular dysfunction in *Diabetes Mellitus*. **Lancet**, suppl. 350, p. 9-13, 1997.

FERGUSON, L.R.; *et al.* Guide and position of the international society of nutrigenetics/nutrigenomics on personalised nutrition: part 1-fields of precision nutrition. **Lifestyle Genomics**, v. 9, n. 1, p. 12-27, 2016.

FERRAREZI, D.A.F.; *et al.* Allelic variations of the vitamin D receptor (*VDR*) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: the DIABHYCAR prospective study. **Diabetes & metabolism**, v. 39, n. 3, p. 263-270, 2013.

FERREIRA, F.N.; *et al.* Association study of sorbitol dehydrogenase- 888G> C polymorphism with type 2 diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians. **Experimental Eye Research**, v. 115, p. 140-143, 2013.

FIGUEROA-ROMERO, C.; SADIDI, M.; FELDMAN, E.L. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 9, n. 4, p. 301-314, 2008.

FISHMAN, S.L.; *et al.* The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without *Diabetes Mellitus*: a review. **Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2018.

FONTANA, L.; KLEIN, S.; HOLLOSZY, J.O. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. **AGE**, v. 32, n. 1, p. 97-108, 2010.

FRIEDMAN, G.; *et al.* A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate

reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 9, p. 1656-1661, 1999.

FRISO, S.; *et al.* One-carbon metabolism and epigenetics. **Molecular aspects of medicine**, v. 54, p. 28-36, 2017.

FROSST, P.; *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, n. 1, p. 111-113, 1995.

FUJII, T.M.M; MEDEIROS, R; YAMADA, R. Nutrigenômica e nutrigenética: importantes conceitos para a ciência da nutrição. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, 2010.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia em cores. São Paulo: **Guanabara Koogan**, p. 208-209, 1999.

GASPAROVIC, A.C.; *et al.* Assays for the measurement of lipid peroxidation. In: **Cell Senescence**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 283-296, 2013.

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, p. NMI.S29527, 2015.

GERSTEIN, H.C.; *et al.* Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study, Group. Effects of intensive glucose lowering in type two. **New England Journal of Medicine**, v. 2, p. 2545-59, 2008.

GOLDSTEIN, B.J.; SCALIA, R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2563-2568, 2004.

GONÇALVES DE CARVALHO, C.M.R; RIBEIRO, S.M.L. Aging, low-grade systemic inflammation and vitamin D: a mini-review. **European journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 4, p. 434-440, 2017.

GOYETTE, P.; *et al.* Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **American journal of human genetics**, v. 56, n.5, p. 1052, 1995.

GOOSSENS, G.H.; *et al.* Valsartan improves adipose tissue function in humans with impaired glucose metabolism: a randomized placebo-controlled double-blind trial. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39930, 2012.

GOOSSENS, G. H.; BLAAK, E. E.; VAN BAAK, M. A. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. **Obesity Reviews**, v. 4, n. 1, p. 43-55, 2003.

GRINER, E.M.; KAZANIETZ, M.G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 281-294, 2007.

GUBITOSI-KLUG, R.A.; *et al.* Effects of Prior Intensive Insulin Therapy and Risk Factors on Visual Quality-of-Life in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Cohort. **JAMA ophthalmology**, v. 134, n. 2, p. 137, 2016.

HALDAR, S.R.; *et al.* Oxidative stress-related genes in type 2 diabetes: association analysis and their clinical impact. **Biochemical genetics**, v.53, n.4, p.93-119, 2015.

HANSON, N.; *et al.* C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 661-6, 2001.

HAINSWORTH, D.P.; *et al.* Risk factors for retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC study. **Diabetes Care**, v. 42, n. 5, p. 875-882, 2019.

HARA, K.; *et al.* Absence of an association between the polymorphisms in the genes encoding adiponectin receptors and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1307-1314, 2005.

HANDA, P.; *et al.* Reduced adiponectin signaling due to weight gain results in nonalcoholic steatohepatitis through impaired mitochondrial biogenesis. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 133-145, 2014.

HENRIQUES, J.; *et al.* Doença ocular diabética. **Acta Médica Portuguesa**. v.28, n.1, p. 107-113, 2015.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D.M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. s3, p. 39-50, 2013.

HERMAN, J.G.; *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 93, n. 18, p. 9821-9826, 1996.

HERRMANN, M.; *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D: a predictor of macrovascular and microvascular complications in patients with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 38, n. 3, p. 521-528, 2015.

HOLMAN, R.R.; SOURIJ, H.; CALIFF, R.M. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering strategies in type 2 diabetes-Authors' reply. **The Lancet**. v. 384, n. 9948, p. 1097-1098, 2014.

HONG, Y.J.; *et al.* Association between Bsm1 polymorphism in vitamin D receptor gene and diabetic retinopathy of type 2 diabetes in Korean population. **Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 469-474, 2015.

HOSSAIN, M.M.; MUKHEEM, A.; KAMARUL, T. The prevention and treatment of hypoadiponectinemia-associated human diseases by up-regulation of plasma adiponectin. **Life Sciences**, v.135, p. 55-67, 2015.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; SPIRA, A.; HOLICK, M.F. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double blind clinical trial. **PLoS One**. v. 3, n. 3, p. 1-13, 2013.

HOTTA, K.; *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 6, p. 1595-1599, 2000.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B.M. AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity (\*). **Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697-10703, 1996.

HUANG, H.; *et al.* Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with akt activation and HIF1 $\alpha$ -VEGF pathway inhibition. **Diabetes**, v. 64, n. 1, p. 200-212, 2015.

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.

IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes research and clinical practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.

IDRIS, I.; GRAY, S.; DONNELLY, R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia**, v. 44, n. 6, p. 659-673, 2001.

IGHODARO, O.M. Molecular pathways associated with oxidative stress in *Diabetes Mellitus*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656-662, 2018.

IL'YASOVA, D.; *et al.* Effects of 2 years of caloric restriction on oxidative status assessed by urinary F2-isoprostanes: The CALERIE 2 randomized clinical trial. **Aging Cell**, v. 17, n. 2, p. e12719, 2018.

International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Disponível em <http://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 13 de março de 2022.

INUKAI, T.; *et al.* Alterations in serum levels of 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2 D3 and osteocalcin in patients with early diabetic nephropathy. **Diabetes research and clinical practice**, v. 38, n. 1, p. 53-59, 1997.

ISAIA, G.; GIORGINO, R.; ADAMI, S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. **Diabetes care**, v. 24, n. 8, p. 1496-1496, 2001.

IZMIRLI, M.A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 1, p. 625-637, 2013.

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

JIAO, J.; *et al.* Association of FokI, TaqI, BsmI and ApaI polymorphisms with diabetic retinopathy: a pooled analysis of case-control studies. **African health sciences**, v. 18, n.4, p. 891-899, 2018.

- JIN, Z.; *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.
- JOHNSON, R. J.; *et al.* Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3307-3315, 2013.
- KADRI, R.; *et al.* Dietary associations with diabetic retinopathy—a cohort study. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 3, p. 661, 2021.
- KADOWAKI, T.; *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.
- 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.
- KANETO, H.; *et al.* Oxidative stress and the JNK pathway are involved in the development of type 1 and type 2 diabetes. **Current molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 674-686, 2007.
- KAWASAKI, R.; *et al.* Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow-up study of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). **Diabetologia**, v. 54, n. 9, p. 2288-2294, 2011.
- KAYADIBI, H.; SERTOGLU, E.; UYANIK, M. Plasma total homocysteine levels in diabetic retinopathy. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- KOHAMA, K.; *et al.* Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and renal osteodystrophy in patients on maintenance hemodialysis. **Yonago Acta Medica**, v. 43, p. 27-38, 2000.
- KHAZAMIPOUR, N.; *et al.* MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2361-2364, 2009.
- KIM, Y. Role of the MTHFR polymorphisms in cancer risk modification and treatment. 2009.
- KIMBALL, S; FULEIHAN, G.H; VIETH, R. Vitamin D: a growing perspective. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 45, n.4, p. 339-414, 2008.
- KISSEBAH, A.H.; *et al.* Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14478-14483, 2000.
- KLEIN, R.; *et al.* The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. **Ophthalmology**, v. 98, n. 8, p. 1261-1265, 1991.
- KLEIN, R.; *et al.* The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. **Archives of ophthalmology**, v. 102, n. 4, p. 520-526, 1984.

KHODAEIAN, M.; *et al.* Association between genetic variants and diabetes mellitus in Iranian populations: a systematic review of observational studies. **Journal of diabetes research**, v. 2015, 2015.

KOHNERT, K.; FREYSE, E.; SALZSIEDER, E. Glycaemic Variability and Pancreatic  $\beta$ -cell Dysfunction. **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n. 5, p. 345-354, 2012.

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, n.1, p. 1-14, 2015.

KOLB, H.; MARTIN, S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. **BMC Medicine**, v. 15, n.1, p.11-11, 2017.

KONIG, M.; *et al.* An insight into the recent diabetes trials: what is the best approach to prevent macrovascular and microvascular complications? **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 5, p. 371-381, 2013.

KOWLURU, R.A. Diabetic retinopathy, metabolic memory and epigenetic modifications. **Vision research**, v. 139, p. 30-38, 2017.

LACHIN, J.M.; *et al.* Effect of intensive Diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. **Diabetes**, v.64, n.2, p.631–642, 2015.

LAITEERAPONG, N.; *et al.* The Legacy Effect in Type 2 Diabetes: Impact of Early Glycemic Control on Future Complications (the Diabetes & Aging Study). **Diabetes Care**, v.42, n.3, p. 416-426, 2019.

LANGENBERG, C.; LOTTA, L.A. Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2463-2474, 2018.

LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179-2183, 2003.

LECHNER, J.; O'LEARY, O.E.; STITT, A.W. The pathology associated with diabetic retinopathy. **Vision research**, v. 139, p. 7-14, 2017.

LEE, C.C.; *et al.* Micronutrients and diabetic retinopathy: A systematic review. **Ophthalmology**, v. 117, n. 1, p. 71-78, 2010.

LEE, R.; WONG, T.Y; SABANAYAGAM, C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. **Eye and vision**, v. 2, n. 1, p. 1-25, 2015.

LI, H.; *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, S.; *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.

LI, W.; *et al.* Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 6670-6687, 2015.

- 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.
- LI, Y.; *et al.* Association of adiponectin SNP+ 45 and SNP+ 276 with type 2 diabetes in Han Chinese populations: a meta-analysis of 26 case-control studies. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19686, 2011.
- LI, X.; *et al.* The effect of vitamin D supplementation on glycemic control in type 2 diabetes patients: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 375, 2018.
- LIANG, W.; *et al.* A novel damage mechanism: Contribution of the interaction between necroptosis and ROS to high glucose-induced injury and inflammation in H9c2 cardiac cells. **International journal of molecular medicine**, v. 40, n. 1, p. 201-208, 2017.
- LIEW, SC; GUPTA, ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European journal of medical genetics**, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2015.
- LIGUORI, I.; *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, p. 757, 2018.
- LIMA, F.E.L.; *et al.* Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.4, p 820–8, 2008.
- LITWAK, L.; *et al.* Prevalence of diabetes complications in people with type 2 *Diabetes Mellitus* and its association with baseline characteristics in the multinational A 1 chieve study. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2013.
- LIU, Y.; *et al.* Risk factors of diabetic retinopathy and sight-threatening diabetic retinopathy: a cross-sectional study of 13 473 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* in mainland China. **BMJ Open**. 2017 Sep;7(9):e016280.
- LIU, Y.; *et al.* Risk factors of diabetic retinopathy and sight-threatening diabetic retinopathy: a cross-sectional study of 13 473 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* in mainland China. **BMJ open**, v. 7, n. 9, p. e016280, 2017.
- LODISH. H.; *et al.* Análise genética em biologia molecular. In: NADER HB, editor. **Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Revinter**, v 12, p.255-9, 2002.
- LOPEZ-TORRES, M.; *et al.* Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 882–889, 2002.
- LORENZI, M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. **Experimental diabetes research**, v. 2007, 2007.
- LU, L.; *et al.* Current advances in pharmacotherapy and technology for diabetic retinopathy: a systematic review. **Journal of Ophthalmology**, v. 2018, 2018.

LUO, B.A.; GAO, F.; QIN, L.L. The Association between Vitamin D Deficiency and Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 307, 2017.

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, M.; *et al.* Diabetic retinopathy possibly results from poor blood sugar control associated with MTHFR gene polymorphism in type 2 diabetic patients: Response to Yoshioka *et al.* **Diabetes Care**, v. 26, n. 6, p. 1948-1948, 2003a.

MAEDA, M.; *et al.* MTHFR gene polymorphism as a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without serum creatinine elevation. **Diabetes Care**, v. 26, n. 2, p. 547-548, 2003b.

MAEDA, M.; *et al.* MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 22, n. 2, p. 119-125, 2008.

MAEDA, S. S. *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 411-433, 2014.

MALAGUARNERA, G.; *et al.* Homocysteine serum levels in diabetic patients with non proliferative, proliferative and without retinopathy. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MALIK, V.S.; HU, F.B. Fructose and cardiometabolic health: what the evidence from sugar-sweetened beverages tells us. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 66, n. 14, p. 1615-1624, 2015.

MALERBI, F.K.; MELO, G.B. Feasibility of screening for diabetic retinopathy using artificial intelligence, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 100, n. 10, p. 643-647, 2022.

MAO, X.; *et al.* Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81649, 2017.

MANSOUR, R.F. Deep-learning-based automatic computer-aided diagnosis system for diabetic retinopathy. **Biomedical engineering letters**, v. 8, n. 1, p. 41-57, 2018.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; STERN, N. Adipose tissue renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 378, n. 1-2, p. 1-14, 2013.

MATSUDO, S.; *et al.* Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Revista brasileira de atividade física e saúde**, p. 05-18, 2001.

- MCAINCH, A.J.; *et al.* Differential regulation of adiponectin receptor gene expression by adiponectin and leptin in myotubes derived from obese and diabetic individuals. **Obesity**, v. 14, n. 11, p. 1898-1904, 2006.
- 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.
- MENTCH, S.J.; LOCASALE, J.W. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1363, n. 1, p. 91-98, 2016.
- MÉPLAN, C. Review Selenium and Chronic Diseases: a nutritional genomics perspective. **Nutrients**, v. 15, n. 7, p. 3621-3651, 2015.
- MILECH, A. *et al.* Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes (2015-2016). **São Paulo: AC Farmacêutica**, p. 13, 2016.
- MILL, J.; HEIJMANS, B.T. From promises to practical strategies in epigenetic epidemiology. **Nature Reviews Genetics**, **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 8, p. 585-594, 2013.
- MITCHELL, P.; *et al.* Cost-effectiveness of ranibizumab in treatment of diabetic macular oedema (DME) causing visual impairment: Evidence from the RESTORE trial. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 5, p. 688–693, 2012.
- MIYAMOTO, K.; *et al.* Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 8, p. 1165-1179, 1997.
- MOHR, S.B. A brief history of vitamin D and cancer prevention. **Annals of Epidemiology**, v. 19, n. 2, p.79–83, 2009.
- MOORE, L.D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.
- MOHAMMADI, A.; *et al.* Vitamin D receptor genetic polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **Steroids**, v. 158, p. 108615, 2020.
- MORA-GARCÍA, G.; *et al.* Variations in *ADIPOR1* but not *ADIPOR2* are associated with hypertriglyceridemia and diabetes in an admixed Latin American population. **The Review of Diabetic Studies: RDS**, v. 14, n. 2-3, p. 311, 2017.
- MORY, D. B.; *et al.* Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to  $\beta$ -cell autoimmunity and to remaining  $\beta$ -cell function. **Human immunology**, v. 70, n. 6, p. 447-451, 2009.
- MOTOHASHI, Y.; *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3137-3140, 2003.
- MWER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- NADRI, G.; *et al.* Serum vitamin D is a biomolecular biomarker for proliferative diabetic retinopathy. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2019.

NAGELE, P.; *et al.* Genetic and environmental determinants of plasma total homocysteine levels: impact of population-wide folate fortification. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 21, n. 7, p. 426, 2011.

NAKAYAMA, T.; *et al.* Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. **American journal of physiology-renal physiology**, v. 298, n. 3, p. F712-F720, 2010.

NATHAN, D.M.; *et al.* Modern-day clinical course of type 1 *Diabetes Mellitus* after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). **Archives of internal medicine**, v. 169, n. 14, p. 1307, 2009.

NAGPAL, D.; *et al.* A review of diabetic retinopathy: Datasets, approaches, evaluation metrics and future trends. **Journal of King Saud University-Computer and Information Sciences**, v. 34, n. 9, p. 7138-7152, 2022.

NEWTON, C.A.; RASKIN, P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 *Diabetes Mellitus*: clinical and biochemical differences. **Archives of internal medicine**, v. 164, n. 17, p. 1925-1931, 2004.

NOSRATABADI, R.; ARABABADI, M. k.; SALEHABAD, V. A. Vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes in southeastern Iranian patients. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 1, p. 32-34, 2011.

OH, J.L.; BARRETT-CONNOR, E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 51, n. 3, p. 356-359, 2002.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKAMOTO, Y.; *et al.* An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. **Hormone and Metabolic Research**, v. 32, n. 02, p. 47-50, 2000.

ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8758, 2010.

OUCHI, N.; *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1296-1301, 2000.

OGURTSOVA, K.; *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Resesearch an Clinical Practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.

PADBERG, I.; *et al.* A new metabolomic signature in type-2 *Diabetes Mellitus* and its pathophysiology. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e85082, 2014.

PANI, M.A.; *et al.* Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. **Diabetes**, v. 49, n. 3, p. 504-507, 2000.

- PATRICK, P.A.; *et al.* Vitamin D and retinopathy in adults with *Diabetes Mellitus*. **Archives of Ophthalmology**, v. 130, n. 6, p. 756-760, 2012.
- PAYNE, J.F.; *et al.* Vitamin D insufficiency in diabetic retinopathy. **Endocrine Practice**, v. 18, n. 2, p. 185-193, 2012.
- PÉREZ-BURILLO, S.; RUFÍAN-HENARES, J.A.; PASTORIZA, S. Effect of home cooking on the antioxidant capacity of vegetables: Relationship with Maillard reaction indicators. **Food Research International**, v. 121, p. 514-523, 2019.
- PERŁA-KAJÁN, J.; JAKUBOWSKI, H. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3140, 2019.
- PERLUIGI, M.; DI DOMENICO, F.; BUTTERFIELD, D.A. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 39–49, 2015.
- PIETSCHMANN, P.; SCHERNTHANER, G.; WOLOSZCZUK, W. Serum osteocalcin levels in *Diabetes Mellitus*: analysis of the type of diabetes and microvascular complications. **Diabetologia**, v. 31, n. 12, p. 892-895, 1988.
- PINTO, L.; *et al.* Patient-centered management of type 2 *Diabetes Mellitus* based on specific clinical scenarios: systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 11, p. 3588-3599, 2020.
- PRATT, H.; *et al.* Convolutional neural networks for diabetic retinopathy. **Procedia computer science**, v. 90, p. 200-205, 2016.
- PRATTICHIZZO, F.; *et al.* Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 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, n. 10, p. 1263-1269, 2009.
- PUTNAM, K.; *et al.* The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. **American Journal Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.302, n.6, p.H1219-30, 2012.
- QUINTÃO, T.; *et al.* 25 perguntas e respostas: Edema Macular Diabético. **Grupo de estudos da Retina**, 2017.
- 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, n. 1, p. 1-17, 2008.
- REDDY, M.A.; ZHANG, E.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. **Diabetologia**. v. 58, n. 3, p. 443-55, 2015.
- REDMAN, L.M.; *et al.* Metabolic slowing and reduced oxidative damage with sustained caloric restriction support the rate of living and oxidative damage theories of aging. **Cell metabolism**, v. 27, n. 4, p. 805-815. e4, 2018.

- 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.
- REINSTEIN, C.S.B. DietWin Software de avaliação nutricional. Porto. Alegre: Brubins. 2008.
- RODRÍGUEZ-GALLEGO, E.; *et al.* Mapping of the circulating metabolome reveals  $\alpha$ -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.
- RODRIGUES, M. R. K.; *et al.* Efficacy of vitamin D supplementation in gestational diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of randomized trials. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0213006, 2019.
- RODRIGUEZ, A.J.; *et al.* Association between circulating adipocytokine concentrations and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of controlled cross-sectional studies. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 2, p. 357-367, 2016.
- ROSSE, C.; *et al.* PKC and the control of localized signal dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2010.
- ROMANÍ-PÉREZ, M.; *et al.* Activation of the GLP-1 receptor by liraglutide increases ACE2 expression, reversing right ventricle hypertrophy, and improving the production of SP-A and SP-B in the lungs of type 1 diabetes rats. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3559-3569, 2015.
- RÜBSAM, A.; PARIKH, S.; FORT, P.E. Role of inflammation in diabetic retinopathy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 942, 2018.
- RUAN, H.; DONG, L.Q. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. **Journal of molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 101-109, 2016.
- SANTANA BEZERRA, E.; *et al.* The MTHFR promoter hypermethylation pattern associated with the A1298C polymorphism influences lipid parameters and glycemic control in diabetic patients. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2019.
- SAXENA, A., *et al.* Transcriptome profiling reveals association of peripheral adipose tissue pathology with type-2 diabetes in Asian Indians. **Adipocyte**, v. 8, n. 1, p. 125-136, 2019.
- SCHALINSKE, K. L; SMAZAL, A. L. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 6, p. 755-762, 2012.
- SCHMIDT, R.E.; *et al.* A potent sorbitol dehydrogenase inhibitor exacerbates sympathetic autonomic neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Experimental neurology**, v. 192, n. 2, p. 407-419, 2005.
- SELVIN, E. Are there clinical implications of racial differences in HbA1c? A difference, to be a difference, must make a difference. **Diabetes Care**. 39, 1462–1467, 2016.
- STEINMETZ, J. D.; *et al.* Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, v. 9, n. 2, p. e144-e160, 2021.

SETTIN, A.; *et al.* Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 *Diabetes Mellitus*: susceptibility and complications. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 838-843, 2015.

SETTIN, A.; *et al.* Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 *Diabetes Mellitus*: Susceptibility and complications. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 838-843, 2015.

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, p. 1795-1805, 2006.

SHAHZAD, K.; *et al.* A structured-based model for the decreased activity of Ala222Val and Glu429Ala methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutants. **Bioinformatics**, v. 9, n. 18, p. 929, 2013.

SHE, C.; *et al.* Association between dietary antioxidants and risk for diabetic retinopathy in a Chinese population. **Eye**, v. 35, n. 7, p. 1977-1984, 2021.

SHEPHERD, M.; *et al.* Systematic Population Screening, Using Biomarkers and Genetic Testing, Identifies 2.5% of the U.K. Pediatric Diabetes Population With Monogenic Diabetes. **Diabetes Care**, v.39, n.11, p. 1879-1888, 2016.

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, n. 1-2, p. 14-20, 2015.

SIDARALA, V.; *et al.* Mitophagy protects  $\beta$  cells from inflammatory damage in diabetes. **JCI insight**, v. 5, n. 24, 2020.

SINGH, R.; *et al.* Epigenetic modification and therapeutic targets of *Diabetes Mellitus*. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 9, 2020.

SKOVSTØ, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of diabetes investigation**, v. 5, n. 4, p. 349-358, 2014.

SKURK, T.; *et al.* (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v.92, n.3, p.1023-1033, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes**. 2019-2020. 2020.

SOCCIO, T.; *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.

SONG, N.; *et al.* The Impact of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms on the Susceptibility of Diabetic Vascular Complications: A Meta-Analysis. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 23, n. 8, p. 533-556, 2019.

- SORRENTINO, F.S.; *et al.* The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. **Life sciences**, v. 162, p. 54-59, 2016.
- SPENCER, B.G.; *et al.* Pericytes, inflammation, and diabetic retinopathy. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 697-709, 2020.
- STANHOPE, K.L.; *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 5, p. 1322-1334, 2009.
- SUN, H.; *et al.* IDF diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, v. 183, p. 109119, 2022.
- 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.
- SUZUKI, A.; *et al.* Hypovitaminosis D in type 2 *Diabetes Mellitus*: association with microvascular complications and type of treatment. **Endocrine Journal**, v. 53, n. 4, p. 503-510, 2006.
- TANG, J.; KERN, T.S. Inflammation in diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 30, n. 5, p. 343-58, set. 2011.
- TANG, L.; *et al.* Melatonin Maintains Inner Blood–Retinal Barrier by Regulating Microglia via Inhibition of PI3K/Akt/Stat3/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in Experimental Diabetic Retinopathy. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.
- TAURONE, S.; *et al.* The role of inflammation in diabetic retinopathy: a review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 20, p. 10319-10329, 2020.
- TARR, J.M.; *et al.* Pathophysiology of diabetic retinopathy. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.
- TAVERNA, M. J.; *et al.* Taq I polymorphism of the vitamin D receptor and risk of severe diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 45, p. 436-442, 2002.
- TEBANI, A.; *et al.* Omics-based strategies in precision medicine: toward a paradigm shift in inborn errors of metabolism investigations. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1555, 2016.
- TECILAZICH, F.; FORMENTI, A.M.; GIUSTINA, A. Role of vitamin D in diabetic retinopathy: Pathophysiological and clinical aspects. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, p. 1-13, 2020.
- TEO, Z. L.; *et al.* Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis. **Ophthalmology**, v. 128, n. 11, p. 1580-1591, 2021.
- TITCHENELL, P.M.; ANTONETTI, D.A. Using the past to inform the future: anti-VEGF therapy as a road map to develop novel therapies for diabetic retinopathy. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1808-1815, 2013.

- TSCHRITTER, O.; *et al.* Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 239-243, 2003.
- TUOMI, T.; *et al.* The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. **Lancet**, v. 22, n. 383 (9922), p. 1084-94, 2014.
- TURER, A.T.; SCHERER, P.E. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2319-2326, 2012.
- TSUCHIDA, A.; *et al.* Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30817-30822, 2004.
- UEHARA, S.K.; ROSA, G. Association between folic acid deficiency and disease and prevention strategies: a critical view. **Revista de Nutrição Campinas**, v.23, n.5, p.881-894, 2010.
- UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. **BMJ**, v.317, n. 7160, p. 703-713, 1998.
- UKINC, K.; *et al.* Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. **Endocrine**. v. 36, n. 2, p. 255-61, 2009.
- VALLE, M.S.; RUSSO, C.; MALAGUARNERA, L. Protective role of vitamin D against oxidative stress in diabetic retinopathy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 37, n. 8, p. e3447, 2021.
- VAN DER PUT, N.M. *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 5, p. 1044-1051, 1998.
- VAN HECKE, M.V.; *et al.* Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1300-1306, 2005.
- VARMA, R.; *et al.* Prevalence of diabetic retinopathy in adult Latinos: the Los Angeles Latino eye study. **Ophthalmology**, v. 111, n. 7, p. 1298-1306, 2004.
- VEDRALOVÁ, M.; *et al.* Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of *Diabetes Mellitus* and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2012.
- 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. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1470-1480, 2000.
- WAGNER, C.L.; TAYLOR, S.N; HOLLIS, B.W. Does Vitamin D Make the World Go “Round”? **Breastfeeding Medicine**, v. 3, n. 4, p. 239-250, 2008.

WANG, H.; *et al.* Adiponectin receptor 1 gene (*ADIPOR1*) as a candidate for type 2 diabetes and insulin resistance. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 2132-2136, 2004.

WANG, Q.J. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 6, p. 317-323, 2006.

WANG, Y.; *et al.* Plasma adiponectin levels and type 2 diabetes risk: a nested case-control study in a Chinese population and an updated meta-analysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 406, 2018.

WANG, W.; LO, A.C.Y. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1816, 2018.

WEIR, G.C.; GAGLIA, J.; BONNER-WEIR, S. Inadequate  $\beta$ -cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 249-256, 2020.

WEISBERG, I.; *et al.* A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity **Molecular genetics and metabolism**, v. 64, n. 3, p. 169-172, 1998.

WEISBERG, I.S.; *et al.* The 1298A $\rightarrow$ C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 2, p. 409-415, 2001.

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

WHITEHEAD, M.; *et al.* Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. **Expert opinion on biological therapy**, v. 18, n. 12, p. 1257-1270, 2018.

WILKINSON, C.P.; *et al.* Propostas de escalas internacionais de gravidade da retinopatia diabética clínica e do edema macular diabético. **Oftalmologia**, v. 110, n. 9, p. 1677-1682, 2003.

WONG, M.Y.Z.; *et al.* Dietary intake and diabetic retinopathy: a systematic review. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0186582, 2018.

WONG, T.; *et al.* Diabetic retinopathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 17, n. 2, p. 16012, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. World Health Organization, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1). WHO, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on physical activity and sedentary behaviour: web annex: evidence profiles**, WHO, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes. Geneva: **World Health Organization**. 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/diabetes/en>. Acesso em: 10 Jun 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: Report of a WHO consultation on obesity.** (WHO Technical Report Series n. 894). Geneva, Switzerland: **WHO**, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva, Switzerland: **WHO**, 1998. (WHO Technical Report Series, n. 854).

WU, M.Y.; *et al.* The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018

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

YAMAUCHI, T.; *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. **Nature medicine**, v. 7, n. 8, p. 941-946, 2001.

YANG, Y.; *et al.* OGT suppresses S6K1-mediated macrophage inflammation and metabolic disturbance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16616-16625, 2020.

YARIBEYGI, H.; *et al.* Molecular mechanisms linking oxidative stress and *Diabetes Mellitus*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.

YIGIT, S.; KARAKUS, N; INANIR, A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. **Molecular vision**, v. 19, p. 1626, 2013.

YIN, L.; *et al.* Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in diabetic patients: A community based cross-sectional study. **Medicine**, v. 99, n. 9, 2020.

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'-en GC density. **Oncotarget**, v.6, n.6, p. 3627-43, 2015.

YUAN, T.; *et al.* New insights into oxidative stress and inflammation during *Diabetes Mellitus*-accelerated atherosclerosis. **Redox biology**, v. 20, p. 247-260, 2019.

ZEISEL, S. H. Choline, other methyl-donors and epigenetics. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 445, 2017.

ZENG, Q., *et al.* Association of vitamin D receptor gene rs739837 polymorphism with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus susceptibility: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2022.

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. 2022-2034, 2017.

ZHA, D.; WU, X.; PING, G. Adiponectin and Its Receptors in Diabetic Kidney Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Potential. **Endocrinology**. v. 158, n. 7, p. 2022-2034, 2017.

ZHANG, G.; CHEN, H.; CHEN, W.; ZHANG, M. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in China: a multi-hospital-based cross-sectional study. **British Journal of Ophthalmology**, v.101, n. 12, p.1591-1595, 2017.

ZHANG, J.; UPALA, S.; SANGUANKEO, A. Relationship between vitamin D deficiency and diabetic retinopathy: a meta-analysis. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 52, n. 2, p. 219-224, 2017.

ZHANG, H.; *et al.* BsmI polymorphisms in vitamin D receptor gene are associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes in the Han Chinese population. **Gene**, v. 495, n. 2, p. 183-188, 2012.

ZHANG, J.; UPALA, S.; SANGUANKEO, A. Anawin. Relationship between vitamin D deficiency and diabetic retinopathy: a meta-analysis. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 52, p. S39-S44, 2017.

ZHANG, P.; *et al.* Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. **Frontiers of medicine**, v. 14, n. 5, p. 583-600, 2020.

ZHANG, Y.; *et al.* Effects of Vitamin D Supplementation on Prevention of Type 2 Diabetes in Patients With Prediabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 43, n. 7, p. 1650-1658, 2020.

ZHANG, Y.; *et al.* The Association between VDR Gene Polymorphisms and Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

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

ZHENG, J.; *et al.* Novel insights into DNA methylation and its critical implications in diabetic vascular complications. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, 2017.

ZHONG, X.; *et al.* Effects of vitamin D receptor gene polymorphism and clinical characteristics on risk of diabetic retinopathy in Han Chinese type 2 diabetes patients. **Gene**, v. 566, n. 2, p. 212-216, 2015.

ZIEMKE, F.; MANTZOROS, C.S. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.1, p. 258S–61S, 2010.

ZINTZARAS, E.; *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 11, p. 881-890, 2007.

ZORENA, K.; RACZYŃSKA, D.; RACZYŃSKA, K. Biomarkers in diabetic retinopathy and the therapeutic implications. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

## APÊNDICE A - ARTIGO 1

Artigo publicado no periódico PLoS ONE (Fator de impacto: 3,2400; Qualis: A1)  
Publicado online em 25 de fevereiro de 2022; doi: 10.1371/journal.pone.0263346

### **Impacto metabólico do VDR rs1544410 na retinopatia diabética**

Caroline Severo de Assis<sup>a</sup>, Tainá Gomes Diniz<sup>b</sup>; João Otávio Scarano Alcântara<sup>c</sup>, Vanessa Polyana Alves de Sousa Brito<sup>d</sup>, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento<sup>e</sup>, Mayara Karla dos Santos Nunes<sup>f</sup>, Alexandre Sérgio Silva<sup>g</sup>, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista<sup>h</sup>, Marina Gonçalves Monteiro Viturino<sup>i</sup>, Rafaela Lira Formiga Cavalcanti de Lima<sup>j</sup>; Darlene Camati Persuhn<sup>k</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: carolsevero5@gmail.com  
ORCID:0000-0003-0525-1418.

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: tainagdiniz@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-2211-1858.

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: joao\_otavio2004@hotmail.com  
ORCID: 0000-0001-7005-8302.

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: polyenfa@hotmail.com  
ORCID: 0000-0003-1311-7614.

<sup>e</sup>Faculdade Uninassau, João Pessoa (PB), Brasil. E-mail: raynerbiomedicina@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-0891-8292.

<sup>f</sup>Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos (DITM), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: mayarakarlasn@hotmail.com  
ORCID: 0000-0001-9835-5050.

<sup>g</sup>Departamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: alexandresegiossilva@yahoo.com.br  
ORCID: 0000-0003-3576-9023.

<sup>h</sup>Unidade de Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: queirogaisabella@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-1127-718X.

<sup>i</sup>Unidade de Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: marinagm@hotmail.com  
ORCID: 0000-0003-3112-3030.

<sup>j</sup>Departamento de Nutrição e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: rafaelanutri@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-1272-0067

<sup>k</sup>Departamento de Biologia Molecular e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: darlenecp@hotmail.com  
ORCID: 0000-0001-5291-5454.

<sup>k</sup>Autor correspondente: Dra. Darlene Camati Persuhn. Universidade Federal da Paraíba / Departamento de Biologia Molecular - João Pessoa-PB/ Brasil. CEP 58051-900. Contato: darlenecp@hotmail.com

**Abstrato**

*Objetivos:* Investigar a associação entre BsmI e DM2 em pacientes com e sem RD e correlacionar com parâmetros clínicos em uma população do Nordeste do Brasil.

*Métodos:* Estudo transversal caso-controle no qual foram coletados dados de 285 indivíduos, incluindo 128 pacientes com DM2 e 157 com RD. Foram analisados parâmetros clínicos, bioquímicos e antropométricos, além do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) BsmI do gene *VDR* (rs1544410), genotipado por PCR-RFLP.

*Resultados:* No grupo RD encontramos maior número de pacientes em uso de insulinoterapia ( $p = 0,000$ ) e com maior tempo de DM2 ( $p = 0,000$ ), além de maiores valores de creatinina sérica ( $p = 0,001$ ). Níveis mais elevados de glicemia de jejum e maior frequência de insulinoterapia foram observados independentemente em pacientes com RD e portadores do alelo b, quando comparados a BB.

*Conclusão:* A associação dos genótipos bb/Bb (rs1544410) do gene *VDR* com aumento da glicemia e insulinoterapia pode representar pior controle glicêmico em portadores do alelo rs1544410 b em indivíduos latino-americanos com RD.

**Palavras-chave:** Diabetes tipo 2; Retinopatia diabética; Biomarcadores; Polimorfismo; Níveis de glicose.

## 1 Introdução

O diabetes mellitus é uma epidemia global que afeta cerca de 415 milhões de adultos [1]. A retinopatia diabética (RD) é uma complicação frequente no Diabetes Mellitus (DM2) tipo 2 [2, 3], e fatores clínicos e metabólicos estão associados ao desenvolvimento e progressão da RD [4, 5, 6].

Há evidências de que a deficiência de Vitamina D (VD) está relacionada ao DM2 [7, 8]. A vitamina D pode ter um efeito direto na função das células beta pancreáticas, mediada pelo receptor da vitamina D (*VDR*) [9], além disso, a transcrição alterada do gene *VDR* pode influenciar os níveis de glicose em jejum por dois efeitos potencialmente aditivos da vitamina D nos adipócitos e células do pâncreas [10, 11]. Há evidências de que a deficiência de vitamina D afeta a patogênese e a progressão da RD e que pacientes com retinopatia diabética proliferativa (RDP) têm níveis mais baixos de 25(OH)D do que aqueles sem diabetes [8, 12]. Uma meta-análise envolvendo 17.000 pacientes de vários continentes concluiu que a deficiência de vitamina D aumentou o risco de RD em DM2 [13].

A relação dos níveis de vitamina D com DM2 e RD desperta o interesse em investigar o efeito de aspectos genéticos ligados a essa vitamina quanto ao seu envolvimento na etiologia ou modulação da RD, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no receptor da vitamina D (*VDR*). O alelo B do polimorfismo BsmI (rs1544410) do gene *VDR* foi associado a um menor risco de RD em pacientes coreanos com DM2 [14], e o genótipo bb foi associado a uma diminuição de (25 [OH] D) em micro e complicações macrovasculares do DM2 em uma população indiana [15]. No entanto, não há consenso na literatura sobre essas relações [13, 16 – 18], e os resultados parecem ser influenciados pela origem geográfica dos pacientes.

Diante dos fatos apresentados na ausência de dados na população brasileira, propomos aqui investigar a associação entre BsmI e DM2 em pacientes com e sem RD e correlacionar com parâmetros clínicos usando uma abordagem de caso-controle, em uma população do nordeste do Brasil.

## 2. Métodos

### 2.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Este estudo transversal de caso-controle foi realizado em 285 pacientes recrutados no Hospital Universitário Lauro Wanderley e nas Unidades Básicas de Saúde de João Pessoa/Paraíba/Brasil. A coleta de dados ocorreu de 2014 a 2021 e os pacientes convidados a participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB; Pareceres n°: 796.459 (26/08/2014) e 3053068 (12/03/2018) e foi realizado em cumprimento da Resolução 466 /2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Os critérios de inclusão foram diagnóstico de DM2 há pelo menos 5 anos, estar em atendimento ambulatorial. Critérios de exclusão: diagnóstico de DM1, amostra de DNA insuficiente ou com resultado inconclusivo na análise genotípica.

#### 2.1.1 Caracterização clínica

O diagnóstico de RD foi baseado em oftalmoscopia após dilatação pupilar com tropicamida 0,5%. As imagens da retina (mácula e disco central) foram capturadas em um ângulo de 45° por uma câmera de fundo. As imagens foram analisadas de acordo com as normas e recomendações do ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) e do Early

Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). Pacientes com DM2 sem RD (n = 128) constituíram o grupo controle e o grupo com algum grau de retinopatia constituiu o grupo RD (n = 157). No grupo RD, 49 pacientes tinham diagnóstico de DM2 há até dez anos; os outros 108 pacientes tinham o diagnóstico de DM2 há mais de dez anos. Em relação à classificação de acordo com o estágio de RD, 103 participantes apresentavam retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e 54 deles apresentavam retinopatia diabética proliferativa (PDR). Foram considerados hipertensos os pacientes com diagnóstico médico de hipertensão ou que relataram apresentar essa condição e faziam uso prolongado de medicamentos para controle da pressão arterial. A classificação foi realizada de acordo com as Diretrizes da American Heart Association, American College of Cardiology e American Society of Hypertension (2015) [18].

## 2.2. Amostra de sangue

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa após jejum noturno. Para análises bioquímicas em geral, sangue na presença de ativador de coágulo, para determinação de HbA1C na presença do anticoagulante K3EDTA e para determinação de glicose na presença do anticoagulante fluoreto de sódio; as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente para separação do soro ou plasma e submetido à análise em até 2 horas após a coleta, exceto para a amostra de HbA1C que foi analisada em sangue total hemolisado.

Para extração do DNA, a coleta de sangue foi realizada por punção venosa em tubos estéreis contendo 7,2 mg de K3 EDTA. As amostras de sangue foram armazenadas por até 20 dias a -20°C até que a extração do DNA fosse realizada.

## 2.3. Análise bioquímica e medidas antropométricas

Métodos enzimáticos foram utilizados para análises de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos. Todas as análises foram realizadas com analisador automatizado (Lab-Max 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e kits padronizados de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A concentração de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi calculada usando a fórmula de Friedewald:  $[LDL] = [\text{colesterol total}] - [HDL] - [\text{triglicerídeos} \div 5]$  [19]. Os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) e proteína C reativa (PCR) foram determinados pela técnica de imunoturbidimetria (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) usando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Para a classificação das dislipidemias, foram estabelecidos os critérios de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2019): Colesterol Total ( $<190\text{mg/dL}$ ), LDL-C ( $<130\text{mg/dL}$ ), HDL-C ( $\leq 40\text{mg/dL}$ ) e Triglicerídeos ( $\geq 150\text{mg/dL}$ ) [20]. Para os valores de HbA1c ( $\leq 6,5\%$ ), colesterol total ( $\leq 190\text{mg/dL}$ ), HDL ( $\geq 40\text{mg/dL}$ ) e LDL ( $<130\text{mg/dL}$ ), os pontos de corte adotados seguiram as recomendações das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2019) [20]. Para Triglicerídeos ( $<150\text{mg/dL}$ ), baseado nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia (2017) [21]. Creatinina sérica de acordo com o sexo, (mulheres  $\leq 0,995\text{mg/dL}$ ; homens  $\leq 1,20\text{mg/dL}$ ), segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2011) [22]. Proteína C Reativa ( $\leq 3\text{mg/dL}$ ) de acordo com a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose [23], e para o Malondialdeído, o valor de referência adotado foi ( $\leq 3,31\mu\text{M}$ ) [24].

As variáveis antropométricas foram o peso corporal (kg), medido com o uso de uma balança, e a estatura (cm). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se o peso corporal pela estatura ao quadrado (em metros) e os indivíduos foram classificados quanto à presença de sobrepeso e obesidade, segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) em  $\text{kg/m}^2$ . Os valores para a idade adulta foram: sobrepeso quando  $\text{IMC} = 25\text{--}29,9\text{ kg/m}^2$  e obesidade quando

IMC  $\geq 30$ kg/m<sup>2</sup>. Para os idosos, o sobrepeso foi definido como IMC =  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> [25]. Informações clínicas e antropométricas como sexo, idade, tempo de DM2, IMC e pressão arterial foram obtidas na avaliação clínica por nutricionista da equipe de pesquisa e pela equipe do serviço de endocrinologia.

## 2.4. Isolamento de DNA leucocitário

Para obtenção de DNA de leucócitos, foram utilizados protocolos apropriados. As amostras foram diluídas em uma solução de lise inicial contendo 10mM de Tris-HCl pH, 8,5mM de EDTA, 0,3M de sacarose e 1% de Triton-X-100. A centrifugação foi realizada a 3.200 rpm e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido 3 vezes para obter um precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina. O precipitado foi ressuspense em uma solução de lise contendo 10mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5mM de EDTA e 0,2 $\mu$ g de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em um banho-maria por 7h. Em seguida, 500 $\mu$ l de uma solução aquosa de 1mM de EDTA e 7,5M de acetato de amônio foram adicionados e misturados por 30 segundos. A mistura foi centrifugada por 10min a 14.000g a 4°C, e 700 $\mu$ l do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo onde foi realizada a precipitação do DNA com 540 $\mu$ l de isopropanol gelado. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado (12.000g por 5min), seco e ressuspense em tampão Tris-EDTA pH 8,0 [26]. As amostras foram mantidas a -20° C até a análise genética.

## 2.5. Genotipagem do rs1544410

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP. *Primers* apropriados foram usados para amplificar a região do gene contendo o polimorfismo [27], e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), anelamento (1 minuto a 58 °C) e extensão (3 minutos a 72 °C) com 10 minutos extras de etapa de extensão. O produto de 825 pb foi digerido com BsmI que reconhece e cliva o alelo polimórfico (b) gerando dois fragmentos (650 pb e outro de 175 pb) enquanto o alelo selvagem (B) permanece em 825 pb. Os genótipos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% e coloração com nitrato de prata a 0,5%.

## 2.6. Análise estatística

O software SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para análise estatística. A normalidade nas variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e distribuições com  $p > 0,05$  foram aceitas como variáveis com distribuição normal e expressas como valores de média  $\pm$  desvio padrão e avaliadas pelo teste t de amostras independentes. Os 'não distribuídos normalmente' foram expressos como valores medianos e intervalos de confiança de 95% e comparados pelo teste U de Mann-Whitney entre os grupos. As variáveis categóricas nominais foram expressas em número total e percentual, analisadas pelo teste de qui-quadrado. Os equilíbrios de Hardy-Weinberg foram calculados para avaliar as frequências genótípicas e alélicas esperadas e observadas e testadas por qui-quadrado. Os dados do grupo RD foram analisados de acordo com os genótipos rs1544410 pelo teste T independente e seu homólogo não paramétrico, e então um modelo de regressão logística foi usado para estabelecer quais variáveis (glicemia de jejum, insulinoterapia, sexo, idade e tempo de DM2) poderiam ser influenciado pelos genótipos rs1544410. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as análises.

### 3. Resultados

Os grupos controle (DM) e DR foram semelhantes quanto à frequência de hipertensão, dislipidemia, história familiar de DM, tabagismo, sedentarismo, idade, HbA1c, glicemia de jejum, LDL-c, triglicerídeos e IMC, porém, no grupo com RD, gênero masculino ( $p=0,001$ ), insulino terapia ( $p=0,000$ ) e creatinina sérica ( $p=0,000$ ) foram maiores, além de maior tempo de DM2 ( $p=0,000$ ). No grupo DM, os pacientes apresentaram maiores valores de colesterol total ( $p=0,017$ ) e fração HDL-c ( $p=0,008$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos da amostra estudada.

|                               | DM (128)               | RD (157)           | p-valor<br>OR (IC 95%)               |
|-------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Sexo (M%)                     | 31 (24.2%)             | 68 (43.6%)         | <b>0.001*</b><br>0.414 (0.247-0.691) |
| Hipertensão (%)               | 82 (65.1%)             | 116 (74.4%)        | 0.090<br>0.643 (0.385-1.074)         |
| Dislipidemia (%)              | 102 (79.7%)            | 126 (80.3%)        | 0.905<br>0.965 (0.539-1.729)         |
| Historico familiar de DM (%)  | 87(71.3%)              | 110(72.8%)         | 0.778<br>0.926 (0.545-1.576)         |
| Tratamento com insulina (%)   | 37 (29.4%)             | 112 (71.8%)        | <b>0.000*</b><br>0.163 (0.097-0.274) |
| Tabagismo (%)                 | 07 (5.5%)              | 08 (5.1%)          | 0.886<br>1.079 (0.380-3.061)         |
| Estilo de vida sedentário (%) | 68(53.5%)              | 81 (51.9%)         | 0.786<br>1.067 (0.667-1.706)         |
| Anos (idade)                  | 59.2 ± 10.1            | 60.8 ±8.3          | 0.159                                |
| Duração do DM2 (anos)         | 7 (7.6 – 9.1)          | 17 (15 – 17.5)     | <b>0.000*</b>                        |
| HbA1c (%)                     | 7.9±1.6                | 7.8±1.4            | 0.305                                |
| Glicose (mg/dL)               | 152.4±50.7             | 141.1±52           | 0.066                                |
| Colesterol Total (mg/dL)      | 183.4 ±41.1            | 170.9 ±45.6        | <b>0.017*</b>                        |
| HDL-c (mg/dL)                 | 46.4 ±12.4             | 42.7±11.1          | <b>0.008*</b>                        |
| LDL-c (mg/dL)                 | 104.2±37.5             | 98.1±39            | 0.185                                |
| Triglicérides (mg/dL)         | 163.5 (154.38 - 188.6) | 115 (125.11- 157)  | 0.094                                |
| Creatinina sérica (mg/dL)     | 0.71 (0.71 – 0.80)     | 0.84 (0.85 – 0.95) | <b>0.000*</b>                        |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )      | 29.7 ±5.7              | 29 ±5.1            | 0.282                                |

\* $p < 0,05$  = diferença estatisticamente significativa. Variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. Variáveis quantitativas analisadas pelo teste t independente (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e apresentadas como média e  $\pm$ DP; As variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney e representadas pela mediana e (IC95%).

A tabela 2 mostra as distribuições de genótipos (BB + Bb / bb; Bb + bb / BB; BB + bb / Bb) e alelos (B / b) em função do grupo controle DM em comparação com diferentes categorizações DR; RD com  $\leq 10$  anos de diagnóstico de DM2; RD com  $> 10$  anos de diagnóstico de DM2; grupos com RDNP e RDP, respectivamente. Em todos os grupos não houve diferença na distribuição genotípica ou alélica dos grupos. A frequência do alelo menor (B) (MAF) foi de 0,46 no grupo controle DM e 0,43 no grupo DM RD.

**Tabela 2.** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1544410 entre pacientes diabéticos tipo 2 sem RD e RD,  $< 10$  anos de diagnóstico de DM,  $\geq 10$  anos de diagnóstico de DM, RDNP e RDP.

| rs1544410 (BsmI)     |          |          |                        |
|----------------------|----------|----------|------------------------|
| Genótipos/<br>Alelos | DM (128) | RD (157) | p-valor<br>OR (IC 95%) |

|                               |                             |   |                                  |
|-------------------------------|-----------------------------|---|----------------------------------|
| BB+Bb / bb                    | 65.63% (84) / 34.37% (44)   | 61.78% (97) / 38.22% (60)                   | 0.585<br>1.181 (0.7259 - 1.921)  |
| Bb+bb / BB                    | 72.66% (93) / 27.34% (35)   | 75.16% (118) / 24.84% (39)                  | 0.731<br>0.8782 (0.5163 - 1.494) |
| BB+bb / Bb                    | 61.72% (79) / 38.28% (49)   | 63.06% (99) / 36.94% (58)                   | 0.913<br>0.9445 (0.5834 - 1.529) |
| B / b                         | 46.48% (119) / 53.52% (137) | 43.31% (136) / 56.69% (178)                 | 0.501<br>1.137 (0.8157 - 1.584)  |
| <b>Genotypes/<br/>Alleles</b> | <b>DM (128)</b>             | <b>RD (49)</b><br>(≤10 years DM diagnosis)  | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>   |
| BB+Bb / bb                    | 65.63% (84) / 34.37% (44)   | 63.27% (31) / 36.73% (18)                   | 0.906<br>1.109 (0.5582 - 2.201)  |
| Bb+bb / BB                    | 72.66% (93) / 27.34% (35)   | 73.47% (36) / 26.53% (13)                   | 0.913<br>0.959 (0.4560 - 2.019)  |
| BB+bb / Bb                    | 61.72% (79) / 38.28% (49)   | 63.27% (31) / 36.73% (18)                   | 0.987<br>0.936 (0.4735 - 1.851)  |
| B / b                         | 46.48% (119) / 53.52% (137) | 44.90% (44) / 55.10% (54)                   | 0.8817<br>1.066 (0.6677 - 1.702) |
| <b>Genotypes/<br/>Alleles</b> | <b>DM (128)</b>             | <b>RD (108)</b><br>(>10 years DM diagnosis) | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>   |
| BB+Bb / bb                    | 65.63% (84) / 34.37% (44)   | 61.11% (66) / 38.89% (42)                   | 0.561<br>1.215 (0.7138 - 2.068)  |
| Bb+bb / BB                    | 72.66% (93) / 27.34% (35)   | 75.93% (82) / 24.07% (26)                   | 0.673<br>0.8425 (0.4679 - 1.517) |
| BB+bb / Bb                    | 61.72% (79) / 38.28% (49)   | 62.96% (68) / 37.04% (40)                   | 0.951<br>0.9484 (0.5589 - 1.609) |
| B / b                         | 46.48% (119) / 53.52% (137) | 42.59% (92) / 57.41% (124)                  | 0.451<br>1.171 (0.8128 - 1.686)  |
| <b>Genotypes/<br/>Alleles</b> | <b>DM (128)</b>             | <b>RDNP (103)</b>                           | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>   |
| BB+Bb / bb                    | 65.63% (84) / 34.37% (44)   | 61.17% (63) / 38.83% (40)                   | 0.574<br>1.212 (0.7073 - 2.077)  |
| Bb+bb / BB                    | 72.66% (93) / 27.34% (35)   | 76.70% (79) / 23.30% (24)                   | 0.583<br>0.8072 (0.4430 - 1.471) |
| BB+bb / Bb                    | 61.72% (79) / 38.28% (49)   | 62.14% (64) / 37.86% (39)                   | 0.943<br>0.9825 (0.5757 - 1.677) |
| B / b                         | 46.48% (119) / 53.52% (137) | 42.23% (87) / 57.77% (119)                  | 0.412<br>1.188 (0.8207 - 1.720)  |
| <b>Genotypes/<br/>Alleles</b> | <b>DM (128)</b>             | <b>RDP (54)</b>                             | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>   |
| BB+Bb / bb                    | 65.63% (84) / 34.37% (44)   | 62.96% (34) / 37.04% (20)                   | 0.862<br>1.123 (0.5792 - 2.177)  |
| Bb+bb / BB                    | 72.66% (93) / 27.34% (35)   | 72.22% (39) / 27.78% (15)                   | 0.9152<br>1.022 (0.5818 - 2.081) |
| BB+bb / Bb                    | 61.72% (79) / 38.28% (49)   | 64.81% (35) / 35.19% (19)                   | 0.821<br>0.8752 (0.4511 - 1.698) |
| B / b                         | 46.48% (119) / 53.52% (137) | 45.37% (49) / 54.63% (59)                   | 0.937<br>1.046 (0.6658 - 1.643)  |

Análise estatística realizada com o teste Qui-quadrado. VDR, receptor de vitamina D.

Os parâmetros clínicos do grupo RD (n = 157) foram analisados de acordo com os genótipos BsmI (BB x Bb+ bb). No grupo com o genótipo Bb+bb, a terapia com insulina foi significativamente mais frequente (p = 0,014) e a glicemia de jejum teve um valor médio maior no mesmo grupo (p = 0,047) (Tabela 3). Um modelo de regressão logística, adotando os genótipos BsmI como variável dependente e com variáveis de correção/ajuste, revelou que glicemia de jejum (p = 0,018) e insulinoterapia (p = 0,036) foram preditores estatisticamente significativos de maior chance de risco no grupo de pacientes com o genótipo Bb+bb (Tabela 4). A diferença de glicemia entre os grupos genotípicos apresenta um tamanho de efeito de

Cohen d = 0,5, ambos comparando apenas o grupo BB x bb e Bb+bb x BB. Segundo a literatura, esse valor significa um efeito de média magnitude [28].

**Tabela 3.** Parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos do grupo RD de acordo com os genótipos rs1544410.

|                                      | <b>BB (n=39)</b>    | <b>Bb+bb (n=118)</b> | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>         |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------|--|
| <b>Sexo (M%)</b>                     | 20 (51.3%)          | 48 (41%)             | 0.263<br>1.513 (0.731 – 3.134)         |
| <b>Hipertensão (%)</b>               | 26 (66.7%)          | 90 (76.9)            | 0.204<br>0.600 (0.272 – 1.325)         |
| <b>Dislipidemia (%)</b>              | 08 (29.6%)          | 25 (33.3%)           | 0.724<br>0.842 (0.324 – 2.189)         |
| <b>Histórico familiar de DM (%)</b>  | 24 (63.2%)          | 86 (76.1%)           | 0.121<br>0.538 (0.245 – 1.184)         |
| <b>Tratamento com insulina (%)</b>   | 22 (52.4%)          | 90 (76.9%)           | <b>0.014*</b><br>0.388 (0.181 – 0.834) |
| <b>Tabagismo (%)</b>                 | 02 (5.1%)           | 06 (5.1%)            | 1.000<br>1.000 (0.193 – 5.171)         |
| <b>Estilo de vida sedentário (%)</b> | 20 (51.3%)          | 61 (52.1%)           | 0.926<br>0.966 (0.468 – 1.996)         |
| <b>Anos (idade)</b>                  | 60.6±8.9            | 60.8±8.1             | 0.926<br>1.533 (-3.171 – 2.886)        |
| <b>Duração do DM2 (Anos)</b>         | 15 (13.2 – 18.6)    | 18 (15 -17.7)        | 0.640                                  |
| <b>HbA1c (%)</b>                     | 7.6±1.3             | 7.7±1.5              | 0.593                                  |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>               | 126.3±44            | 145.8±54.7           | <b>0.047*</b>                          |
| <b>Colesterol total (mg/dL)</b>      | 176.1±59            | 171.4±46.8           | 0.656                                  |
| <b>HDL-c</b>                         | 41 (38.6 – 46.9)    | 42 (40.6 – 44.4)     | 0.855                                  |
| <b>LDL-c</b>                         | 87.8 (90.2 – 104.6) | 100 (89 – 124.5)     | 0.331                                  |
| <b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>        | 115 (112.4 – 158.2) | 124 (136.4 – 169.5)  | 0.257                                  |
| <b>Creatinina (mg/dL)</b>            | 0.83 (0.81 – 1.0)   | 0.84 (0.84 – 0.95)   | 0.677                                  |
| <b>IMC (KG/M<sup>2</sup>)</b>        | 27.5±4.6            | 28.7±4.6             | 0.163                                  |

\* p < 0,05 = diferença estatisticamente significativa. Variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. Variáveis quantitativas analisadas pelo teste t independente (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e apresentadas como média e ±DP; As variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney e representadas pela mediana e (IC95%).

**Tabela 4.** Modelo de regressão logística analisando a influência dos genótipos rs1544410 e variáveis metabólicas em pacientes com RD.

|                                | <b>B</b>     | <b>p-valor<br/>OR (IC 95%)</b>         |
|--------------------------------|--------------|--|
| <b>Glicose</b>                 | 0,010±0,004  | <b>0.018*</b><br>1,010 (1,002 – 1.018) |
| <b>Tratamento com insulina</b> | 0.982±0.470  | <b>0.036*</b><br>2.671 (1.064 – 6.705) |
| <b>Sexo</b>                    | 0.388±0.409  | 0.342<br>1.475 (0.662 – 3.286)         |
| <b>Anos (idade)</b>            | 0.017±0.025  | 0.498<br>1.017 (0.968 – 1.069)         |
| <b>Duração do DM2 (Anos)</b>   | -0,010±0.028 | 0.731<br>0.990 (0.937 – 1.047)         |

Fonte: dados da pesquisa. Regressão Logística Binária. Variável dependente: BB x Bb+bb (referência Bb+bb); \*p<0,05; B = coeficiente de regressão beta ± erro padrão; OR = limites superior e inferior de odds; Tratamento com insulina (uso da insulina como referência); Sexo (masculino como referência).

#### 4. Discussão

A vitamina D em sua forma ativa atua por meio de seu receptor específico (*VDR*), expresso em tecidos humanos inclusive na retina [29]. Além da associação de níveis mais baixos de vitamina D e risco aumentado de DM2 e RD [8, 13], vários estudos também relacionaram polimorfismos do gene *VDR* como fatores de risco para DM2 [30], patogênese [14, 15, 31], e progressão da RD [32].

A relação dos polimorfismos com a ocorrência de complicações crônicas em diabéticos também tem sido explorada [33, 34, 35] e tem grande importância na identificação precoce de indivíduos com maior risco de desenvolver complicações específicas. O polimorfismo do SNP rs1544410 está localizado no íntron 8 na região reguladora 3', que está envolvida na expressão gênica, principalmente através da regulação da estabilidade do RNA mensageiro [36, 37], o que pode resultar em expressão reduzida do gene *VDR* [38]. Outro mecanismo possível é que a alternância de BsmI na sequência intrônica pode influenciar a expressão da proteína [39].

O MAF encontrado neste estudo foi de 0,47 no grupo de diabéticos e 0,43 em pacientes RD enquanto em outra amostra brasileira do estado de Minas Gerais (região Sudeste) do país, o MAF encontrado foi de 0,40 no grupo de diabéticos tipo 2. Em 1000 amostras do projeto genoma, obtidas de população saudável, o MAF (A) para o SNP é 0,29. De acordo com o banco de dados do SNP (ncbi.nlm.gov) em duas populações latino-americanas diferentes o MAF encontrado foi de 0,36 (n = 798) e 0,23 (n = 3896), nos europeus foi de 0,39 e nos afro-americanos de 0,26. Curiosamente, em populações asiáticas o MAF é significativamente menor, mostrando que é um SNP altamente influenciado por aspectos étnicos da população em análise.

A distribuição genotípica encontrada desviou-se do Equilíbrio de Hardy Weinberg em ambos os grupos, DM2 e DM2 com RD. Esse achado não tem sido incomum em estudos envolvendo o polimorfismo em questão e o diabetes. O desequilíbrio HWE esteve presente em um estudo realizado nos EUA [40] e outro no Chile [41]. Em meta-análise recente que avaliou o efeito do rs1544410 sobre o risco de DM2, dos 37 estudos analisados, 10 apresentaram desvio do HWE em amostras de diferentes localidades do mundo [42].

O alelo “b” foi associado a níveis mais baixos de HDL e maior risco de DM2 e obesidade em árabes [43], e a ocorrência de RD na população croata com DM1 [32] o genótipo bb conferiu maior resistência à insulina em caucasianos [40].

Apesar das evidências, há poucos estudos explorando a associação do SNP rs1544410 e RD; um deles em DM1 [32] e quatro em DM2 [14, 15, 44, 45]. Nesses estudos, encontrou-se associação do alelo B com menor risco de DR em DM2 [14] e dois estudos encontraram associação entre RD e o genótipo bb em DM1 [32] e DM2 [15], enquanto em outros estudos não ou associação alélica foi encontrada [44, 45]. As regiões geográficas envolvidas nestes resultados abrangem a Europa [32, 44] e a Ásia [14, 15, 45], porém não há estudos analisando a relação na população latino-americana, o que caracteriza este estudo como pioneiro. Os resultados do presente estudo não mostram associação do polimorfismo rs1544410 com RD em nenhum dos cenários estudados, seja pela classificação dos pacientes por duração do diabetes, pelo estágio de RD ou pelo simples diagnóstico da doença.

O tempo de diagnóstico do diabetes também foi avaliado por Búcan (2009), Hong (2015), Zhong (2015) e Cyganek (2006), e os resultados encontrados reforçam os dados obtidos no estudo aqui apresentado. Um único estudo [14] utilizou a variável de classificação do estágio RD controlando o tempo desde o diagnóstico de DM2 (média de 13 anos) entre os grupos. Neste estudo, os genótipos BB, Bb e alelo B foram relacionados a um menor risco de RD.

Meta-análises [17, 29] apontam para ausência de associação entre rs1544410 e RD tanto no DM1 quanto no DM2. No entanto, a meta-análise realizada por Song (2019) indica uma associação restrita à população indiana, mas que é resultado de um único estudo [15]. Portanto, consideramos importante explorar essa possibilidade na população brasileira. Como a associação não resultou em dados positivos, decidimos investigar o efeito de diferentes genótipos rs1544410 em pacientes com RD em parâmetros clínicos e metabólicos

Dentre os estudos existentes com DM2 e RD, apenas um controlou a duração do DM2 entre os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas [14], enquanto Zhong (2015), Cyganek (2006) e Ezhilarasi (2018) apresentam diferença ou não relatam a comparação. Cientes da grande influência dessa variável no aspecto estudado, neste trabalho, realizamos diferentes cenários de comparação, inclusive separando pacientes com RD até 10 anos de diagnóstico e mais de 10 anos de diagnóstico de DM2, comparando distribuições genóticas e alélicas com as grupo de controle. Em nenhum desses cenários os genótipos ou alelos foram estatisticamente diferentes do controle.

Como a análise de associação encontrou resultados conflitantes em comparação com alguns estudos anteriores [14, 15], decidimos investigar o efeito de diferentes genótipos rs1544410 em parâmetros metabólicos, a fim de avaliar se, apesar de não impactar o risco de RD, tendo conhecimento do genótipo teria impacto no conhecimento do perfil metabólico do indivíduo. Comparamos os grupos genóticos dentro do perfil dos portadores de DR e identificamos que os portadores do alelo b (Bb e bb) apresentavam níveis glicêmicos mais elevados e maior chance de terapia com insulina do que os portadores do genótipo BB.

A hiperglicemia persistente desencadeia a maioria dos processos que promovem o desenvolvimento de RD e altas concentrações de glicose no sangue e altos níveis de HbA1C caracterizam controle glicêmico ruim e os associam a um fator de risco independente para RD [5, 6, 46, 47, 48, 49].

A associação entre variantes de *VDR* (BsmI) e doenças relacionadas à resistência à insulina, demonstram conclusões controversas. Enquanto os genótipos BB+Bb e o alelo B foram relacionados a doenças relacionadas à resistência à insulina em caucasianos de pigmentação escura [50], em uma coorte prospectiva, o alelo B foi associado ao aumento da secreção de insulina em mulheres com história de DM gestacional [51]. O polimorfismo BsmI do gene *VDR* também foi associado com resultados glicêmicos em outras populações. O BsmI foi testado em uma população homogênea de homens jovens saudáveis, em idade anterior ao início típico do DM2, na qual também foi medida a atividade física. Indivíduos com o genótipo BB apresentaram níveis de glicose em jejum significativamente mais altos do que indivíduos com o genótipo Bb ou bb. Esse achado foi associado à baixa atividade física ( $\leq 3$ h por semana), mas o efeito foi ausente em homens com alto grau de atividade física [52].

Além das associações relacionadas ao gene do receptor de vitamina D e genótipos BsmI com marcadores glicêmicos, baixas concentrações séricas de 25OHD3 têm sido associadas à redução da sensibilidade à insulina, metabolismo prejudicado da glicose e síndrome metabólica [53, 54]. O mecanismo pelo qual a vitamina D afeta a sensibilidade à insulina ainda é desconhecido. A vitamina D pode estimular a expressão de receptores de insulina nos tecidos periféricos e, assim, aumentar o transporte de glicose [55]. A captação de glicose mediada por insulina é dependente de cálcio e, portanto, o status de vitamina D pode influenciar indiretamente a captação de glicose [56].

O alelo b foi considerado um fator de risco para baixas concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D, além disso, o mesmo estudo relata que BsmI influenciou as concentrações de glicose e HOMA-IR mesmo após ajustes em crianças brasileiras (Estado do Amazonas) [57].

Essas evidências demonstram a importância de ir além da simples relação genótipo-condição clínica. É possível que a falta de associação encontrada em algumas populações, incluindo este estudo, seja reflexo do delineamento experimental aplicado e do efeito de influência de outros aspectos não medidos ou analisados, incluindo outros SNPs. A associação entre níveis mais elevados de glicose e o alelo b é relevante no contexto estudado, pois essa mesma característica genética parece influenciar os níveis de vitamina D. Os resultados aqui encontrados encorajam uma análise mais aprofundada, levando em conta os níveis clínicos, metabólicos e de vitamina D dos pacientes ao avaliar a associação dos genótipos *VDR* e RD.

Este é o primeiro estudo a analisar uma população latino-americana quanto à influência de rs1544410 no contexto da RD. O estudo apresenta limitações relacionadas ao seu caráter transversal. Os resultados aqui encontrados estimulam a realização de estudos com outras populações e com diferentes modelos experimentais para desvendar os efeitos de outros componentes importantes para a RD.

## 5. Conclusão

Não identificamos o SNP BsmI (rs1544410) do gene *VDR* como fator de risco para RD, mas o alelo b pode ser indicativo de níveis glicêmicos elevados e insulino-terapia na população com RD. A relação entre *VDR* BsmI e suscetibilidade à RD em uma população latino-americana deve ser mais estudada.

### Contribuições dos autores

CSA: Análise formal, investigação, redação – rascunho original. TGD: Investigação. JOSA: Investigação. VPASB: Investigação. RAFN: Investigação. MKSN: Investigação. ASS: Análise formal. IWQE: Investigação. MGMV: Investigação. RLFCL: Análise formal. DCP: Conceituação, obtenção de financiamento, metodologia, administração do projeto, supervisão, redação – revisão e edição. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba e a todos os participantes do estudo pela participação e às instituições financiadoras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil). Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

### Declaração de Financiamento

Este estudo foi apoiado pela Chamada Pública n. 005/2020 Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil) Ministério da Saúde / Decit/SCTIE (Decit/SCTIE/MS), Secretaria Estadual de Saúde (SES/ Paraíba/Brasil); Auxílio 05/2021, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil). Também contou com o apoio da Chamada Pública n. 03/2020 Produtividade em Pesquisa Auxílio PROPESQ/PRPG/UFPB n. PIA13262-2020 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

### Referências

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Jun; 128:40-50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
2. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Mar 17;2:16012. doi: 10.1038/nrdp.2016.12.
3. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight.* 2017 Jul 20;2(14):e93751. doi: 10.1172/jci.insight.93751.
4. Chen YH, Chen HS, Tarng DC. More impact of microalbuminuria on retinopathy than moderately reduced GFR among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2012 Apr;35(4):803-8. doi: 10.2337/dc11-1955.
5. Kawasaki R, Tanaka S, Tanaka S, et al. Japan Diabetes Complications Study Group. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow-up study

- of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). *Diabetologia*. 2011 Sep;54(9):2288-94. doi: 10.1007/s00125-011-2199-0.
6. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001 Feb;44(2):156-63. doi: 10.1007/s001250051594.
  7. Maddaloni E, Cavallari I, Napoli N, et al. Vitamin D and *Diabetes Mellitus*. *Front Horm Res*. 2018;50:161-176. doi: 10.1159/000486083.
  8. Zhang J, Upala S, Sanguankeo A. Relationship between vitamin D deficiency and diabetic retinopathy: a meta-analysis. *Can J Ophthalmol*. 2017 Nov;52 Suppl 1:S39-S44. doi: 10.1016/j.cjjo.2017.09.026.
  9. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, et al. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol*. 1994 Sep;267(3 Pt 1):E356-60. doi: 10.1152/ajpendo.1994.267.3.E356.
  10. Zemel MB, Hang S, Greer B, et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 2000 Jun; 14: 1132 – 1138. doi:10.1096/fasebj.14.9.1132
  11. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, et al. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science*. 1980 Aug 15;209(4458):823-5. doi: 10.1126/science.6250216.
  12. Payne JF, Ray R, Watson DG, et al. Vitamin D insufficiency in diabetic retinopathy. *Endocr Pract*. 2012 Mar-Apr;18(2):185-93. doi: 10.4158/EP11147.OR.
  13. Luo BA, Gao F, Qin LL. The Association between Vitamin D Deficiency and Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2017 Mar 20;9(3):307. doi: 10.3390/nu9030307.
  14. Hong YJ, Kang ES, Ji MJ, et al. Association between Bsm1 Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015 Dec;30(4):469-74. doi: 10.3803/EnM.2015.30.4.469.
  15. Ezhilarasi K, Dhamodharan U, Vijay V. BSMI single nucleotide polymorphism in vitamin D receptor gene is associated with decreased circulatory levels of serum 25-hydroxyvitamin D among micro and macrovascular complications of type 2 *Diabetes Mellitus*. *Int J Biol Macromol*. 2018 Sep;116:346-353. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.026.
  16. Song N, Yang S, Wang YY, et al. The Impact of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms on the Susceptibility of Diabetic Vascular Complications: A Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2019; 23(8):533-556. doi: 10.1089/gtmb.2019.0037
  17. Jiao J, Li Y, Xu S, et al. Association of FokI, TaqI, BsmI and ApaI polymorphisms with diabetic retinopathy: a pooled analysis of case-control studies. *Afr Health Sci*. 2018 Dec;18(4):891-899. doi: 10.4314/ahs.v18i4.7.
  18. Zhang Y, Xia W, Lu P, et al. The Association between *VDR* Gene Polymorphisms and Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016 Nov; 2016:5305282. doi: 10.1155 / 2016/5305282
  19. Rosendorff C, Lackland DT, Allison M, et al. American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Hypertension*. 2015 Jun;65(6):1372-407. doi: 10.1161/HYP.000000000000018.
  20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972 Jun; 18(6): 499-502. doi: org/10.1093/clinchem/18.6.499.
  21. Brazilian Diabetes Society. GUIDELINES OF THE BRAZILIAN DIABETES SOCIETY CLANNAD 2020. [<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>]
  22. Précoma DB, Oliveira GMM, Simão AF, et al. Updated Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - 2019. *Arq Bras Cardiol*. 2019 Nov 4;113(4):787-891. doi: 10.5935/abc.20190204. Erratum in: *Arq Bras Cardiol*. 2021 Apr;116(4):855.
  23. Brazilian Society of Nephrology e-book Biomarkers in Nephrology 2011. [<https://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>]. Accessed on 05/04/2021

24. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, et al. Update of the Brazilian Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention Directive- 2017. *Arq Bras Cardiol* 2017; 109(2) (Suppl. 1): 1-76.
25. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cien Farm* 2008 Ago; 44: 279-87 doi:10.1590/S1516-93322008000200013.
26. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (2000). Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. World Health Organization.[ <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>]
27. 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.
28. Pani MA, Knapp M, Donner H, et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes.* 2000 Mar;49(3):504-7. doi: 10.2337/diabetes.49.3.504.
29. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* 2d ed. New York: Academic Press. 1988.
30. Safar HA, Chehadeh SEH, Abdel-Wareth L, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms among Emirati patients with type 2 *Diabetes Mellitus*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:119-124. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.03.012. Epub 2017 Mar 18.
31. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul;88(7):3137-40. doi: 10.1210/jc.2002-021881.
32. Bućan K, Ivanisević M, Zemunik T, et al. Retinopathy and nephropathy in type 1 diabetic patients-association with polymorphisms of vitamin D-receptor, TNF, Neuro-D and IL-1 receptor 1 genes. *Collegium antropologicum* [Internet]. 2009 Dec [cited 2021 Sep 2];33 Suppl 2:99–105. Available from: [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=79096](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=79096)
33. Vedralová M, Kotrbova-Kozak A, Zelezníková V, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and parathyroid hormone gene in the development and progression of *Diabetes Mellitus* and its chronic complications, diabetic nephropathy and non-diabetic renal disease. *Kidney & Blood Pressure Research.* 2012 ;36(1):1-9. doi: 10.1159/000339021.
34. Ferrarezi DAF, Bellili- Muñoz N, Dubois-Laforgue D, et al. Allelic variations of the vitamin D receptor (*VDR*) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: the DIABHYCAR prospective study. *Diabetes Metab* 2013 May;39:263-270. doi:10.1016/j.diabet.2012.11.004.
35. Zhang H, Wang J, Yi B, et al. BsmI polymorphisms in vitamin D receptor gene are associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes in the Han Chinese population. *Gene.* 2012 Mar 10;495(2):183-8. doi: 10.1016/j.gene.2011.12.049.
36. Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, et al. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Mar 30;1453(3):311-20. doi: 10.1016/s0925-4439(99)00007-1.
37. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014.
38. Carvalho C, Marinho A, Leal B, et al. Association between vitamin D receptor (*VDR*) gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Portuguese patients. *Lupus.* 2015 Jul;24(8):846-53. doi: 10.1177/0961203314566636.
39. Györfy B, Vársárhelyi B, Krikovszky D, et al. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 *Diabetes Mellitus*. *Eur J Endocrinol.* 2002 Dec;147(6):803-8. doi: 10.1530/eje.0.1470803.
40. OH, J. L.; BARRETT-CONNOR, E. Association Between Vitamin D Receptor Polymorphism and Type 2 Diabetes or Metabolic Syndrome in Community-Dwelling Older Adults: The Rancho Bernardo Study. *Metabolism.* 2002 May; 51 (3):356-359. doi: 10.1053/meta.2002.29969
41. Angel B, Lera L, Márquez C, Albala C. The association of *VDR* polymorphisms and type 2 diabetes in older people living in community in Santiago de Chile. *Nutr Diabetes.* 2018 May 25;8(1):31. doi: 10.1038/s41387-018-0038-9.

42. Liu Y, Guo X, Huang SY, Gong L, Cui JH, Shen HW, et al. Evaluation of association studies and a systematic review and meta-analysis of *VDR* polymorphisms in type 2 *Diabetes Mellitus* risk. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Jul 16;100(28):e25934. doi: 10.1097/MD.00000000000025934.
43. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkharfy KM, et al. Association of *VDR*-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. *Gene*. 2014 Jun;542(2):129-133. doi: 10.1016/j.gene.2014.03.044.
44. Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, Malecki MT, et al. Clinical risk factors and the role of *VDR* gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. *Acta Diabetol*. 2006 Dec;43(4):114-9. doi: 10.1007/s00592-006-0225-3.
45. Zhong X, Du Y, Lei Y, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphism and clinical characteristics on risk of diabetic retinopathy in Han Chinese type 2 diabetes patients. *Gene*. 2015 Jul 25;566(2):212-6. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.045. Epub 2015 Apr 18.
46. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XXII the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 2008 Nov;115(11):1859-68. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.08.023.
47. Kim JH, Kwon HS, Park YM, et al. Prevalence and associated factors of diabetic retinopathy in rural Korea: the Chungju metabolic disease cohort study. *J Korean Med Sci*. 2011 Aug;26(8):1068-73. doi: 10.3346/jkms.2011.26.8.1068.
48. Salinero-Fort MÁ, San Andrés-Rebollo FJ, de Burgos-Lunar C, et al. Four-year incidence of diabetic retinopathy in a Spanish cohort: the MADIABETES study. *PLoS One*. 2013 Oct 17;8(10):e76417. doi: 10.1371/journal.pone.0076417.
49. Xu J, Xu L, Wang YX, et al. Ten-year cumulative incidence of diabetic retinopathy. The Beijing Eye Study 2001/2011. *PLoS One*. 2014 Oct 27;9(10):e111320. doi: 10.1371/journal.pone.0111320.
50. Han FF, Lv YL, Gong LL, et al. *VDR* Gene variation and insulin resistance related diseases. *Lipids Health Dis*. 2017 Aug 19;16(1):157. doi: 10.1186/s12944-017-0477-7.
51. Shaat N, Katsarou A, Shahida B, et al. Association between the rs1544410 polymorphism in the vitamin D receptor (*VDR*) gene and insulin secretion after gestational *Diabetes Mellitus*. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0232297. doi: 10.1371/journal.pone.0232297.
52. Ortlepp JR, Metrikat J, Albrecht M, et al. The vitamin D receptor gene variant and physical activity predicts fasting glucose levels in healthy young men. *Diabet Med*. 2003 Jun;20(6):451-4. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.00971.x.
53. Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol*. 2010;2010:351385. doi: 10.1155/2010/351385.
54. Pittas AG, Lau J, Hu FB, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2017-29. doi: 10.1210/jc.2007-0298. Epub 2007 Mar 27.
55. Maestro B, Campi3n J, D3vila N, et al. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr J*. 2000 Aug;47(4):383-91. doi: 10.1507/endocrj.47.383.
56. Ojuka EO. Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc Nutr Soc*. 2004 May;63(2):275-8. doi: 10.1079/PNS2004339.
57. Cobayashi F, Louren3o BH, Cardoso MA. 25-Hydroxyvitamin D3 Levels, BsmI Polymorphism and Insulin Resistance in Brazilian Amazonian Children. *Int J Mol Sci*. 2015 Jun 3;16(6):12531-46. doi: 10.3390/ijms160612531.

## APÊNDICE B - ARTIGO 2

### Os genótipos *ADIPOQ* rs266729 e *ADIPOR1* rs7539542 impactam o controle glicêmico e a ocorrência de amputações em pacientes com retinopatia diabética

Caroline Severo de Assis<sup>1</sup>, Vanessa Polyana de Sousa Brito<sup>2</sup>, Tainá Gomes Diniz<sup>3</sup>, Yohanna de Oliveira<sup>4</sup>, Alexandre Sérgio Silva<sup>5</sup>, Mylenne da Silva Barros<sup>6</sup>, Bruno Rafael Virginio de Sousa<sup>7</sup>, Natan Gomes Emmanuel<sup>8</sup>, Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista<sup>9</sup>, Marina Gonçalves Monteiro Viturino<sup>10</sup>, Darlene Camati Persuhn<sup>11\*</sup>

Afiliações dos autores:

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: carolsevero5@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-0525-1418.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil  
E-mail: polyenfa@hotmail.com  
ORCID: 0000-0003-1311-7614.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: tainagdiniz@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-2211-1858.

<sup>4</sup>Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: yoh\_0806@hotmail.com.  
ORCID: 0000-0002-1988-3996

<sup>5</sup>Departamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: alexandresegiorsilva@yahoo.com.br  
ORCID: 0000-0003-3576-9023.

<sup>6</sup>Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: mylennesbarros@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-2033-5804

<sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil.  
E-mail: brunorafaelnt@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-2026-5025

<sup>8</sup>Departamento de Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. E-mail: nge@academico.ufpb.br  
ORCID: 0000-0001-8902-0515

<sup>9</sup>Unidade de Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. Email: queirogaisabella@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-1127-718X.

<sup>10</sup>Unidade de Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. Email: mariinagm@hotmail.com  
ORCID: 0000-0003-3112-3030

<sup>11\*</sup>Autor Correspondente: PhD. Darlene Camati Persuhn. Departamento de Biologia Molecular e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa/PB, Brasil. CEP:58051-900. E-mail: darlenecp@hotmail.com  
ORCID: 0000-0001-5291-5454.

**Abstrato**

Objetivos: analisar se o rs266729 da adiponectina e o rs7539542 do receptor 1 da adiponectina influenciam a ocorrência, aspectos clínicos e metabólicos de pacientes com retinopatia diabética. Métodos: Trata-se de um estudo transversal incluindo pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 com e sem retinopatia que foram subgrupados em grupos genotípicos e comparados quanto a variáveis clínicas, antropométricas e bioquímicas. Resultados: A distribuição dos genótipos rs266729 e rs7539542 foi semelhante nos grupos com retinopatia diabética e sem retinopatia diabética. Não foram encontradas diferenças na idade, IMC, RCQ, pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos. Os parâmetros bioquímicos e antropométricos não diferiram entre os genótipos. A amputação de membros ( $p=0,005$ ) e a terapia com insulina ( $p=0,049$ ) foram mais frequentes nos portadores da alelo rs266729 G, mas apenas os dados de amputação foram resistentes à análise de regressão. O genótipo GG rs7539542 foi associado a níveis mais elevados de HbA1C ( $p=0,019$ ). A combinação de ambos os genótipos G (rs266729 e rs7539542 CG+GG) foi associada à amputação ( $p=0,029$ ) e maior HbA1C ( $p=0,002$ ) e rs266729 CG+GG/rs7539542 GG foi associada à amputação ( $p=0,004$ ), insulino terapia ( $p=0,031$ ) e maior HbA1C (0,004). Conclusão: não encontramos associação entre os rs266729 e rs7539542 e a retinopatia diabética. Pacientes com retinopatia diabética portadores do alelo rs266729 G tiveram maior probabilidade de amputação de membros e a associação com o alelo rs7539542G resultou em pior controle glicêmico.

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

**Abreviaturas**

*Diabetes mellitus* (DM); *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2); Retinopatia diabética (RD); Doença microvascular ocular (DMO); Retinopatia diabética não proliferativa (RDNP); Retinopatia diabética proliferativa (RDP); Promotor de adiponectina (*ADIPOQ*); Receptor 1 de Adiponectina (*ADIPOR1*); *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes* (ACCORD); *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes and the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS); Nível de atividade física (NAF); Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ); Hemoglobina glicada (HbA1c); colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c); colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c); Índice de massa corporal (IMC); circunferência abdominal (CA); Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP); Recordatório alimentar de 24 horas (R24h); Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO); Pressão arterial (PA); Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD).

## Introdução

O diabetes é uma doença crônica, não transmissível, caracterizada por hiperglicemia persistente. Epidemiologicamente, o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) é responsável por mais de 90% dos casos e tem uma associação bem caracterizada com fatores de risco prevalentes, principalmente entre populações de baixa renda, como índice de massa corporal elevado, tabagismo, sedentarismo, nutrição inadequada [1]. Embora iniciativas de saúde pública sejam implementadas e novas informações sejam incorporadas, as taxas globais de mortes e incapacidades causadas pelo diabetes permanecem alarmantes [1, 2].

A medicina diabética de precisão refere-se a uma abordagem para otimizar o diagnóstico, predição, prevenção ou tratamento do diabetes, integrando dados multidimensionais, considerando diferenças individuais [3], incluindo marcadores genéticos que, apesar de terem uma contribuição discriminatória limitada em condições clínicas multifatoriais, como diabetes e suas complicações, têm a vantagem de estar presentes sem qualquer tipo de alteração desde o diagnóstico até estágios mais avançados da patologia [4].

A Retinopatia Diabética (RD) é a doença microvascular ocular (DMV) da diabetes que apresenta fases clínicas caracterizadas por achados oftalmológicos que permitem o enquadramento de retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) moderada, severa e grave ou retinopatia diabética proliferativa (PRD). A progressão da RD pode levar a perda muito significativa da capacidade visual e cegueira, o que torna sua predição um desafio no acompanhamento de pacientes diabéticos. A RD também está associada a outras complicações macro e microvasculares, como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e mortalidade [5, 6], nefropatia diabética [7] e amputação de membros devido a doença arterial periférica [8]. O que torna importante identificar, dentro do grupo de pacientes com RD, aqueles com maior chance de desenvolver comorbidades associadas.

A adiponectina é um hormônio protéico composto por 244 aminoácidos com peso molecular de 28 kDa, derivado de adipócitos, exercendo importantes repercussões metabólicas [9], principalmente em relação ao diabetes, diminuindo a resistência periférica à insulina [10,11]. Níveis plasmáticos mais baixos de adiponectina foram detectados em amostras de pacientes diabéticos em comparação com indivíduos saudáveis em diferentes continentes [11, 12, 13]. A influência dessa adipocina no contexto da RD não está bem caracterizada. Há relatos de que a progressão da doença é acompanhada de aumento da adiponectina [14] e há estudos que mostram o contrário [15]. O pé diabético, que é um importante fator de risco para amputação, também tem sido associado a níveis mais baixos de adiponectina plasmática [16].

Os níveis plasmáticos de adiponectina apresentam porcentagens expressivas de herdabilidade, o que torna relevante o estudo de polimorfismos genéticos que possam mediar essa variação [17]. Um dos polimorfismos mais estudados, por estar localizado na região promotora do gene da adiponectina e possivelmente afetar sua expressão, é o rs266729. A associação do alelo rs266729 G com DM2 foi relatada por meta-análises [18, 19]. Embora já tenha sido amplamente explorado como fator de risco para diabetes, há poucos estudos explorando seu possível envolvimento no risco ou na patogênese da RD [20].

Existem pelo menos três tipos de receptores celulares para mediar os efeitos metabólicos da adiponectina, sendo o receptor tipo 1 (*ADIPOR1*) o mais intimamente relacionado ao efeito de sensibilidade à insulina. O rs7539542 no gene do Receptor 1 da adiponectina (*ADIPOR1*) tem sido associado à doença arterial coronariana em pacientes com DM2 [21] e relevante controle glicêmico e parâmetros antropométricos [22, 23].

Embora existam dados que conectem rs266729 e DM2, rs7539542 e controle glicêmico e parâmetros antropométricos, os estudos dessas variantes na RD são escassos e o papel da adiponectina e dos polimorfismos *ADIPOR1* na patogênese da RD permanece inconclusivo. 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 e rs7539542 sobre os parâmetros bioquímicos, clínicos e antropométricos no contexto do DM2 com e sem pacientes com RD.

## Métodos

### Concepção do Estudo e Aspectos Éticos

Este foi um estudo transversal de base populacional em 360 pacientes do Nordeste brasileiro com diabetes tipo 2, recrutados consecutivamente entre novembro de 2018 e julho de 2022 no Hospital Universitário Lauro Wanderley, localizado em João Pessoa, Paraíba, Brasil. Considerando a influência do tempo de diabetes no desfecho clínico, excluimos os pacientes com tempo de diabetes < 5 anos. Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley (UFPB; Parecer nº: 3053068 (12/03/2018). O protocolo do estudo atende a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Os critérios de inclusão foram diagnóstico de DM2 há pelo menos 5 anos, estando em acompanhamento ambulatorial. Critérios de exclusão: diagnóstico de DM1, amostra de DNA insuficiente ou com resultado inconclusivo na análise genotípica.

### Caracterização clínica

O diagnóstico de RD foi baseado em oftalmoscopia após dilatação pupilar com tropicamida 0,5%. As imagens da retina (mácula e disco central) foram captadas em um ângulo de 45° por uma câmera de fundo. As imagens foram analisadas de acordo com os padrões e recomendações da ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) e do *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) [24, 25]. Pacientes com DM2 sem RD (n = 139) constituíram o grupo controle e o grupo com algum grau de retinopatia constituiu o RD (n = 221). Em relação à classificação de acordo com o estágio de RD, 144 participantes apresentavam retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e 77 deles apresentavam retinopatia diabética proliferativa (RDP).

A pressão arterial (PA) foi verificada de acordo com as recomendações propostas pela *American Heart Association*, *American College of Cardiology* e *American Society of Hypertension* em 2015 [26]. O procedimento consistiu em três aferições da PA, utilizando um monitor de pressão arterial - *Missouri 154M*, com intervalo de 1 minuto entre cada aferição. Os participantes descansaram (pelo menos 5 min) na posição sentada com os pés apoiados no chão e os braços apoiados na mesa antes da aferição.

Para quantificar o nível de atividade física (NAF) dos pacientes, foi utilizada a versão curta do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) [27], que estima o tempo semanal gasto em atividades físicas em diferentes intensidades. Tais atividades incluem atividades diárias como trabalho, transporte, tarefas domésticas e lazer, bem como estimar o tempo gasto em atividades na posição sentada. Esse instrumento foi aplicado individualmente por pesquisadores treinados. De acordo com recomendações recentes da OMS (2020), para ser classificado como ativo, são necessários pelo menos 150 minutos de atividade física moderada ou vigorosa por semana para adultos, incluindo aqueles que vivem com doenças crônicas [28]. Os pacientes foram divididos em dois grupos (ativos e insuficientemente ativos), de acordo com a nomenclatura do IPAQ.

## Medidas clínicas, bioquímicas e antropométricas

Métodos enzimáticos com analisadores automatizados foram usados para análises bioquímicas. Ou seja, hemoglobina glicada (HbA1c) (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO /Brasil); glicose plasmática (método enzimático-colorimétrico) (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO /Brasil); creatinina sérica (método cinético-colorimétrico), proteína C reativa (PCR) (método turbidimétrico), HDL (método enzimático-colorimétrico direto), colesterol total (método enzimático-colorimétrico) e triglicerídeos (método enzimático-colorimétrico Trinder) em um analisador (Selectra XL Flexor – Ore Diagnóstica Ltda; Goiânia-GO/Brasil), com kits padronizados de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de colesterol LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald onde:  $[LDL] = [colesterol\ total] - [HDL] - [triglicerídeos/5]$ .

As medidas antropométricas foram o peso corporal (kg), medido em balança eletrônica com capacidade de até 150 kg e sensibilidade de 100 g (Filizola®). Os indivíduos foram pesados com pesos leve, descalços, postura ereta, pés paralelos e totalmente apoiados na plataforma da balança e com os braços relaxados [29]. A estatura foi medida por meio de um estadiômetro acoplado à balança, que consiste em um tubo de aço com régua de alumínio anodizado, medindo de 97 a 192 cm com divisões de 0,5 cm. Os participantes permaneceram em postura ereta, pés juntos e chinelos encostados na parede. O ápice da orelha e o canto externo do olho formavam uma linha paralela ao chão, formando um ângulo reto de 90° com a barra do estadiômetro; assim, a barra horizontal do estadiômetro foi abaixada e apoiada na cabeça, permitindo a leitura em estatura [29].

Posteriormente, o índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se o peso corporal (kg) pela estatura (metros ao quadrado). Os valores para a idade adulta foram: sobrepeso quando  $IMC = 25-29,9\ kg/m^2$  e obesidade quando  $IMC \geq 30\ kg/m^2$ . Para os idosos, o excesso de peso foi definido como  $IMC = \geq 27\ kg/m^2$ , de acordo com os pontos de corte da Organização Mundial de Saúde [30]. Para aferição da circunferência abdominal (CA), as participantes permaneceram com as pernas afastadas e a fita métrica inelástica passou pela linha umbilical para leitura do resultado. O valor de referência para homens foi 102 cm e para mulheres caucasianas 88 cm [31].

## Isolamento de DNA

A extração de DNA foi realizada em amostras de sangue total obtidas por punção venosa com o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen ®) de acordo com as instruções do fabricante.

## Genótipos rs266729 (*ADIPOQ*) e rs7539542 (*ADIPOR1*)

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP. Pares apropriados de *primers* e respectivas temperaturas de anelamento foram usados para obter os *amplicons* contendo a região polimórfica de cada gene: rs266729 *ADIPOQ* (F:CATCAGAATGTGTGGCTTGC e R:AGAAGCAGCCTGGAGAACTG) [32] e rs7539542 *ADIPOR1* (F:GCACCCAGCCCTGAGAATCT e R:CCGGCTAATCATGGAAGTGTGT) [33]. A temperatura de anelamento para ambas as reações foi de 65°C. O fragmento de 163bp obtido no rs266729 foi digerido com HhaI e os padrões dos fragmentos indicaram a presença do alelo C quando 121 e 42bp apareceram. A presença do fragmento não digerido indicou a presença do alelo G. O fragmento 542 do rs7539542 foi digerido com BsmAI e os fragmentos resultantes de 349 e 193bp indicaram a presença do alelo C. O fragmento não digerido era indicativo do alelo G.

## Consumo dietético

Para estimar o consumo alimentar habitual dos indivíduos, foram realizados três recordatórios alimentares de 24 horas (R24h), dois dias na semana e um correspondente a um dia do final de semana. Uma nutricionista capacitada conforme relato dos entrevistados, contendo informações sobre qual alimento ou bebida foi consumido, aplicou os recordatórios, forma de preparo, marca, ingredientes utilizados no caso das preparações, adição ou não de algum tipo de açúcar, quantidade consumida, tamanho da porção e sua respectiva medida caseira. Após a coleta de dados, todas as informações do R24h foram detalhadas e os alimentos analisados em software de nutrição (Dietwin; Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) [34], que contém mais de cinquenta mil alimentos, com os registros baseados na tabela brasileira Tabela de Composição de Alimentos (TACO) [35].

## Análise estatística

O software SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para análise estatística. A normalidade nas variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e as distribuições com  $p > 0,05$  foram aceitas como variáveis com distribuição normal detectada pelo teste t independente, com valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. 'Não normalmente distribuídos' foram expressos como valores medianos e intervalos de confiança de 95% e comparados pelo teste U de Mann-Whitney entre os grupos. Variáveis categóricas nominais foram expressas em número total e percentual, caminhos por qui-quadrado e expressas com valor de Odds e IC 95%. Os equilíbrios de *Hardy-Weinberg* foram calculados para avaliar as frequências genotípicas e alélicas esperadas e observadas e testados pelo qui-quadrado, valores expressos como valor de Odds e IC 95%. A ANOVA foi realizada nas situações com mais de duas categorias e as variáveis que não seguiram a distribuição normal e/ou homogeneidade foram observadas por meio do teste de Kruskal-Wallis com post-hoc pareado, representado pela mediana e (IC95%). A regressão logística binária foi utilizada para testar possíveis variáveis de influência em variáveis dicotômicas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo para todas as análises.

## Resultados

### Características gerais

Os grupos com e sem RD diferiram quanto ao sexo, com maior número de mulheres no grupo sem RD, assim como maiores valores de IMC, maiores valores nas somas de dobras cutâneas, maior consumo de carboidratos de calorias totais. Já no grupo com RD houve um maior número de insuficientemente ativos, assim como maior duração do DM; maior número de indivíduos em uso de insulino terapia; presença de amputação; valores mais elevados de creatinina sérica e pressão arterial sistólica e diastólica no grupo RD quando comparados ao grupo DM. Os grupos foram homogêneos em relação a idade, histórico familiar de DM, tabagismo, etilismo, infarto, HbA1c, glicose em jejum, colesterol total e suas frações, triglicerídeos, relação C/Q, consumo dietético de proteínas, lipídeos e índice glicêmico (Tabela 1).

### Avaliações antropométricas, bioquímicas e clínicas de acordo com os genótipos rs266729 e rs7539542

A comparação das características antropométricas, bioquímicas e clínicas dos grupos genotípicos são apresentadas na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças para idade, sexo,

IPAQ, tempo de DM, infarto, glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos, creatinina, pressão arterial e nos parâmetros antropométricos. No entanto, a comparação entre os genótipos rs266729 mostrou maior frequência de insulinoterapia e amputação, que foram associadas à presença do alelo G (CG+GG). Quanto ao rs753954, foi encontrado maior percentual de HbA1c no grupo com genótipo GG quando comparado ao grupo com genótipo CC (Tabela 2). Ambos os polimorfismos apresentaram distribuição compatível com o equilíbrio de Hardy Weinberg (rs266729,  $p=0,127$  e rs7539542,  $p=0,977$ ) (Tabelas 3 e 4).

Decidimos testar a associação de ambos os polimorfismos na ocorrência de amputação e nos parâmetros envolvidos no controle glicêmico (HbA1C e insulinoterapia). Para isso, as variáveis amputação e insulinoterapia foram testadas em portadores do alelo G (GG ou CG) em ambos os genótipos (rs266729 e rs7539542) comparados com portadores dos genótipos CC+CC no grupo DM2+RD, que apresentaram associação apenas com amputação com portadores do alelo G ( $p=0,029$ ). A análise também foi realizada comparando a presença do alelo G (CG+GG rs266729) e GG (rs7539542) com CC+CC. A presença do alelo G (rs266729 CG+GG e rs7539542 GG) permaneceu associada à amputação ( $p=0,004$ ) e o mesmo ocorreu com a insulinoterapia (0,031). Quando comparadas amostras apenas de pacientes com diagnóstico de RD, manteve-se a associação com portadores do alelo G em ambos os polimorfismos ( $p=0,029$ ). A associação entre portadores do alelo G em ambos os SNPs e HbA1C foi bastante pronunciada, sendo os percentuais significativamente maiores nos portadores do alelo G ( $p=0,002$ ) (Tabela 5).

**Tabela 1.** Parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos da amostra estudada

|  | <b>DM2<br/>(n=139)</b> | <b>DR<br/>(n= 221)</b> | <b>p-value<br/>OR (IC 95%)</b>      |
|--|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| <b>Idade (anos)</b>                    | 61.4 ±10.4             | 60.9 ±8.9              | 0.678<br>1.03 (-1.61 – 2.46)        |
| <b>Sexo (F%)</b>                       | 101 (72.7%)            | 130 (58.8%)            | <b>0.009*</b><br>1.86 (1.18 – 2.95) |
| <b>Atividade Física (insuficiente)</b> | 42 (26,6%)             | 116 (73.4%)            | <b>0.000*</b><br>0.42 (0.27 – 0.68) |
| <b>Duração do DM (anos)</b>            | 10.3 ± 5.6             | 16.3 ± 7.6             | <b>0.000*</b><br>0.75 (-7.4 – 4.5)  |
| <b>Histórico familiar de DM (%)</b>    | 108 (83.1%)            | 160 (74.8%)            | 0.082<br>1.66 (0.95 – 2.88)         |
| <b>Tabagismo (%)</b>                   | 04 (2.9%)              | 11 (5.0%)              | 0.423<br>0.57 (0.18 – 1.81)         |
| <b>Etilismo (%)</b>                    | 07 (5.0%)              | 12 (5.4%)              | 1.000<br>0.92 (0.36 – 2.41)         |
| <b>Tratamento com insulina (%)</b>     | 56 (40.6%)             | 154 (69.7%)            | <b>0.000*</b><br>0.30 (0.19 – 0.46) |
| <b>IAM (%)</b>                         | 14 (10.1%)             | 21 (9.5%)              | 0.857<br>1.07 (0.52 – 2.17)         |
| <b>Amputação (%)</b>                   | 01 (0.7%)              | 20 (9.0%)              | <b>0.001*</b><br>0.07 (0.01 – 0.55) |
| <b>HbA1c (%)</b>                       | 7.60 (5.3 – 12.5)      | 7.60 (4.7 – 12.4)      | 0.856                               |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>                 | 129.5 (55 – 332)       | 137 (35 – 329)         | 0.636                               |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b>        | 165.5 (100 – 308)      | 170 (74 – 307)         | 0.417                               |
| <b>HDL-c (mg/dL)</b>                   | 42 (8 – 82)            | 42 (22 – 86)           | 0.565                               |
| <b>LDL-c (mg/dL)</b>                   | 88.2 (23.6 - 190.8)    | 94 (17.6 – 202.8)      | 0.293                               |
| <b>Triglycerides (mg/dL)</b>           | 128 (44 – 748)         | 121 (22 – 705)         | 0.724                               |
| <b>Creatinina (mg/dL)</b>              | 0.74 (0.41 – 1.48)     | 0.84 (0.37 - 2.14)     | <b>0.000*</b>                       |
| <b>PAS</b>                             | 130 (90 – 180)         | 140 (90 – 190)         | <b>0.000*</b>                       |
| <b>PAD</b>                             | 80 (54– 180)           | 90 (51 – 120)          | <b>0.003*</b>                       |
| <b>Excesso de peso</b>                 | 114 (82%)              | 151 (68.3%)            | <b>0.011*</b>                       |
| <b>IMC (KG/M<sup>2</sup>)</b>          | 29.67 (19.2 – 46)      | 28.1 (18.7 – 47.2)     | <b>0.005*</b>                       |

|                               |                  |                  |               |
|-------------------------------|------------------|------------------|---------------|
| Relação C/Q                   | 0.96 (0.8– 1.2)  | 0.96 (0.8 – 1.2) | 0.829         |
| Soma das dobras cutâneas (mm) | 93 (36 – 168)    | 88 (29- 150)     | <b>0.000*</b> |
| CHO (Kcal)                    | 588.5±138.4      | 537.8±109.3      | <b>0.002*</b> |
| CHO usual (%)                 | 52.7±5.3         | 52.5± 6.0        | 0.868         |
| PTN (Kcal)                    | 229.7±48         | 229.7±54.5       | 0.999         |
| PTN usual (%)                 | 20.9 (11.4-28.7) | 21.5 (13.6-31.8) | 0.081         |
| LIP (Kcal)                    | 290,1±75,3       | 270.5±80         | 0.056         |
| LIP usual (%)                 | 26.4±4.7         | 26±34.9          | 0.454         |
| Calorias totais               | 1118.6±208.6     | 1048.7±212.4     | <b>0.012*</b> |
| Índice glicêmico dietético    | 85±45.6          | 79±36.5          | 0.276         |

\*p <0,05= diferença estatisticamente significativa. Variáveis quantitativas analisadas pelo teste t independente (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e apresentadas como média e ±DP; As variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney e representadas pela mediana e (IC95%). Variáveis categóricas analisadas pelo teste exato de Fisher, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD); relação C/Q (relação cintura/quadril); IAM= Infarto Agudo do Miocárdio; Insuficiência de atividade física determinada pela análise do IPAQ; colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c); colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c); Os dados de consumo alimentar correspondem aos dados de 246 pacientes.

**Tabela 2.** Parâmetros clínicos, bioquímicos, metabólicos e valores de consumo alimentar habitual de acordo com os genótipos rs266729 (*ADIPOQ*) e rs7539542 (*ADIPOR1*)

|                               | rs266729 ( <i>ADIPOQ</i> ) |                        |                                  | rs7539542 ( <i>ADIPOR1</i> )       |                         |                                   |                                  |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                               | CC<br>(n= 216)             | CG+GG<br>(n=144 )      | p-value<br>OR (IC 95%)           | CC<br>(n= 111)                     | GC<br>(n=176 )          | GG<br>(n=73 )                     | p-value<br>OR (IC 95%)           |
| Tratamento com insulina (%)   | 117<br>(54.2%)             | 93<br>(65%)            | <b>0.049*</b><br>0.6 (0.4 – 1)   | 64<br>(58.2%)                      | 103<br>(58.5%)          | 43<br>(58.9%)                     | 0.995                            |
| IAM (%)                       | 23<br>(10.6%)              | 12<br>(8.3%)           | 0.587<br>1.3 (0.6 – 2.7)         | 14<br>(12.6%)                      | 11<br>(6.3%)            | 10<br>(13.7%)                     | 0.091                            |
| Amputação (%)                 | 06<br>(2.8%)               | 15<br>(10.4%)          | <b>0.005*</b><br>0.2 (0.9 – 0.6) | 05<br>(4.5%)                       | 09<br>(5.1%)            | 07<br>(9.6%)                      | 0.302                            |
| HbA1c (%)                     | 7.5<br>(5.1 – 12.3)        | 7.95<br>(4.7 – 12.5)   | 0.171                            | <b>7.25</b><br><b>(5.1 – 12.5)</b> | 7.6<br>(4.7 – 12.3)     | <b>8.0</b><br><b>(5.3 – 12.1)</b> | <b>0.019*</b><br><b>8.68 (2)</b> |
| Glicose (mg/dL)               | 134.5<br>(35 – 329)        | 134<br>(48 – 332)      | 0.389                            | 135.5<br>(35 – 314)                | 131<br>(50 – 329)       | 138<br>(48 – 332)                 | 0.771<br>0.52 (2)                |
| Colesterol Total (mg/dL)      | 165.5<br>(74 – 308)        | 170<br>(74 – 290)      | 0.979                            | 163.5<br>(74 – 281)                | 172<br>(74 – 308)       | 162<br>(84 – 290)                 | 0.274<br>2.60 (2)                |
| HDL-c (mg/dL)                 | 42<br>(23 – 83)            | 43<br>(8 – 86)         | 0.847                            | 43<br>(8 – 86)                     | 43<br>(16 – 83)         | 39<br>(23 – 75)                   | 0.302<br>2.40 (2)                |
| LDL-c (mg/dL)                 | 92.5<br>(17.6 – 190.8)     | 87.6<br>(31.2 – 202.8) | 0.695                            | 94.7<br>(28.2 – 174.6)             | 106.7<br>(17.6 – 198.2) | 85.8<br>(48.2 – 183)              | 0.226<br>2.97 (2)                |
| Triglicerídeos (mg/dL)        | 122<br>(22 – 705)          | 122.5<br>(35 – 748)    | 0.800                            | 128.5<br>(22 – 748)                | 122<br>(35 – 705)       | 116<br>(37 – 386)                 | 0.433<br>1.67 (2)                |
| Creatinina (mg/dL)            | 0.8<br>(0.4 – 2.1)         | 0.8<br>(0.4 – 1.5)     | 0.082                            | 0.79<br>(0.4 – 2.1)                | 0.79<br>(0.4 – 1.7)     | 0.85<br>(0.4 – 1.7)               | 0.203<br>3.20 (2)                |
| PAS                           | 140<br>(90 – 190)          | 135<br>(98 – 190)      | 0.329                            | 130<br>(12 – 190)                  | 130<br>(12 – 190)       | 140<br>(12 – 190)                 | 0.113<br>4.37 (2)                |
| PAD                           | 90<br>(51 – 130)           | 80<br>(58- 180)        | 0.147                            | 81.2<br>( 8 – 120)                 | 80<br>(8 – 120)         | 80<br>(8 – 116)                   | 0.935<br>0.14 (2)                |
| Excesso de peso               | 162<br>(75%)               | 103<br>(71.5%)         | 0.381<br>0.9 (0.74 – 1.12)       | 78<br>(70.3%)                      | 132<br>(75%)            | 55<br>(75.3%)                     | 0.814                            |
| IMC (KG/M <sup>2</sup> )      | 28.7<br>( 18.7 - 47.2)     | 29.2<br>(19.2 – 46)    | 0.594                            | 28.7<br>(20- 46)                   | 28.8<br>(19 – 45.9)     | 29.3<br>(18.7 - 47.2)             | 0.924<br>0.60 (2)                |
| Relação C/Q                   | 0.96<br>(0.8 – 1.1)        | 0.97<br>(0.8 – 1.2)    | 0.561                            | 0.96<br>(0.8 – 1.2)                | 0.96<br>(0.8 – 1.2)     | 0.96<br>(0.8 – 1.1)               | 0.926<br>0.15 (2)                |
| Soma das dobras cutâneas (mm) | 90<br>(29 – 168)           | 92<br>(36– 150)        | 0.383                            | 92<br>(43– 152)                    | 92<br>(36– 168)         | 88<br>(29– 150)                   | 0.824<br>0.39 (2)                |
| CHO (Kcal)                    | 557.1 ± 127.4              | 581.8 ± 130.5          | 0.154                            | 554.2 ± 119                        | 583.1 ± 129.8           | 544,8 ± 136.9                     | 0.137                            |
| CHO usual                     | 52.7 ± 5.5                 | 52.6 ± 5.8             | 0.429                            | 52.2 ± 5.6                         | 52.1 ± 5.7              | 52.8 ± 5.6                        | 0.751                            |

| (%)                               |                     |                       |               |                    |                     |                     |                   |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| <b>PTN (Kcal)</b>                 | 222 ± 51.7          | 240.8 ± 47.8          | <b>0.007*</b> | 221 ± 48.2         | 236.1 ± 43.5        | 226.6 ± 67.2        | 0.129             |
| <b>PTN usual (%)</b>              | 21<br>(11.4 – 31.8) | 21.5<br>(14.5 – 29.7) | 0.149         | 20.8 (11.4 – 28.4) | 21.1 (12.7 – 31.8)  | 22.4 (14.9 – 31.2)  | 0.266<br>2.65 (2) |
| <b>LIP (Kcal)</b>                 | 277.2 ± 79.5        | 288 ± 75              | 0.292         | 280.7 ± 76,4       | <b>291.7 ± 72.7</b> | <b>258.6 ± 87.5</b> | <b>0.041*</b>     |
| <b>LIP usual (%)</b>              | 26.3±5.1            | 25.9±4.6              | 0.406         | 26.7 ± 5.1         | 26.4 ± 4.6          | 25.1 ± 5.2          | 0.120             |
| <b>Calorias totais</b>            | 1065.6 ± 224.9      | 1123 ± 188            | <b>0.042*</b> | 1074,6 ± 204.3     | 1114.2 ± 179.2      | 1046.5 ± 280.6      | 0.136             |
| <b>Índice glicêmico dietético</b> | 84.3 ± 41.5         | 79.4 ± 42.4           | 0.386         | 82.9 ± 42,6        | 81.6 ± 42.4         | 83.4 ± 40.1         | 0.965             |

\* p < 0,05= diferença estatisticamente significativa. Para (rs266729 - *ADIPOQ*): variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos em valor total (e %) e intervalo de confiança. Variáveis quantitativas analisadas pelo teste t independente (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e apresentadas como média e ±DP; As variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney e representadas pela mediana e (IC95%). Para (rs7539542 - *ADIPORI*), variáveis categóricas analisadas por qui-quadrado com post hoc para resíduos ajustados (para verificar em quais grupos estariam as diferenças estatisticamente significativas, se algum p-valor fosse <0,005), valores expressos em valor total (%) e intervalo de confiança. Variáveis quantitativas analisadas por ANOVA (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e representadas como média e ±DP; As variáveis que não seguiram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc pareado, representado pela mediana e (IC95%) em grupos e identificação representada pelo valor de p, estatística do teste (qui-quadrado) e graus de liberdade. Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD); relação C/Q (relação cintura/quadril); IAM= Infarto Agudo do Miocárdio; colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c); colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c); Os dados de consumo alimentar correspondem aos dados de 246 pacientes.

**Tabela 3.** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *ADIPOQ* rs266729 entre pacientes diabéticos tipo 2 sem DR e RD, RDNP e RDP

| rs266729 ( <i>ADIPOQ</i> ) |                          |                           |                             |                          |                             |                         |                              |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Genótipo s/ Alelos         | DM (n=139)               | RD (n= 221)               | p-valor OR (IC 95%)         | RDNP (n= 144)            | p-valor OR (IC 95%)         | RDP (n= 77)             | p-valor OR (IC 95%)          |
| CC+CG / GG                 | 136(97.8%) / 03 (2.2%)   | 214 (96.8%) / 07 (3.2%)   | 0.746<br>1.48 (0.38 – 5.84) | 141(97.9%) / 03 (2.1%)   | 1.000<br>0.96 (0.19 – 4.86) | 73 (94.8%) / 04 (5.2%)  | 0.251<br>2.48 (0.54 – 11.40) |
| CG+GG / CC                 | 51 (36.7%) / 88 (63.3%)  | 93 (42.1%) / 128 (57.9%)  | 0.322<br>0.80 (0.52 – 1.23) | 60 (41.7%) / 84 (58.3%)  | 0.397<br>0.81 (0.50 – 1.31) | 33 (42.9%) / 44 (57.1%) | 0.386<br>0.77 (0.44 – 1.36)  |
| CC+GG / GC                 | 91 (65.5%) / 48 (34.5%)  | 135 (61.1%) / 86 (38.9%)  | 0.431<br>1.21 (0.78 – 1.88) | 87 (60.4%) / 57 (39.6%)  | 0.392<br>1.24 (0.77 – 2.02) | 48 (62.3%) / 29 (37.7%) | 0.659<br>1.15 (0.64 – 2.04)  |
| C / G                      | 224 (80.6%) / 54 (19.4%) | 342 (77.4%) / 100 (22.6%) | 0.351<br>1.21 (0.84 – 1.76) | 225 (78.1%) / 63 (21.9%) | 0.392<br>1.24 (0.77 – 2.02) | 117 (76%) / 37(24%)     | 0.270<br>1.31 (0.82 – 2.11)  |

Variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. DM: Diabetes mellitus; RD: Retinopatia diabética; RDNP: Retinopatia diabética não proliferativa; RDP: Retinopatia diabética proliferativa. O grupo controle (DM) foi utilizado para comparação com os demais grupos.

**Tabela 4.** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *ADIPORI* rs7539542 entre pacientes diabéticos tipo 2 sem DR e RD, RDNP e RDP

| rs7539542 ( <i>ADIPORI</i> ) |                          |                          |                             |                          |                             |                         |                             |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Genótipo s/ Alelos           | DM (n=139)               | RD (n= 221)              | p-valor OR (IC 95%)         | RDNP (n= 144)            | p-valor OR (IC 95%)         | RDP (n= 77)             | p-valor OR (IC 95%)         |
| CC+GC / GG                   | 115 (82.7%) / 24 (17.3%) | 72 (77.8%) / 49 (22.2%)  | 0.284<br>1.37 (0.80 – 2.35) | 113 (78.5%) / 31 (21.5%) | 0.373<br>1.32 (0.73 – 2.39) | 59 (76.6%) / 18 (23.4%) | 0.287<br>1.46 (0.74 – 2.91) |
| GC+GG / CC                   | 94 (67.6%) / 45 (32.4%)  | 155 (70.1%) / 66 (29.9%) | 0.640<br>0.89 (0.56 – 1.41) | 102 (70.8%) / 42 (29.2%) | 0.607<br>0.86 (0.52 – 1.43) | 53 (68.8%) / 24 (31.2%) | 0.880<br>0.95 (0.52 – 1.72) |

|            |                           |                           |                             |                           |                             |                         |                             |
|------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| CC+GG / GC | 69 (49.6%) / 70 (50.4%)   | 115 (52%) / 106 (48%)     | 0.667<br>0.91 (0.60 – 1.39) | 73 (50.7%) / 71 (49.3%)   | 0.906<br>0.96 (0.60 – 1.53) | 42 (54.5%) / 35 (45.5%) | 0.570<br>0.82 (0.47 – 1.44) |
| G / C      | 118 (42.4%) / 160 (57.6%) | 204 (46.2%) / 238 (53.8%) | 0.356<br>0.86 (1.16)        | 133 (46.2%) / 155 (53.8%) | 0.373<br>1.32 (0.73 – 2.39) | 71 (46.1%) / 83 (53.9%) | 0.480<br>0.86 (0.58 – 1.28) |

Variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. DM: Diabetes mellitus; RD: Retinopatia diabética; RDNP: Retinopatia diabética não proliferativa; RDP: Retinopatia diabética proliferativa. O grupo controle (DM) foi utilizado para comparação com os demais grupos.

**Tabela 5.** Combinação dos genótipos de rs266729 e rs7539452 e insulinoterapia, amputação de membro e níveis de HbA1c

|                   | DM2 + RD          |                   |                  | DM2 + RD          |                   |                  | RD                |                   |                  |
|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|                   | CG/GG + CG/GG     | CC + CC           | P OR (IC 95%)    | CG/GG + GG        | CC + CC           | P OR (IC 95%)    | CG/GG + CG/GG     | CC + CC           | P OR (IC 95%)    |
| <b>Amputação</b>  | 11                | 01                | <b>0.029*</b>    | 05                | 01                | <b>0.004*</b>    | 11                | 01                | <b>0.029*</b>    |
| <b>Amputação</b>  | 93                | 70                | 1.61 (1.29-2.0)  | 20                | 70                | 3.75 (2.21-6.35) | 56                | 39                | 1.56 (1.22-1.98) |
| <b>Insulina +</b> | 67                | 38                | 0.160            | 20                | 38                | <b>0.031*</b>    | 53                | 29                | 0.483            |
| <b>Insulina -</b> | 37                | 33                | 1.21 (0.93-1.57) | 05                | 33                | 2.62(1.08-6.39)  | 14                | 11                | 1.15(0.79-1.69)  |
| <b>HbA1c</b>      | 7.8<br>(4.7-12.2) | 7.0<br>(5.1-11.9) | <b>0.002*</b>    | 8.0<br>(5.3-11.6) | 7.0<br>(5.1-11.9) | <b>0.004*</b>    | 8.0<br>(4.7-12.2) | 6.9<br>(5.1-11.9) | <b>0.009*</b>    |

\* p < 0,05= diferença estatisticamente significativa. Variáveis categóricas analisadas pelo teste exato de fisher, valores expressos em valor total (e percentual) e intervalo de confiança. HbA1c analisada pelo teste U de Mann-Whitney e representada pela mediana e (IC95%).

**Tabela 6.** Modelo de regressão logística analisando a influência dos genótipos rs266729 (*ADIPOQ*) e variáveis metabólicas

|                                | B            | p-valor<br>OR (IC 95%)                  |
|--------------------------------|--------------|---|
| <b>Amputação</b>               | 1.351±0.515  | <b>0.009*</b><br>3.863 (1.408 – 10.600) |
| <b>Tratamento com insulina</b> | 0.408±0.243  | 0.093<br>1.504 (0.934 - 2.422)          |
| <b>Sexo (F)</b>                | -0.009±0.235 | 0.969<br>0.991 (0.625 - 1.570)          |
| <b>Duração do DM2 (anos)</b>   | -0.006±0.016 | 0.718<br>0.994 (0.963 - 1.026)          |
| <b>Idade (anos)</b>            | 0.000± 0.012 | 0.987<br>1.000 (0.977 - 1.024)          |

Fonte: dados da pesquisa. Regressão Logística Binária. Variável dependente: CC x GC+GG (referência GC+GG); \*p<0,05; B = coeficiente de regressão beta ± erro padrão; OR = limites superior e inferior de odds; Tratamento com insulina (uso da insulina como referência); Gênero (feminino como referência).

**Tabela 7.** Modelo de regressão logística analisando a influência dos genótipos (CC+CC) de rs266729 (*ADIPOQ*) e rs7539542 (*ADIPOR1*) e variáveis metabólicas

|                                | B            | p-valor<br>OR (IC 95%)                |
|--------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| <b>Amputação</b>               | -2.180±1.090 | <b>0.045*</b><br>0.113 (0.013- 0.957) |
| <b>Tratamento com insulina</b> | -0.361±0.350 | 0.303<br>0.697 (0.351-1.385)          |
| <b>Sexo (F)</b>                | -0.251±0.344 | 0.466<br>0.778 (0.396-1.528)          |
| <b>Duração do DM2 (anos)</b>   | 0.000±0.023  | 0.983<br>1.000 (0.956-1.047)          |

|              |             |                              |
|--------------|-------------|------------------------------|
| Idade (anos) | 0.756±1.188 | 0.989<br>0.989 (0.954-1.025) |
|--------------|-------------|------------------------------|

Fonte: dados da pesquisa. Regressão Logística Binária. Variável dependente: CC+CC x GC+GG+GC+GG (referência CC+CC); \*p<0,05; B = coeficiente de regressão beta ± erro padrão; OR = limites superior e inferior de odds; Tratamento com insulina (uso da insulina como referência); Gênero (feminino como referência).

## Discussão

No presente estudo, encontramos associação do alelo G do rs266729 na adiponectina e amputação de membros e terapia com insulina, enquanto o *ADIPOR1* rs7539542 foi associado aos níveis de HbA1C. Ambos os polimorfismos não influenciaram a ocorrência ou estágios de RD, parâmetros lipídicos e variáveis antropométricas na população estudada.

A associação entre baixos níveis de adiponectina e DM2 foi demonstrada em populações mediterrâneas [36], hispânicos e afro-americanos [11], chineses [13]. O rs266729 representa uma substituição C/G no -11377 localizado na região promotora do *ADIPOQ* que se sobrepõe aos sítios dos fatores de transcrição *Sp1* resultando em menor atividade de transcrição no G (alelo menor) [37]. Como possível consequência, os genótipos rs266729 podem influenciar os níveis plasmáticos de adiponectina, com valores mais baixos associados à presença do alelo G e este mesmo alelo foi associado ao DM2 [38]. No entanto, um estudo com pacientes diabéticos da Jordânia mostrou que, embora os níveis de adiponectina sejam mais baixos em pacientes com pior controle glicêmico, o rs266729 não influenciou essa associação [39]. Neste estudo, verificamos que os portadores do alelo rs266729 G são mais propensos a necessitar de insulinoterapia, o que indica maior dificuldade no controle glicêmico e resistência à insulina. Uma das hipóteses para explicar essa associação é que nesse background genético, nas condições testadas, os níveis de adiponectina podem ser menores.

Este é o segundo estudo que avalia a distribuição genotípica de amostras rs266729 com e sem RD, o primeiro em uma população latino-americana. Não encontramos associação entre genótipos ou alelos e RD e seus estágios (RDNP e RDP). Resultado semelhante foi encontrado por Li *et al.*, em amostras de pacientes diabéticos chineses. No entanto, quando analisaram a mesma associação apenas em pacientes sob terapia com insulina, encontraram um resultado significativo na interação entre o alelo rs266729 G e a terapia com insulina em pacientes com RD [40, 41]. Analisamos a distribuição genotípica em ambos os grupos, com e sem RD nas amostras de pacientes em tratamento com insulina neste estudo e não encontramos a mesma relação. Curiosamente, a presença do alelo G em rs266729 foi relacionada à insulinoterapia na amostra estudada. Portanto, esses dados mostram uma conexão, mas diferentemente do que ocorreu com a amostra estudada por Li *et al.*, não influenciou na ocorrência de RD. Algumas particularidades diferem a amostra chinesa da que estudamos, além da diferença étnica, pois ela foi equilibrada entre os grupos teste e controle em termos de duração do diabetes, gênero, PAS, PAD, parâmetros antropométricos. É possível que a menor homogeneidade de nossa amostra tenha dificultado a possibilidade de encontrar associações entre o polimorfismo e o desfecho clínico.

A associação inédita encontrada neste trabalho é entre ser portador do alelo rs266729 G e a presença de amputação de membros inferiores em pacientes com RD. Embora as variantes rs266729 já tenham sido associadas com aumento do risco cardiovascular em estudos asiáticos e europeus [42, 43], para nosso melhor entendimento, esta é a primeira vez que a associação com amputação de membros é relatada.

A associação entre os níveis de adiponectina e aspectos fisiopatológicos relacionados à amputação de membros é discutida, mas as conclusões não são homogêneas. A elevação da adiponectina plasmática associada à calcificação arterial periférica no DM2 foi relatada [41], mas a expressão da adiponectina vascular já é observada nos estágios iniciais da calcificação. Os autores sugerem que a secreção de adiponectina poderia desempenhar um mecanismo

compensatório contra o processo de calcificação. Outro estudo realizado com mulheres saudáveis mostrou uma associação entre níveis mais baixos de adiponectina e Doença Arterial Periférica Sintomática Incidente em uma abordagem prospectiva [44]. Achados semelhantes foram encontrados na população masculina, alinhando os níveis mais baixos de adiponectina e o aumento da doença arterial periférica, demonstrando que a relação parece independente do gênero [45].

Neste estudo, não avaliamos os níveis de adiponectina, mas descobrimos que o genótipo rs266729 (alelo G), que apresenta evidências de níveis mais baixos desse biomarcador, está associado à ocorrência de amputação em pacientes com diabetes. E o mesmo alelo também foi associado à terapia com insulina, que é um dos fatores de risco para doença vascular periférica [46].

Em relação ao consumo alimentar, no presente estudo, a associação entre o alelo rs266729 G e maior consumo energético total e energético proteico apareceu na comparação dos grupos de genótipos. Um estudo longitudinal com crianças sugeriu que polimorfismos no promotor da adiponectina podem influenciar a ingestão calórica; e que especificamente o alelo rs266729 G está associado a um perfil lipídico pior. De fato, o efeito foi observado com o *ADIPOQ*-rs17300539 que está em forte desequilíbrio de ligação com o *ADIPOQ*-rs266729, sugerindo que os dois polimorfismos exercem o mesmo efeito na ingestão de energia, independentemente de serem analisados isoladamente ou em conjunto [47, 48]. A evidência de uma associação entre polimorfismos na adiponectina e ingestão de energia é escassa e precisa ser mais investigada.

*ADIPORI* é um dos receptores celulares através dos quais a adiponectina exerce seus efeitos biológicos, inibindo a gliconeogênese, estimulando a oxidação de ácidos graxos e reduzindo a inflamação [49]. Em uma população mexicana, o alelo G foi associado com maior soma de dobras cutâneas, IMC e circunferência da cintura [23]. Não encontramos associação dos genótipos rs7539542 e IMC, somatório de dobras cutâneas e relação cintura quadril. O alelo G de rs7539542 foi associado à doença arterial coronariana em pacientes não diabéticos [50] e também em pacientes com DM2 [21]. A associação com insulina mais alta e glicemia de jejum encontrada em portadores do genótipo CC no Estudo Finlandês de Prevenção de Diabetes em indivíduos com tolerância diminuída à glicose [22], o que também estimulou nosso interesse por esse alvo. Um estudo interessante que avaliou o efeito de polimorfismos e sensibilidade à insulina em indivíduos americanos saudáveis identificou uma discrepância dependente da raça em rs7539542. Enquanto nos afro-americanos o alelo associado à sensibilidade à insulina era G (CG+GG), nos brancos essa associação foi encontrada no genótipo CC [51]. Neste estudo, não encontramos associação entre rs7539542 e RD ou os estágios, mas níveis mais baixos de HbA1C no grupo CC, o que é perfeitamente compatível com o resultado encontrado na população branca americana genótipo previamente estudado [51].

Encorajados pelos efeitos da adiponectina rs266729 G na insulinoterapia e ocorrência de amputação e *ADIPORI* rs7539542 no controle glicêmico (HbA1C), decidimos testar a possibilidade de uma sinergia. É relevante notar que entre os 360 pacientes do estudo, 71 (~20%) apresentavam a combinação dos genótipos CC/CC e destes, apenas 1 (1,4%) apresentava amputação. Embora a associação estatisticamente mais significativa tenha sido entre o alelo G rs266729 e amputação, essa associação permaneceu quando testamos a combinação de portadores de ambos os alelos G (rs266729 e rs7539542) x portadores de ambos os genótipos CC. E a associação ficou ainda mais forte quando a limitamos à combinação rs266729CG+GG /rs7539542GG x portadores de duplo CC. Esta informação sugere que pode haver um mecanismo sinérgico entre os dois SNPs estudados. E isso faz sentido, pois ambos parecem ter impacto no controle glicêmico da população estudada. Quando testamos o efeito simultâneo dos SNPs na HbA1C, verificamos que portadores do alelo G em ambos os SNPs x portadores dos genótipos CC/CC apresentaram valores significativamente maiores, sugerindo

que o efeito observado na ocorrência de amputação é consequência do comprometimento controle glicêmico.

Nossos resultados demonstram pela primeira vez a possibilidade de um marcador genético no gene da adiponectina como risco de amputação em pacientes com RD. Embora o resultado seja estatisticamente significativo em diferentes cenários, o número de amputados é pequeno e os dados precisam ser confirmados em amostras maiores e em outras populações. Um ponto fraco deste estudo é que ele não apresenta a dosagem de adiponectina, o que seria importante para testar a hipótese de que o efeito do genótipo rs266729 é mediado pelos níveis de adipocinas. O fato de ser um estudo transversal apresenta limitações quanto à associação causal entre genótipo e fenótipo. Acreditamos que as informações aqui relatadas são um dado preliminar importante que abre a possibilidade de identificar marcadores genéticos para identificar o risco de amputação em pacientes diabéticos com RD. Para isso é necessário realizar estudos longitudinais.

## **Conclusão**

Não encontramos associação entre os polimorfismos *ADIPOQ* rs266729 e *ADIPOR1* rs7539542 e a Retinopatia Diabética. Esses marcadores também não se associaram aos parâmetros antropométricos, mas influenciaram o controle glicêmico, sendo o rs266729 associado à insulino terapia e o rs7539542 à HbA1C. A retinopatia diabética portadores do alelo rs266729 G são mais propensos à amputação de membros. A combinação de rs266729 e rs7539542 poderia atuar sinergicamente para favorecer a doença vascular periférica e impactar o controle glicêmico em pacientes com DM2. Esta informação precisa ser confirmada estudos longitudinais.

## **Reconhecimentos**

Agradecemos ao Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba e a todos os participantes do estudo pela participação e às instituições financiadoras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil).

## **Declarações de contribuição dos autores**

CSA foi responsável pela coleta de amostras biológicas, análises experimentais, redação do manuscrito, VPSB responsável pela coleta de material biológico, TGD e BRVS foi responsável pela coleta de dados clínicos, antropométricos e nutricionais, YO foi responsável por analisar dados nutricionais, ASS foi responsável por coordenação das análises laboratoriais e revisão do manuscrito, MSB foi responsável pelas análises moleculares, NGE apoio nas análises experimentais, IWQE e MFMV foram responsáveis 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.

## **Financiamento**

Este estudo foi apoiado pela Chamada Pública n. 005/2020 Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil) Ministério da Saúde / Decit/SCTIE (Decit/SCTIE/MS), Secretaria Estadual de Saúde (SES/ Paraíba/Brasil); Auxílio 05/2021, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil). Também contou com o apoio da Chamada Pública n. 03/2020 Produtividade em Pesquisa Auxílio PROPEQS/PRPG/UFPB n. PIA13262-2020 e Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

### Conformidade com os padrões éticos

#### Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

#### Referências

1. GBD 2019 Diabetes in the Americas Collaborators. Burden of diabetes and hyperglycaemia in adults in the Americas, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022 Sep;10(9):655-667. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00186-3. PMID: 35850129.
2. Duncan BB, Schmidt MI, Ewerton Cousin, Moradi-Lakeh M, Passos VMA, França EB, Marinho F, Mokdad AH. The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil-past and present: findings from the Global Burden of Disease Study 2015. *Diabetol Metab Syndr.* 2017 Mar 14;9:18. doi: 10.1186/s13098-017-0216-2. PMID: 28293304
3. Chung WK, Erion K, Florez JC, Hattersley AT, Hivert MF, Lee CG, McCarthy MI, Nolan JJ, Norris JM, Pearson ER, Philipson L, McElvaine AT, Cefalu WT, Rich SS, Franks PW. Precision medicine in diabetes: a Consensus Report from the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* 2020 Sep; 63(9):1671-1693. doi: 10.1007/s00125-020-05181-w. PMID: 32556613.
4. Schiborn C, Schulze MB. Precision prognostics for the development of complications in diabetes. *Diabetologia.* 2022 Nov; 65(11):1867-1882. doi: 10.1007/s00125-022-05731-4. PMID: 35727346.
5. Xie J, Ikram MK, Cotch MF, Klein B, Varma R, Shaw JE, Klein R, Mitchell P, Lamoureux EL, Wong TY. Association of Diabetic Macular Edema and Proliferative Diabetic Retinopathy With Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Ophthalmol.* 2017 Jun 1;135(6):586-593. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.0988. PMID: 28472362.
6. Modjtahedi BS, Wu J, Luong TQ, Gandhi NK, Fong DS, Chen W. Severity of Diabetic Retinopathy and the Risk of Future Cerebrovascular Disease, Cardiovascular Disease, and All-Cause Mortality. *Ophthalmology.* 2021 Aug;128(8):1169-1179. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.12.019. PMID: 33359888.
7. Jiang S, Yu T, Zhang Z, et al. Diagnostic Performance of Retinopathy in the Detection of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of 45 Studies. *Ophthalmic Res.* 2019;62(2):68-79. doi: 10.1159/000500833. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31256153.
8. Behroozian A, Beckman JA. Microvascular Disease Increases Amputation in Patients With Peripheral Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Mar; 40(3): 534-540. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312859. PMID: 32075418.
9. Aljafary MA, Al-Suhaimi EA. Adiponectin System (Rescue Hormone): The Missing Link between Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Pharmaceutics.* 2022 Jul 7;14(7):1430. doi: 10.3390/pharmaceutics14071430. PMID: 35890325.
10. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12152-62. doi: 10.1074/jbc.M311113200. PMID: 14699128.
11. Hanley AJ, Wagenknecht LE, Norris JM, Bergman R, Anderson A, Chen YI, Lorenzo C, Haffner SM. Adiponectin and the incidence of type 2 diabetes in Hispanics and African Americans: the IRAS Family Study. *Diabetes Care.* 2011 Oct;34(10):2231-6. doi: 10.2337/dc11-0531. PMID: 21816973.

12. Coltell O, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Portolés O, Asensio EM, Saiz C, Barragán R, Estruch R, Corella D. Circulating Adiponectin and Its Association with Metabolic Traits and Type 2 Diabetes: Gene-Diet Interactions Focusing on Selected Gene Variants and at the Genome-Wide Level in High-Cardiovascular Risk Mediterranean Subjects. *Nutrients*. 2021 Feb 7;13(2):541. doi: 10.3390/nu13020541. PMID: 33562295.
13. Wang Y, Meng RW, Kunutsor SK, Chowdhury R, Yuan JM, Koh WP, Pan A. Plasma adiponectin levels and type 2 diabetes risk: a nested case-control study in a Chinese population and an updated meta-analysis. *Sci Rep*. 2018 Jan 10;8(1):406. doi: 10.1038/s41598-017-18709-9. PMID: 29321603.
14. Kato K, Osawa H, Ochi M, Kusunoki Y, Ebisui O, Ohno K, Ohashi J, Shimizu I, Fujii Y, Tanimoto M, Makino H. Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Mar;68(3):442-9. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.03063.x. PMID: 17970779.
15. Yilmaz MI, Sonmez A, Acikel C, Celik T, Bingol N, Pinar M, Bayraktar Z, Ozata M. Adiponectin may play a part in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*. 2004 Jul;151(1):135-40. doi: 10.1530/eje.0.1510135. PMID: 15248834.
16. 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; 9(1):1-7. doi: 10.1186/1475-2840-9-50. PMID: 20836881
17. Williams PT. Quantile-dependent expressivity of plasma adiponectin concentrations may explain its sex-specific heritability, gene-environment interactions, and genotype-specific response to postprandial lipemia. *PeerJ*. 2020 Oct 14;8:e10099. doi: 10.7717/peerj.10099. PMID: 33088620.
18. 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.0000000000008745. PMID: 29381968.
19. Wu L, Wang CC. Genetic variants in promoter regions associated with type 2 diabetes mellitus: A large-scale meta-analysis and subgroup analysis. *J Cell Biochem*. 2019 Aug;120(8):13012-13025. doi: 10.1002/jcb.28572. PMID: 30860284.
20. 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. PMID: 25621134.
21. Soccio T, Zhang YY, Bacci S, Mlynarski W, Placha G, Raggio G, Di Paola R, Marucci A, Johnstone MT, Gervino EV, Abumrad NA, Klein S, Trischitta V, Doria A. Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2763-70. doi: 10.2337/db06-0613. PMID: 17003341.
22. Siitonen N, Pulkkinen L, Mager U, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Laakso M, Uusitupa M. Association of sequence variations in the gene encoding adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) with body size and insulin levels. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia*. 2006 Aug;49(8):1795-805. doi: 10.1007/s00125-006-0291-7. PMID: 16724230.
23. Richardson DK, Schneider J, Fourcaudot MJ, Rodriguez LM, Arya R, Dyer TD, Almasy L, Blangero J, Stern MP, Defronzo RA, Duggirala R, Jenkinson CP. Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans. *Diabetologia*. 2006 Oct;49(10):2317-28. doi: 10.1007/s00125-006-0384-3. PMID: 16955209.
24. Chew EY, Ambrosius WT, Howard LT, Greven CM, Johnson S, Danis RP, Davis MD, Genuth S, Domanski M; ACCORD Study Group. Rationale, design, and methods of the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Eye Study (ACCORD-EYE). *Am J Cardiol*. 2007 Jun 18;99(12A):103i-111i. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.03.028. PMID: 17599420.
25. Gangnon RE, Davis MD, Hubbard LD, Aiello LM, Chew EY, Ferris FL 3rd, Fisher MR; Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. A severity scale for diabetic macular

- edema developed from ETDRS data. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Nov;49(11):5041-7. doi: 10.1167/iovs.08-2231. PMID: 18539929.
26. Jennings GL. A New Guideline on Treatment of Hypertension in Those with Coronary Artery Disease: Scientific Statement From the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension About Treatment of Hypertension in Patients with Coronary Artery Disease. Heart Lung Circ. 2015 Nov;24(11):1037-40. doi: 10.1016/j.hlc.2015.05.022. PMID: 26205991.
27. Matsudo S, Araújo T, Marsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira L, Braggion G. International physical activity questionnaire (IPAQ): study of validity and reliability in Brazil. Rev Bras ativ fis saúde. 2011 fev; 6(2): 05-18.
28. Bull FC, Al-Ansari SS, Biddle S, Borodulin K, Buman MP, Cardon G, Carty C, Chaput JP, Chastin S, Chou R, Dempsey PC, DiPietro L, Ekelund U, Firth J, Friedenreich CM, Garcia L, Gichu M, Jago R, Katzmarzyk PT, Lambert E, Leitzmann M, Milton K, Ortega FB, Ranasinghe C, Stamatakis E, Tiedemann A, Troiano RP, van der Ploeg HP, Wari V, Willumsen JF. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. Br J Sports Med. 2020 Dec;54(24):1451-1462. doi: 10.1136/bjsports-2020-102955. PMID: 33239350.
29. Ministério da Saúde (2011). SISVAN – FOOD AND NUTRITIONAL SURVEILLANCE SYSTEM: Basic Guidelines for the Collection, Processing, Data Analysis and Information in Health Services. Ministry of Health, Secretariat of Health Care, Department of Primary Care. – Brasília: Ministry of Health, 2011. 76. Available online at: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes\\_coleta\\_analise\\_dados\\_antropometricos.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf) (accessed January, 2023)
30. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser. 1995;854:1-452. PMID: 8594834.
31. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation. 2002 Dec 17;106(25):3143-421. PMID: 12485966.
32. 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. PMID: 19324915.
33. Jin Z, Pu L, Sun L, Chen W, Nan N, Li H, Zhu H, Yang X, Wang N, Hui J, Zhang Y, Zhou Q, Zhao F, Yang F, Shi X, Zhu X, Yang Y, Zhang W, Zheng C, Li X, Yang D, Jia R, Meng S, Yang Z. 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. 2014 Jun 26;9(6):e100339. doi: 10.1371/journal.pone.0100339. PMID: 24967709.
34. Reinstein, CSB. DietWin Software de avaliação nutricional. Porto. Alegre: Brubins. 2008.
35. de Estudos N, em Alimentação, P. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO); versão II. Campinas: Flamboyant.2006.
36. Coltell O, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Portolés O, Asensio EM, Saiz C, Barragán R, Estruch R, Corella D. Circulating Adiponectin and Its Association with Metabolic Traits and Type 2 Diabetes: Gene-Diet Interactions Focusing on Selected Gene Variants and at the Genome-Wide Level in High-Cardiovascular Risk Mediterranean Subjects. Nutrients. 2021 Feb; 13(2):541. doi:10.3390/nu13020541. PMID: 33562295.
37. 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. PMID: 18599322.
38. Alimi M, Goodarzi MT, Nekoei M. 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. J Diabetes Metab Disord. 2021 Feb; 20(1):87-93. doi: 10.1007/s40200-020-00715-w. PMID: 34222061.
39. Alfaqih MA, Al-Hawamdeh A, Amarin ZO, Khader YS, Mhedat K, Allouh MZ. Single Nucleotide Polymorphism in the ADIPOQ Gene Modifies Adiponectin Levels and Glycemic Control

- in Type Two Diabetes Mellitus Patients. *Biomed Res Int.* 2022 Apr; 2022:6632442. doi: 10.1155/2022/6632442. PMID: 35528179.
40. 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. PMID: 25621134.
  41. 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, Witasp 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; 11:32. doi: 10.1186/s13098-019-0429-7. PMID: 31168327.
  42. Kanu JS, Qiu S, Cheng Y, Li R, Kou C, Gu Y, Bai Y, Shi J, Li Y, Liu Y, Yu Y, Liu Y 2018. Associations between three common single nucleotide polymorphisms (rs266729, rs2241766, and rs1501299) of *ADIPOQ* and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2018 May; 17(1):126. doi: 10.1186/s12944-018-0767-8. PMID: 29807528.
  43. 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; 13:40. doi: 10.1186/1471-2350-13-40. PMID: 22639977.
  44. 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; 124(21):2303-11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.045187. PMID: 22025604.
  45. Joosten MM, Joshipura KJ, Pai JK, Bertolia 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. PMID: 23448969.
  46. Behroozian A, Beckman JA. Microvascular Disease Increases Amputation in Patients With Peripheral Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020; 40(3):534-540. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312859. PMID: 32075418.
  47. 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. PMID: 24343628.
  48. Kroll C, Mastroeni SSBS, Veugelers PJ, Mastroeni MF. Associations of *ADIPOQ* and *LEP* Gene Variants with Energy Intake: A Systematic Review. *Nutrients.* 2019 Mar; 11(4):750. doi: 10.3390/nu11040750. PMID: 30935050.
  49. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of *AdipoR1* and *AdipoR2* causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 2007 Mar; 13(3):332-9. doi: 10.1038/nm1557. PMID: 17268472.
  50. Li H, Yang Z, Pu LM, Li X, Ruan Y, Yang F, Meng S, Yang D, Yao W, Fu H, Zhang F, Jin ZN. Adiponectin receptor 1 and small ubiquitin-like modifier 4 polymorphisms are associated with risk of coronary artery disease without diabetes. *J Geriatr Cardiol.* 2016 Sep; 13(9):776-782. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2016.09.001. PMID: 27899942.
  51. Rasmussen-Torvik LJ, Pankow JS, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. The association of SNPs in *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, and *ADIPOR2* with insulin sensitivity in a cohort of adolescents and their parents. *Hum Genet.* 2009 Feb; 125(1):21-8. doi: 10.1007/s00439-008-0595-4. PMID: 19037660.

**APÊNDICE C**  
**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 Tainá Gomes Diniz, Caroline Severo de Assis e Bruno Rafael Virginio de Sousa, todos doutorandos 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 em uma 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 realização do exame de fundo de olho para o diagnóstico da Retinopatia Diabética* 4) *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 tende 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 \_\_\_\_\_

---

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) 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: cep.hulw@ebserh.gov.br Campus I – Fone: 3206—070.

**APÊNDICE D**  
**INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS**

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

- 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 ( ) Não sabe
- Fatores de risco para complicações vasculares:
 

|                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| S ( ) N ( ) tabagismo    | S ( ) N ( ) etilismo          |
| S ( ) N ( ) sedentarismo | S ( ) N ( ) HAS há _____ anos |
| 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
  - ( ) SRD ( ) 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/m <sup>2</sup> )<br>Estado Nutricional: |
| <b>CIRCUNFERÊNCIAS</b>  |                  |  |
| Cintura(cm):  | Quadril(cm):     | Relação C/Q:<br>Resultado:                     |
| <b>DOBRAS CUTÂNEAS</b><br>(Referência DURNIN E WOMERSLEY, 1974) |                  |  |
| Tricipital(mm):   | Bicipital(mm):   |  |
| Subscapular (mm):   | Suprailiaca(mm): |  |
| <b>Percentual de gordura (%):</b>                               |                  |  |

## APÊNDICE E

### Estudos com Vitamina D e com polimorfismos em VDR no contexto de Diabetes e Retinopatia

| Título/ano   | Objetivo   | População/<br>Etnia   | Sexo/ Idade  | Inclusão /<br>Estudos elegíveis   | Exclusão  | N do estudo                  | Principais achados e conclusão  |
|--|--|---|--|---|---|------------------------------|---|
| <b>VITAMINA D</b>  |  |   |  |   |   |                              |   |
| <p><b>The Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis</b></p> <p>LI <i>et al.</i>, 2018</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872793/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5872793/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Avaliar os efeitos da suplementação oral de vitamina D no controle glicêmico em pacientes com DM2 em comparação com um placebo e avaliar as influências de vários fatores nos efeitos da suplementação.</p> | <p>8 estudos no Oriente Médio (7 no Irã e 1 nos Emirados Árabes Unidos);</p> <p>4 estudos de outros países Asiáticos (3 na Coreia e 1 na China)</p> <p>7 estudos de outras etnias (1 Nigéria, 1 Noruega, 1 Dinamarca, 1 Países Baixos, 1 Itália e 2 estudos no Reino Unido);</p> <p>E um estudo foi realizado em 33 países com participantes maioritariamente dos 48 aos 67 anos. A duração da intervenção variou de 2 a 6 meses (mediana foi de 3 meses).</p> <p>A vitamina D3 foi usada em 17 estudos e a vitamina D2 em um estudo, enquanto os outros dois falharam em relatar o tipo em detalhes. Apenas dois ensaios aplicaram co-suplementação de vitamina D e cálcio</p> | <p>Ambos os sexos</p> <p>Idade:<br/>Mínima: 47 anos<br/>Máxima: 73,27 anos</p> | <p>(1) ensaios clínicos randomizados que avaliassem o efeito glicêmico da suplementação de vitamina D em pacientes com DM2; (2) utilizassem formulações orais de vitamina D contendo colecalciferol ou ergocalciferol; (3) relatarem pelo menos um dos seguintes desfechos: concentração sérica de 25(OH)D, FBG, HbA1c, HOMA-IR e insulina em jejum; e (4) duração do estudo <math>\geq 8</math> semanas.</p> | <p>(1) entrega intramuscular de vitamina D com diferentes absorções entre as vias oral e intramuscular; (2) estudos envolvendo participantes com diabetes tipo 1 (DM1), diabetes gestacional ou condições que potencialmente alterassem o metabolismo da vitamina D (doença renal crônica estágio 4 ou superior, ou hiperparatireoidismo); (3) estudos envolvendo participantes <math>&lt; 18</math> anos; (4) estudos nos quais controles não placebo, como cálcio, foram permitidos quando administrados a ambos os grupos; e (5) estudos observacionais, artigos de revisão, relatos de casos, editoriais e resumos de pôsteres.</p> | <p>20 estudos (n = 2703)</p> | <p>Desesseis dos 20 estudos relataram haver um aumento significativo no nível sérico de vitamina D (VD) no grupo de suplementação de VD;</p> <p>Treze estudos relataram que no geral após a suplementação de VD, não foram observadas diferenças na redução da glicemia em jejum entre os grupos de intervenção e controle, apenas em um subgrupo do Oriente Médio essa redução foi verificada (dose <math>&gt; 2.000</math> UI/dia, duração do estudo <math>\leq 3</math> meses e em pacientes com deficiência basal de vitamina D).</p> <p>Efeitos heterogêneos foram observados nos percentuais de HbA1c nos estudos, apenas em subgrupos com obesidade as diferenças em HbA1c significativamente a favor do grupo controle.</p> <p>O efeito da suplementação de vitamina D no HOMA-IR foi avaliado em sete estudos (n = 409) e foi encontrada uma redução maior de HOMA-IR nos grupos de intervenção do que nos grupos placebo.</p> <p>Apenas quatro estudos (n = 364) mediram a insulina em jejum. Os resultados não mostraram efeito significativo da suplementação de vitamina D na insulina em jejum. No entanto, as alterações preferenciais se manifestaram nos subgrupos: outros asiáticos, IMC normal, dose de vitamina D <math>\leq 2.000</math> UI/dia e HbA1c basal <math>&gt; 7\%</math>. Em contraste, outras etnias e subgrupos de obesidade mostraram mudanças preferenciais</p> |

|   |   |  |   |   |   |   |  |
|---|---|--|---|---|---|---|--|
|   |   | (mesmas doses de cálcio também administradas a grupos de controle). Os outros estudos forneceram apenas suplementação de vitamina D. |   |   |   |   | que foram significativamente a favor do grupo controle.<br><br>Conclusão: em comparação com o placebo, a suplementação oral de vitamina D produziu melhores efeitos no HOMA-IR em pacientes com DM2, embora o resultado não tenha sido muito robusto ao excluir estudos um por um, e estava sujeito a heterogeneidade substancial em parte devido à diversidade entre durações, etnias, IMCs e níveis basais de vitamina D em todos os estudos. Em contraste, não foram observados benefícios da suplementação de vitamina D em relação à melhora da glicemia em jejum, HbA1c e insulina em jejum.   |
| <p><b>Efficacy of vitamin D supplementation in gestational diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of randomized trials</b></p> <p>RODRIGUES <i>et al.</i>, 2019</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6430411/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6430411/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Avaliar se os suplementos orais de vitamina D, quando administrados a mulheres grávidas com diabetes mellitus gestacional (DMG), melhorariam os resultados maternos e neonatais, em comparação com nenhum tratamento ou placebo.</p> | <p>Quatro estudos no Irã e 2 na China.</p>   | <p>Mulheres; Idade mínima 28,7 anos e máxima 31,8 anos.</p> | <p>Ensaios clínicos randomizados (RCT), que adotaram a estrutura de resultado de comparação de intervenção do paciente.</p> <p>Gestantes com diagnóstico de DMG, diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação pela glicemia de jejum ou teste oral de tolerância à glicose.</p> | <p>Estudos de mulheres grávidas sem DMG, com distúrbio metabólico de cálcio, diabetes conhecido antes da gravidez e diabetes diagnosticado no primeiro trimestre de gestação.</p> | <p>Seis estudos foram incluídos, totalizando 454 gestantes com DMG. Os ensaios foram publicados entre 2013 e 2016.</p> <p>Nos 4 ensaios iranianos, o grupos de intervenção receberam 50.000 UI de vitamina D 3 a cada 2 semanas. Em um estudo Chinês (Zhang, 2016), houve mais de um grupo de intervenção, e a dose máxima de vitamina D3 foi de 50.000 UI a cada 2 semanas. No outro estudo com Chineses (Li <i>et al.</i>, 2016), a suplementação de vitamina D ocorreu por meio de uma bebida de</p> | <p>Diminuição da glicemia de jejum ao final do ensaio foi relatada e a metanálise apresentou diferença significativa entre os grupos, favorecendo o grupo suplementado.</p> <p>Outros achados: menor necessidade de internações nos grupos que receberam suplementação de VD; filhos de mulheres com DMG e sem suplementação de vitamina D eram mais propensos a necessitar de internação, apresentando uma diferença de risco a favor da intervenção de 30%. No entanto, a qualidade da evidência foi baixa; Aumento do HDL e redução do LDL nos grupos de suplementação de VD;</p> <p>HOMA-IR apresentou diferença significativa entre os grupos, favorecendo o grupo suplementado em HOMA-IR; Maior concentração de 25(OH)D nos grupos de intervenção;</p> <p>A frequência de recém-nascidos com hiperbilirrubinemia foi significativamente menor nos grupos de intervenção.</p> <p>Conclusão: Não foram encontradas evidências de qualidade alta ou moderada sobre reduções de riscos na meta-análise feita em estudos com</p> |

|   |   |  |  |   |  |   |   |
|---|---|--|--|---|--|---|---|
|   |   |  |  |   |  | <p>iogurte suplementada com vitamina D 3, fornecendo 1000 UI por dia. Em todos os ensaios, os grupos de controle receberam um placebo. Dois dos ensaios iranianos também administraram carbonato de cálcio (1000 mg por dia) aos grupos de intervenção.</p>   | <p>mulheres grávidas com DMG suplementadas com VD, quando comparada com placebo.</p>  |
| <p><b>The Association between Vitamin D Deficiency and Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies</b></p> <p>LUO; GAO; QIN, 2017</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372970/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372970/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>União de estudos observacionais para examinar a possível associação entre Vitamina D e Retinopatia Diabética</p> | <p>Nove estudos na Ásia, dois na América do Norte e um na Europa, um na África e um em três países (Austrália, Nova Zelândia e Finlândia).</p> | <p>Ambos os sexos; &gt;18 anos (pacientes com DM2)</p> | <p>(a) estudos com pacientes com DM2; (b) RD foi o desfecho, e o grupo controle consistiu de pacientes com DM2 sem RD; (c) o estudo apresentou tamanhos de amostra e odds ratio (OR) com intervalos de confiança (IC) de 95% ou informações que poderiam ser usadas para inferir esses resultados; (d) a deficiência de vitamina D foi definida como um nível de 25(OH)D abaixo de 20 ng/mL, e a insuficiência de vitamina D foi definida como níveis de 25(OH)D de 21–29 ng/mL; (e) estudo publicado em inglês; e (f) o estudo</p> | <p>Experimentos com animais, química ou estudos e editoriais de linhas celulares, comentários, artigos de revisão e relatos de casos, estudos com uma pontuação de 0 para qualquer item de qualidade metodológica ou uma pontuação total &lt;7 de 10 pontos máximos.</p> | <p>15 estudos com alta qualidade avaliados pela diretriz adotada (MOOSE).</p> <p>Total de 17.664 participantes, 3.455 (19,6%) com diagnósticos de RD</p> <p>IMC médio fornecido pelos artigos - variou de 13,9 a 42,0 kg/m<sup>2</sup>. O status de vitamina D da retinopatia diabética variou de 9,2 a 32,6 ng/mL.</p> | <p>Pacientes com DM2 com deficiência de VD tiveram risco aumentado para desenvolver RD (OR = 2,03, IC 95%: 1,07, 3.86);</p> <p>Níveis séricos de 25(OH)D foram significativamente menores em pacientes com RD do que no controle de DM2.</p> <p>Conclusão: resultados do OR combinado para deficiência de vitamina D (níveis séricos de 25(OH)D &lt;20 ng/mL) e o efeito combinado da análise de subgrupo da diferença média de peso, mostraram que os níveis séricos de 25(OH)D no DM2 tinham uma relação com a RD, enquanto a OR agrupada para insuficiência de VD (níveis séricos de 25(OH)D &lt;30 ng/mL) não. A qualidade dos estudos incluídos foi alta e não foram detectados vieses de publicações na meta-análise.</p> |

|  |  |  |  |  |  |   |  |
|--|--|--|--|--|--|---|--|
|  |  |  |  | atendeu aos critérios de avaliação de qualidade metodológica predefinidos para estudos observacionais  |  |   |  |
| <p><b>Relationship between vitamin D deficiency and diabetic retinopathy: a meta-analysis</b></p> <p>ZHANG; UPALA; SANGUANKE, 2017</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28457295/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28457295/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Avaliar as evidências de uma associação entre retinopatia diabética (RD) e deficiência de vitamina D.</p> | <p>Populações dos estudos:</p> <p>1 na Turquia, 1 nos Estados Unidos, 2 no Japão, 1 na Itália, 1 na Índia, 1 no Irã, 1 no Líbano, 1 na Espanha, 1 na Holanda, 1 na China, 1 na Inglaterra e um na Coreia</p> | <p>Ambos os sexos; Idade <math>\geq 18</math> anos</p> | <p>(i) ensaios clínicos Randomizados ou estudos observacionais ( Transversais, coorte e caso-controle);</p> <p>(ii) com relatos claros sobre critérios diagnósticos, para VD e RD;</p> <p>e (iii) associação de VD e DR foi relatada como taxas de risco ajustadas ou não ajustadas (HRs), riscos relativos (RRs) ou odds ratio (ORs) com ICs de 95% associados ou o número de eventos</p> <p>Adultos (<math>\geq 18</math> anos) com diabetes tipo I ou II que tinham níveis séricos de vitamina D [25 (OH) D ou 1,25 (OH) 2 D] medidos por técnicas padronizadas. A deficiência de VD definida (<math>&lt; 20</math> ng / mL). O nível ideal de VD foi definido como um nível sérico <math>&gt; 30</math> ng / mL.</p> | <p>(i) revisões, relatos de casos, resumos e estudos não publicados; (ii) estudos sem origens amostrais específicas; e (iii) estudos em que os dados não foram apresentados de forma clara</p> | <p>14 estudos envolvendo 10.007 participantes com diabetes mellitus que foram submetidos a avaliação para RD e deficiência de Vitamina D.</p> | <p>Houve uma associação estatisticamente significativa entre RD e deficiência de vitamina D com um OR global combinado de 1,27 (IC 95%, 1,17-1,37; P = 0,001; <math>I^2 = 80\%</math>; P heterogeneidade = 0,01). Houve também um nível sérico de vitamina D inferior estatisticamente significativo em subgrupos de pacientes com RD versus grupos de controle, com uma diferença média geral de -1,32 ng / mL (IC de 95%, -2,50 a -0,15; P = 0,001; <math>I^2 = 89\%</math>; P heterogeneidade = 0,01).</p> <p>Conclusão: Existe uma associação estatisticamente significativa entre deficiência de vitamina D e RD.</p> |

|  |  |   |  |  |   |  |   |
|--|--|---|--|--|---|--|---|
| <p><b>Serum 25-Hydroxyvitamin D: A Predictor of Macrovascular and Microvascular Complications in Patients With Type 2 Diabetes</b></p> <p>HERRMANN <i>et al.</i>, 2015</p> <p><a href="https://diabetesjournal.s.org/care/article/38/3/521/37605/Serum-25-Hydroxyvitamin-D-A-Predictor-of">https://diabetesjournal.s.org/care/article/38/3/521/37605/Serum-25-Hydroxyvitamin-D-A-Predictor-of</a></p> <p><b>Coorte</b></p> | <p>Investigar a relação entre a concentração basal de 25-hidroxivitamina D (25OH-D) no sangue e o risco de doença vascular no diabetes tipo 2.</p> | <p>Coorte de um estudo (FIELD) multinacional, duplo-cego, controlado por placebo em 63 centros na Austrália, Nova Zelândia e Finlândia.</p> | <p>Ambos os sexos; Idades entre 50 e 75 anos com DM2</p> | <p>Pacientes com DM2 e que não estivessem tomando terapia modificadora de lipídios no início do estudo</p> | <p>Insuficiência renal (creatinina sanguínea &gt;130 µmol/L), doença hepática crônica conhecida ou doença sintomática da vesícula biliar e um evento cardiovascular nos 3 meses anteriores ao recrutamento.</p> | <p>9795 pacientes com DM2;</p> <p>Pacientes alocados aleatoriamente para fenofibrato micronizado 200 mg uma vez ao dia ou placebo correspondente.</p> <p>Concentrações de 25OH-D &lt;50 nmol/L foram consideradas baixas para os propósitos do estudo.</p> | <p>A concentração média de 25OH-D em toda a coorte foi de 49 nmol/L (intervalo de 5–196 nmol/L) e não houve diferença significativa entre os dois grupos.</p> <p>Em pacientes que apresentavam baixa VD no início do estudo (25OH-D no sangue &lt;50 nmol/L), doenças cardiovasculares, hipertensão, retinopatia e nefropatia foram mais prevalentes, além disso esses pacientes também apresentavam maior prevalência basal de dislipidemia e microalbuminúria.</p> <p>Os pacientes com baixa VD apresentavam HbA<sub>1c</sub>, PCR-us e IMC mais altos.</p> <p>Retinopatia exigindo cirurgia a laser e amputações ocorreram em &lt;5% de toda a coorte.</p> <p>A 25OH-D sanguínea foi um preditor independente de eventos macrovasculares incidentes ao longo de 5 anos de acompanhamento (o ajuste multivariável confirmou uma associação prospectiva significativa entre 25OH-D no sangue basal e eventos cardiovasculares incidentes com um risco 23% (95% CI 6-42%; P = 0,007) maior por concentração basal 50 nmol/L mais baixa; No modelo ajustado, os pacientes no quartil mais baixo de 25OH-D no sangue (&lt;36 nmol/L) apresentaram risco 21% maior de doença macrovascular do que aqueles no quartil mais alto (&gt;63 nmol/L). A 25OH-D sanguínea basal mais alta foi associada a reduções no risco de doença macrovascular em 20% e doença microvascular em 18% por 50 nmol/L, o que, após ajuste para preditores de risco clássicos, incluindo HbA<sub>1c</sub>, tornou-se 23 e 11% (não significativo), respectivamente.</p> <p>Conclusão: este estudo fornece evidências prospectivas para a vitamina D sérica como um marcador de risco para futuros eventos vasculares.</p> |
|--|--|---|--|--|---|--|---|

## VDR

|   |  |  |  |  |  |   |  |
|---|--|--|--|--|--|---|--|
| <p><b>Association of vitamin D receptor gene rs739837 polymorphism with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus susceptibility: a systematic review and meta-analysis</b></p> <p>ZENG <i>et al.</i>, 2022</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9080160/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9080160/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Avaliar a associação do gene <i>VDR</i> rs739837 e risco de diabetes tipo 2 (DM2) ou diabetes mellitus gestacional (DMG).</p> | <p>8 estudos com Chineses e 1 estudo Britânico;</p> <p>Dos 9 estudos: 6 em DM2 e 3 com DMG</p> | <p>Ambos os sexos;</p>                     | <p>(1) estudos de caso-controle/coorte; (2) estudos que avaliaram a associação entre <i>VDR</i> SNP rs739837 e DM2/DMG; (3) dados brutos adequados ou dados suficientes para calcular odds ratio (ORs) com intervalos de confiança (ICs) de 95% correspondentes; (4) diagnósticos de DM2 e DMG baseados nos critérios clínicos da Organização Mundial da Saúde</p> | <p>(1) não ser um estudo caso-controle/coorte; (2) não relacionado a <i>VDR</i> SNP rs739837 e DM2/DMG; (3) dados insuficientes; e (4) dados de indivíduos não diabéticos mellitus (NDM) fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).</p> | <p>9 estudos foram incluídos na análise final: 6 estudos relacionados a <i>VDR</i> SNP rs739837 e DM2 (um estudo tinha apenas dados do modo alelo); e 3 estudos relacionados a <i>VDR</i> SNP rs739837 e DMG.</p> | <p>Na análise geral, o <i>VDR</i> rs739837 demonstrou estar significativamente associado ao aumento do risco de DM (DM2 e DMG) no modelo de alélico (T vs. G; OR= 1,088; 95% CI: 1,018–1,163; P = 0,012) e modelo dominante (TT + GT vs. GG; OR = 1,095; 95% CI: 1,001–1,197; P = 0,047).</p> <p>Análise de subgrupo de DM2: rs739837 foi significativamente relacionado a um risco aumentado de T2DM no modelo de alélico (T vs. G; OR = 1,159; 95% CI: 1,055–1,273; P = 0,002) e modelo dominante (TT + GT vs. GG; OR = 1,198; 95% CI: 1,048–1,370; P = 0,008) usando um modelo de efeitos fixos.</p> <p>No subgrupo de DMG não foram encontradas associações com nenhum modelo.</p> <p>Conclusão: No tipo geral de DM foi encontrada uma associação significativa do alelo T e genótipo TT + GT com risco de DM. Além disso, a análise de subgrupo também revelou que rs739837 foi significativamente relacionado a um risco aumentado de T2DM no alelo T e genótipo TT + GT, mas nenhuma associação significativa foi encontrada em nenhum modelo no subgrupo GDM.</p> |
| <p><b>Association of FokI, TaqI, BsmI and ApaI polymorphisms with diabetic retinopathy: a pooled analysis of case-control studies</b></p> <p>JIAO <i>et al.</i>, 2018</p>   | <p>Avaliar a potente força da associação entre o polimorfismo do gene <i>VDR</i> e a suscetibilidade à RD</p>                    | <p>Chineses e Caucásianos</p>  | <p>Ambos os sexos; Idade não relatada;</p> | <p>(1) estudos de caso-controle; (2) informações completas para mutações no gene <i>VDR</i> com risco de RD para o cálculo da razão de chances (OR) com IC de 95% direta e indiretamente.</p>  | <p>(1) editoriais, resumos, relatos de caso, revisões e estudos que usaram um animal ou linhagem celular, (2) quaisquer dados que eram insuficientes ou sobrepostos, (3) genótipos fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).</p>       | <p>Foram incluídos 6 estudos de caso-controle, totalizando: 636 casos de qualquer RD e 1.035 controles (incluindo DM e indivíduos normais)</p>  | <p>A meta-análise revelou uma associação significativa entre RD e polimorfismo <i>VDR</i>-FokI (alelo F) em indivíduos chineses (entre estudos incluídos sem viés de publicação, durante uma análise comparativa entre indivíduos normais e pacientes RD e entre artigos publicados após 2010), no entanto os autores salientam que limitações como: inclusão de poucos estudos caso-controle, falta de algumas informações nos estudos e o fato de só terem incluído publicações em inglês e chinês, podem ter interferido no resultado geral.</p>  |

|   |   |  |   |   |  |  |  |
|---|---|--|---|---|--|--|--|
| <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6354855/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6354855/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p>   |   |  |   |   |  |  | <p>Conclusão: Não houve associação significativa entre BsmI, ApaI e TaqI e RD, apenas associação pontual do alelo F (<i>VDR</i>-FokI) com RD em indivíduos chineses.</p>   |
| <p><b>The Association between <i>VDR</i> Gene Polymorphisms and Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis</b></p> <p>ZHANG <i>et al.</i>, 2016</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5116338/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5116338/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Avaliar a associação de polimorfismos comuns do gene <i>VDR</i> com a suscetibilidade a DR; FokI (rs10735810), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) e TaqI (rs731236).</p> | <p>Caucasianos e Asiáticos</p>   | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Idade média variou de 40,7 anos a 58,7 anos</p> | <p>(1) estudos publicados; (2) avaliaram a associação entre polimorfismos de <i>VDR</i> e risco de DR; (3) um estudo de caso-controle ou coorte baseado em indivíduos não aparentados; (4) dados suficientes para examinar odds ratios (ORs) com intervalos de confiança de 95% (ICs); (5) distribuições genotípicas de polimorfismo da população de controle consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).</p> | <p>Relatos de caso, editoriais, revisões, resumos de conferências, estudos republicados ou duplicados e estudos com informações insuficientes para extração de dados</p> | <p>7 estudos elegíveis<br/>Total de 1130 casos e 1529 controles;</p> <p>Destes, (198 casos e 320 controles) correspondiam a estudos com BsmI</p> | <p>Foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo FokI e o risco de DR em todos os modelos genéticos (modelos alélicos, dominantes, recessivos e aditivos), mas não para polimorfismo TaqI ou BsmI.</p> <p>Conclusão: Não houve associação significativa entre BsmI, ApaI e TaqI e RD, apenas entre FokI e RD.</p>  |
| <p><b>The Impact of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms on the Susceptibility of Diabetic Vascular Complications: A Meta-Analysis</b></p> <p>SONG <i>et al.</i>, 2019</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31373850/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31373850/</a></p>  | <p>Determinar se os polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (<i>VDR</i>) estão correlacionados com a suscetibilidade a complicações vasculares diabéticas</p>       | <p>Os estudos foram conduzidos em populações asiáticas, caucasianas e mistas quando estratificados por raça. A maioria apresentou boa qualidade de acordo com o escore utilizado (NOS)</p> | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Idades relatadas: 40 ± 6 a 62,4 ± 9,2</p>       | <p>(1) se Avaliassem a correlação entre a suscetibilidade a complicações vasculares diabéticas e variantes do gene <i>VDR</i>.<br/>(2) estudo caso-controle;<br/>(3) dados genotípicos originais estivessem disponíveis;</p>  | <p>Não relatados.</p>  | <p>27 estudos incluídos de 8 países;</p> <p>8011 pacientes diabéticos; 1.635 controles saudáveis</p>   | <p>Conclusão: A variante do gene <i>VDR</i> Bsm I correlacionou-se com a nefropatia diabética nos modelos dominante (<math>p = 0,005</math>) e alélico (<math>p = 0,003</math>) em populações asiáticas.</p> <p>Quando estratificado por país, uma associação foi encontrada entre o gene <i>VDR</i> BsmI na população indiana versus controles saudáveis sob o modelo dominante (BB + Bb vs. bb: <math>p &lt; 0,001</math>, OR = 0,114, IC de 95% = 0,043–0,300), o modelo alélico (B vs. b: <math>p = 0,033</math>, OR = 0,628, IC 95% = 0,409–0,964) e o modelo aditivo (BB + bb vs. Bb: <math>p = 0,014</math>, OR = 2,242, IC 95% = 1,178–4,267).</p> |

|   |   |           |  |  |  |  |   |
|---|---|-----------|--|--|--|--|---|
| <b>Meta-análise</b>   |   |           |  | (4) estudos em equilíbrio de Hardy-Weinberg                                    |  |  |   |
| <p><b>Association between Genetic Variants and Diabetes Mellitus in Iranian Populations: A Systematic Review of Observational Studies</b></p> <p>KHODAEIAN <i>et al.</i>, 2015</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637497/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637497/</a></p> | Investigar coletivamente e reunir dados para associação entre variantes genéticas e diabetes tipo 2 na população iraniana em um estudo de revisão sistemática.  | Iranianos | Ambos os sexos;<br><br>Idade média não foi relatada.   | Incluiriam estudos com $N \geq 100$ , de caso-controle, coorte ou transversal. | Estudos com animais, ensaios clínicos, comunicações breves, cartas ao editor, dissertações, estudos in vitro, artigos de revisão e estudos de base populacional conduzidos em mulheres grávidas. | 88 estudos inclusos;<br><br>27.396 diabéticos e indivíduos saudáveis foram estudados;<br><br>DM2 foi o tipo de diabetes mais investigado (42 estudos)  | O receptor da vitamina D ( <i>VDR</i> ) foi investigado em 2 estudos. Em um dos estudos, 114 indivíduos, os genótipos ApaI (Aa), FokI (FF) e BsmI (Bb) mostraram estar associados positivamente com DM1, no outro estudo não foram encontradas associações. Outro estudo com 187 indivíduos, observou genótipo TT (TaqI) é mais frequente nos controles e está negativamente associado ao DM1. Em um estudo com pacientes iranianos o <i>VDR</i> (TaqI) foi associado a DM2.<br><br>Conclusão: foram encontradas associações entre <i>VDR</i> (ApaI (Aa), FokI (FF) e BsmI (Bb), TaqI (TT) com DM1 e um estudo associal TaqI com DM2, no entanto esses achados refletem os resultados de apenas 4 estudos de um total de 88 que foram investigados.   |
| <b>Meta-análise</b>   |   |           |  |  |  |  |   |
| <p><b>Retinopathy and nephropathy in type 1 diabetic patients-- association with polymorphisms of vitamin D-receptor, TNF, Neuro-D and IL-1 receptor 1 genes</b></p> <p>BUĆAN <i>et al.</i>, 2009</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20120526/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20120526/</a></p>      | Investigar a associação entre retinopatia diabética e nefropatia (incipiente e clínico) em pacientes com DM1 e tentar prever o desenvolvimento dessas complicações por meio de associações com às variantes dos genes candidatos - <i>VDR</i> , <i>TNF</i> , <i>NeuroD1</i> e <i>IL1R1</i><br><br>Para o gene <i>VDR</i> foram genotipados; (BsmI, ApaI, TaqI, FokI e Tru9I). | Croátas   | Ambos os sexos;<br><br>A idade média de início do DM1 foi de $17,2 \pm 9,3$ anos, e a média a duração da doença foi de $13,9 \pm 9,1$ . No grupo de estudo a média de idade foi de $32,2 \pm 13,9$ anos para os homens, e $29,2 \pm 13,8$ anos para mulheres, com a mediana de 13 anos de seguimento após o diagnóstico. | Não relatado;  | Ter realizado fotocoagulação a laser anteriormente; insuficiência renal terminal; Infecção de trato urinário e regulação deficiente do distúrbio metabólico.                                     | 120 participantes; Grupos:<br>(i) sem RD;<br>(ii) grupo com RD não proliferativa<br>(iii) grupo com RD proliferativa<br><br>Os pacientes também foram subdivididos em dois grupos:<br>Sem nefropatia diabética (proteinúria $<0,5g / 24$ horas) e com nefropatia diabética (proteinúria $0,5 g / 24$ horas). | Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a Nefropatia Incipiente, microalbuminúria (MA) e o grau de retinopatia diabética, em que a MA mais elevada foi acompanhada principalmente por retinopatia diabética proliferativa. Os autores sugerem a detecção de MA como um indicador do desenvolvimento de nefropatia diabética clinicamente evidente em pacientes com DM1, como sendo a forma mais adequada de descobrir alterações renais patológicas precoces em pacientes com alto risco de desenvolvimento de nefropatia diabética.<br><br>Conclusão: Depois de corrigir a duração da doença, apenas os genótipos <i>VDR</i> BsmI (BB, Bb e bb) mostraram associação significativa com a prevalência cumulativa de retinopatia nos pacientes do sul da Croácia ( $p < 0,05$ ). |
| <b>Caso-controle</b>  |   |           |  |  |  |  |   |
| <p><b>Vitamin D Receptor Polymorphisms in Type 2 Diabetes in</b></p>  | Investigar a prevalência de 2 polimorfismos   | Iranianos | Ambos os sexos;  | Grupos de casos foi pareado com o controle =                                   | Os fatores de viés, como infecções, condições alérgicas,   | 100 pacientes diabéticos tipo 2 e  | O genótipo TT (TaqI) esteve diminuído no grupo de casos. Os autores fizeram a suposição   |

|   |   |                  |  |   |   |  |  |
|---|---|------------------|--|---|---|--|--|
| <p><b>Southeastern Iranian Patients</b></p> <p>NOSRATABADI; ARABABADI; SALEHABAD, 2011</p> <p><a href="https://academic.oup.com/labmed/article/42/1/32/2504922">https://academic.oup.com/labmed/article/42/1/32/2504922</a></p> <p><b>Caso-controle</b></p>                                       | <p>funcionais de nucleotídeo único (SNP) no íntron 8 (ApaI) e exon 9 (TaqI) do gene VDR e correlacionar isso com a ocorrência de diabetes tipo 2.</p>   |                  | <p>Idade médias para ambos os grupos: 40 anos.</p>   | <p>Tinham características médicas e demográficas semelhantes, incluindo sexo, idade e status socioeconômico</p>   | <p>nefropatia, retinopatia e tabagismo foram excluídos do estudo.</p> | <p>100 controles saudáveis.</p>  | <p>que o número de cópias de mRNA do VDR pode ter diminuído em pacientes do estudo.</p> <p>Conclusão: o polimorfismo TaqI do gene VDR está associado ao diabetes tipo 2 em população do sul do Irã.</p>  |
| <p><b>Vitamin D Receptor Gene Polymorphism Affects Onset Pattern of Type 1 Diabetes</b></p> <p>MOTOHASHI <i>et al.</i>, 2003</p> <p><a href="https://academic.oup.com/jcem/article/88/7/3137/2845291">https://academic.oup.com/jcem/article/88/7/3137/2845291</a></p> <p><b>Caso-controle</b></p> | <p>Investigamos um polimorfismo do gene do receptor da vitamina D (VDR - BsmI) no DM1, considerando a possibilidade de que esse gene possa afetar a fisiopatologia dessa doença. Além disso, estratificar os diabéticos tipo 1 de acordo com seu padrão de início e avaliamos sua relação com o polimorfismo do gene VDR.</p> | <p>Japoneses</p> | <p>Ambos os sexos;</p> <p>[Idade média de início, 34,6 ± 16,9 (variação, 1-78) anos de idade e 222 indivíduos saudáveis não relacionados [44,4 ± 13,7 (variação, 20-72) anos de idade,</p> | <p>Pacientes com DM1 com 6 meses de diagnóstico e tratamento com insulina; DM1 de início lento com base na positividade de autoanticorpos associados às ilhotas, e o período desde o início do diabetes até o tratamento com insulina foi de mais de 12 meses; Os indivíduos saudáveis: tolerância normal à glicose, sem doença autoimune, sem autoanticorpos e sem história familiar de diabetes mellitus.</p> | <p>Crítérios de exclusão não relatados.</p>                           | <p>213 pacientes com DM1;</p> <p>222 indivíduos saudáveis não relacionados.</p>  | <p>Conclusão: Foi encontrada uma frequência significativamente maior do alelo B (VDR – BsmI) em diabéticos tipo 1 em geral, em comparação com os controles. Além disso, os diabéticos do tipo 1 de início agudo tinham uma frequência maior do alelo B do que os controles, ao passo que esse não era o caso nos diabéticos do tipo 1 de início lento.</p> |
| <p><b>Association between Bsm1 Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population</b></p>   | <p>Avaliar a associação do polimorfismo VDR com complicações diabéticas em pacientes coreanos com diabetes tipo 2.</p>  | <p>Coreanos</p>  | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Idade média dos participantes = 62,44;</p> <p>Duração do diabetes foi de 13,65</p>   | <p>Pacientes com DM2; RD e ND definidas por exames clínicos; Doença cardíaca coronária ou acidente vascular cerebral e outras complicações macrovasculares,</p>   | <p><i>Não relatado;</i></p>   | <p>537 dos pacientes com DM2;</p> <p>Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a presença do alelo B (genótipo BB ou</p> | <p>Pacientes com genótipo BB ou Bb foram significativamente associados com menor risco de retinopatia diabética em comparação com pacientes com genótipo bb.</p> <p>Na análise de regressão logística, o alelo B foi associado ao menor risco de RD.</p>   |

|  |  |                              |   |  |   |   |   |
|--|--|------------------------------|---|--|---|---|---|
| <p>HONG <i>et al.</i>, 2015</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722400/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722400/</a></p> <p><b>Caso-controle</b></p>   |  |                              |   | <p>tiveram informações retiradas de prontuários médicos.</p>   |   | <p>Bb vs. genótipo bb).</p>   | <p>Conclusão: polimorfismo <i>Bsm1</i> (alelo B) no gene <i>VDR</i> está associado a um menor risco de retinopatia diabética em pacientes diabéticos tipo 2</p>   |
| <p><b>Effects of vitamin D receptor gene polymorphism and clinical characteristics on risk of diabetic retinopathy in Han Chinese type 2 diabetes patients</b></p> <p>ZHONG <i>et al.</i>, 2015</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25899017/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25899017/</a></p> <p><b>Caso-controle</b></p> | <p>Investigar a associação de polimorfismos do gene <i>VDR</i> com o desenvolvimento de retinopatia em uma população chinesa Han com diabetes mellitus tipo 2.</p> | <p>População chinesa Han</p> | <p>Ambos os sexos; Média de idade mínima: 57,8 Média de idade máxima: 58,71 anos.</p> | <p>Pacientes com DM2 foram incluídos se: 1) a duração do diabetes fosse de pelos menos 1 ano e 2) fossem tratados com insulina ou medicamentos antidiabéticos orais.</p> | <p>1) diabetes tipo 1, 2) doença inflamatória aguda ou crônica e 3) função renal prejudicada ou nefropatia evidente</p> | <p>204 pacientes com DM2 divididos em um grupo sem RD (NDR; 51 homens, 59 mulheres, com Idade média de 57,08 ± 11,96 anos) e um grupo com RD (44 homens, 50 mulheres com idade média de 58,71 ± 10,58 anos). Grupo controle (CON) de 116 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade, que não fumavam e bebiam também foram incluídos</p> | <p>O grupo com RD apresentou maior duração de DM2, pressão arterial sistólica (PAS) e HbA1c mais altas do que o grupo sem RD. Os pacientes do grupo RD, carregavam mais alelos T rs2228570 (TaqI) do que os do grupo NDR. Não foram observadas diferenças nas frequências genotípicas de rs1544410 ou rs7975232 nos grupos NDR e RD. A análise de regressão confirmou que a duração do Diabetes, PAS, HbA1c e o alelo T (<i>VDR</i> rs2228570) estavam independentemente associados à RD.</p> <p>Dentro do gene <i>VDR</i>, os três SNPs (rs2228570, rs1544410 e rs7975232) estavam em desequilíbrio de ligação e a análise do SHEsis descobriu que os três haplótipos do gene <i>VDR</i> mais comuns eram CAA, TAC e TAA. A frequência do haplótipo TAA foi significativamente maior em RD (24,0%) do que em pacientes NDR (16,1%) (OR 1,65, 95% CI, 1,01–2,70; P = 0,04). No entanto, a frequência do haplótipo CAA foi significativamente menor em RD (22,0%) do que em pacientes NDR (31,9%) (OR 0,60, 95% CI, 0,38–0,94; P = 0,03).</p> <p>Conclusão: a duração do diabetes, PAS, HbA1c e o alelo rs2228570 T do gene <i>VDR</i> foram associados com risco aumentado de RD. <i>VDR</i> rs2228570 pode ser considerado um candidato a biomarcador de RD em pacientes com DM2 da etnia Han.</p> |
| <p><b>Taq I polymorphism of the vitamin D receptor and risk of</b></p>   | <p>Examinar se o polimorfismo Taq I do receptor da vitamina D</p>  | <p>Franceses caucasianos</p> | <p>Ambos os sexos; Média mínima de idade: 42.9 anos</p>                               | <p>Participantes com DM1 diagnosticados antes dos 31 anos;</p>   | <p>Não relatados.</p>   | <p>Participantes com DM1;</p>   | <p>Conclusão: Em franceses com DM1 (dependentes de insulina), foi encontrada uma associação entre o genótipo TT (<i>VDR</i>- TaqI) e</p>  |

|   |   |   |   |   |   |   |  |
|---|---|---|---|---|---|---|--|
| <p><b>severe diabetic retinopathy</b></p> <p>TAVERNA <i>et al.</i>, 2002</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11914750/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11914750/</a></p> <p><b>Caso-controle</b></p>   | <p>está envolvido no desenvolvimento de retinopatia diabética grave.</p>  |   | <p>Média máxima de idade: 46.3 anos</p>   | <p>Peptídeo C negativo e acompanhado pelo médico da equipe de pesquisa a pelo menos 2 anos;</p> <p>Pacientes com duração de DM1 superior a 15 anos</p>  |   | <p>Grupo de estudo (n=101); RD grave incluindo: RD proliferativa (n=73) RD pré proliferativa (n=28); Grupo controle (n=99); Grupo ausência de RD (N=32) or <i>background</i> (n=67)</p> | <p>o baixo risco de retinopatia diabética grave, especialmente em pacientes com longa duração de DM; em contrapartida o genótipo Tt conferiu um alto risco de retinopatia diabética proliferativa em indivíduos com controle glicêmico deficiente.</p>   |
| <p><b>Clinical risk factors and the role of VDR gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients</b></p> <p>CYGANEK <i>et al.</i>, 2006</p> <p><a href="https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00592-006-0225-3">https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00592-006-0225-3</a></p> <p><b>Transversal</b></p> | <p>(1) definir a prevalência de RD no grupo com DM2;</p> <p>(2) identificar, na análise transversal, as características clínicas associadas à RD no grupo de estudo;</p> <p>(3) pesquisar a associação de FokI, ApaI, BsmI e TaqI do receptor da vitamina D (<i>VDR</i>), um gene candidato para complicações vasculares no diabetes, com a RD.</p> | <p>Poloneses caucasianos</p>                      | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Idade média 61,3 anos; Duração do DM2: 11,3 anos;</p> <p>11 (4,1%) dos participantes foram diagnosticados com RD proliferativa.</p> | <p>Pacientes com diagnóstico clínico de DM2 e sem terapia com insulina por pelo menos dois anos logo após o diagnóstico;</p> <p>Pacientes do grupo de casos: DM2 e RD</p> <p>Paciente do grupo controle: apenas DM2</p> | <p>Não relatado</p>   | <p>267 pacientes com DM2.</p> <p>Grupo caso n= 85 pacientes com DM2+RD</p>  | <p>Os alelos, genótipos, haplótipos e combinação de haplótipos de <i>VDR</i> não foram associados à complicação examinada (RD). Da mesma forma, nenhum achado positivo foi registrado para haplótipos e suas combinações criadas por três marcadores estando em desequilíbrio de ligação (BsmI, ApaI e TaqI) (dados não mostrados);</p> <p>Uma análise multivariada revelou que os preditores significativos de RD foram HbA1c e IMC.</p> <p>Conclusão: polimorfismos do gene <i>VDR</i> (BsmI, ApaI e TaqI) não se constituíram como fator de risco para esse tamanho de grupo e população estudada, porém os marcadores HbA1c e IMC foram preditores significativos de RD.</p> |
| <p><b>Slight association between type 1 diabetes and "ff" VDR FokI genotype in patients from the Italian Lazio Region. Lack of association with diabetes complications</b></p>  | <p>Avaliar os genótipos FokI e BsmI do gene <i>VDR</i> em pacientes com DM1 em comparação com controles saudáveis caucasianos; Além disso, uma análise de associação com complicações do DM1 também foi realizada.</p>  | <p>Caucasianos italianos (Da região de Lazio)</p> | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Grupo de casos e controles com média de idade 39 anos</p>   | <p>Inclusão:</p> <p>1) diagnóstico clínico e laboratorial de DM1;</p> <p>2) todos os pacientes com DM1 diagnosticados tinham menos de 35 anos e precisavam de terapia permanente</p>                                    | <p>(1) pacientes não caucasianos;</p> <p>(2) soro de peptídeo C com valores acima do corte.</p> | <p>492 participantes, sendo: 246 pacientes com DM1 e 246 controles saudáveis;</p>   | <p>Conclusão: Foi observada uma ligeira associação significativa de DM1 com o genótipo ff <i>versus</i> FF + Ff, homocigoto FokI (rs10735810), sustentada por uma regressão multivariada. Nenhuma associação foi observada com os polimorfismos (FokI e BsmI) e a presença de complicações microvasculares do DM.</p>  |

|  |   |  |  |  |   |                      |   |
|--|---|--|--|--|---|----------------------|---|
| <p>CAPOLUONGO <i>et al.</i>, 2006</p> <p><a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912006001603?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912006001603?via%3Dihub</a></p> <p><b>Coorte</b></p>  |   |  |  | <p>para otimizar o controle metabólico.</p>  |   |                      |   |
| <p><b>Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function</b></p> <p>MORY <i>et al.</i>, 2009</p> <p><a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19286443/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19286443/</a></p> <p><b>Coorte</b></p> | <p>Examinar a frequência dos polimorfismos do gene <i>VDR</i> FokI (rs 10735810) e BsmI (rs154410) em uma coorte de indivíduos brasileiros.</p> <p>Em pacientes com DM1, foi analisada a relação entre a presença desses polimorfismos do <i>VDR</i> e a função celular remanescente.</p> | <p>Brasileiros</p> <p>As frequências observadas para este polimorfismo <i>VDR</i> não estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.</p> | <p>Ambos os sexos;</p> <p>Média de idade do grupo de casos= 17 anos;</p> <p>Média de idade do grupo controle= 12 anos.</p> | <p>189 pacientes com DM1 (177 foram genótipados);</p> <p>194 Controles saudáveis (183 foram genótipados)</p> | <p>Grupo de casos= Adolescentes com DM1, atendidos no Centro de Diabetes da Universidade Federal de São Paulo;</p> <p>Grupo controle= indivíduos saudáveis de uma escola primária na região metropolitana de São Paulo.</p> | <p>Não relatado.</p> | <p>Conclusão: A frequência de homozigose e heterozigose para o polimorfismo BsmI foi menor no grupo DM1 do que no grupo controle e as frequências dos genótipos <i>VDR</i> FokI foram semelhantes entre os dois grupos.</p> <p>Foi observado que os pacientes com DM1 com presença de polimorfismo FokI tenderam a ter menor função celular residual no momento de acompanhamento e, pacientes com homozigose e heterozigose para polimorfismo BsmI tenderam a ser mais velhos no diagnóstico clínico de diabetes; no entanto, esses achados não foram estatisticamente significativos.</p> |

Fonte: estudos disponíveis na base de dados PubMed.

## APÊNDICE F

Estudos com adiponectina e suas variantes *ADIPOQ* e *ADIPOR1* no contexto Diabetes e Retinopatia

| Título/ano   | Objetivo   | População/<br>Etnia | Sexo/ Idade  | Inclusão /<br>Estudos elegíveis  | Exclusão   | N do estudo   | Principais achados e conclusão   |
|--|--|---------------------|--|--|--|---|--|
| <p><b>Association between circulating adipocytokine concentrations and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of controlled cross-sectional studies</b></p> <p>RODRÍGUEZ <i>et al.</i>, 2016</p> <p><a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872715004419?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872715004419?via%3Dihub</a></p> <p><b>Revisão sistemática com meta-análise</b></p> | <p>Por meio de revisão sistemática com meta-análise, esclarecer os resultados literatura, para determinar se há associação entre as adipocitocinas leptina e adiponectina e complicações microvasculares diabéticas.</p> | <p>Não relatado</p> | <p>Ambos os sexos;</p> <p>A idade média dos participantes do estudo variou de 45,9 a 70,4 anos nos grupos de casos e de 45,8 a 67,2 anos nos grupos de controle.</p> <p>A duração média do diabetes variou de 1,31 a 18,7 anos nos casos e de 1,2 a 13,9 anos nos controles.</p> | <p>Elegíveis para revisão sistemática se a investigação avaliou as concentrações de leptina ou adiponectina (ou ambas) em pacientes com DM2 afetados por pelo menos uma complicação microvascular e comparou essas concentrações com pacientes com DM2 sem essas complicações;</p> <p>Os estudos eram elegíveis para metanálise se primeiro satisfizessem os critérios para revisão sistemática e relatassem dados especificamente relacionados às concentrações médias de leptina e/ou adiponectina (sérica ou plasmática) em um grupo de pacientes com pelo menos uma complicação microvascular (caso), contra dados relacionando as</p> | <p>Estudos que não compararam dois grupos de pacientes com DM2 (por exemplo, complicações diabéticas versus complicações não diabéticas), estudos que avaliaram apenas uma coorte de pacientes com diabetes tipo 1, estudos que não apresentaram dados que pudessem ser interpretados como uma comparação de leptina ou adiponectina entre pacientes com e sem complicações microvasculares, estudos baseados em animais ou células e relatos de casos individuais;</p> <p>Os estudos foram excluídos da meta-análise se o estudo não relatasse especificamente as concentrações de leptina e/ou adiponectina em pacientes com e sem uma complicação microvascular específica (por exemplo, uma coorte</p> | <p>28 estudos transversais e 21 elegíveis para meta-análise, totalizando uma população de 6.148 indivíduos.</p> <p>As coortes da população do estudo variaram de n = 30 participantes a n = 1.480</p> <p>Destes, 12 estudos avaliaram Retinopatia Diabética; 20 avaliaram nefropatia; 8 examinaram Neuropatia; 9 avaliaram Leptina no soro e 7 estudos leptina plasmática; Dos estudos que avaliaram a adiponectina, oito estudos avaliaram a adiponectina sérica e sete avaliaram a adiponectina plasmática.</p> | <p>As meta-análises envolvendo leptina e Retinopatia revelaram: a concentração de leptina não diferiu em nenhum dos grupos comparados (sem RD; RDNP e RDP); Leptina e nefropatia: Leptina elevada em pacientes com microalbuminúria quando comparados aos com normoalbuminúria, leptina elevada em pacientes com macroalbuminúria comparados aos normoalbuminúria e elevada também em pacientes com macroalbuminúria em relação a pacientes com microalbuminúria; Leptina e Neuropatia: maior concentração de leptina em pacientes com neuropatia diabética em comparação com pacientes sem neuropatia;</p> <p>Adiponectina e Retinopatia:<br/>Concentrações elevadas de adiponectina em pacientes com RD em comparação a pacientes sem RD;<br/>Sem diferenças nos levels de adiponectina entre RDNP e sem RD e também sem diferenças entre RDNP e RDP.</p> <p>Adiponectina e Nefropatia:<br/>Concentrações elevadas de Adiponectina em pacientes com microalbuminúria em relação aos com normoalbuminúria; elevada em macroalbuminúria em relação a normoalbuminúria; leptina elevada em pacientes com macroalbuminúria em relação aos com microalbuminúria; Adiponectina e Neuropatia: Maior concentração de adiponectina em pacientes com neuropatia em comparação a pacientes sem neuropatia.</p> <p>Conclusão: níveis mais elevados de leptina e adiponectina foram associados com macro e microalbuminúria e neuropatia. Além disso, a</p> |

|  |   |  |  |   |  |   |   |
|--|---|--|--|---|--|---|---|
|  |   |  |  | concentrações médias de leptina e/ou adiponectina (sérica ou plasmática) em um grupo de pacientes sem complicações microvasculares (controle).  | compreendendo uma mistura de pacientes com retinopatia, pacientes com nefropatia e pacientes com neuropatia).  |   | adiponectina elevada também foi associada à retinopatia   |
| <p><b>Plasma adiponectin levels and type 2 diabetes risk: a nested case-control study in a Chinese population and an updated meta-analysis</b></p> <p>WANG <i>et al.</i>, 2018</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762808/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762808/</a></p> <p><b>Caso controle com meta-análise</b></p> | <p>Avaliar prospectivamente a associação adiponectina-DM2 entre 571 casos de DM2 e 571 controles saudáveis pareados por idade e sexo aninhados no Singapore Chinese Health Study (SCHS), e realizar uma meta-análise atualizada com 34 estudos prospectivos no Pubmed até setembro de 2016.</p> | <p>Caso-controle com Chineses;</p> <p>Meta-análise com 33 estudos de coorte prospectiva (populações: 18 estudos com Europeus, 9 estudos da América do Norte e 6 estudos da Ásia)</p> | <p>Caso controle: Ambos os sexos; Média de idade; 59,7 anos;</p> <p>Mata-análise: média de idade de 26,5 a 74,8 anos</p> | <p>Estudos prospectivos em humanos (estudos de coorte, caso-coorte e caso-controle aninhados) avaliando associações adiponectina-DM2 entre 10 de abril de 2009 (a última data de pesquisa da literatura na meta-análise anterior 5) até até 10 de setembro de 2016.</p> | <p>(1) irrelevantes (não usando adiponectina como exposição ou DM2 como resultado); (2) revisão, editorial, comentário, metanálise, estudo animal ou experimental; (3) estudo não prospectivo (caso-controle, estudos transversais e estudos genéticos).</p> | <p>Caso-controle: DM2 entre 571 casos de DM2 e 571 controles pareados por idade e sexo;</p> <p>Meta-análise com 34 estudos: 7.504 casos de DM2 entre 64.696 participantes, incluindo o estudo de caso-controle realizado pelos próprios autores. A duração dos seguimentos variou de 1 a 18 anos.</p> | <p>Caso-controle: Grupo caso (DM2): concentrações mais altas de HbA1c, proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-hs), glicose aleatória, insulina aleatória, triglicerídeos (TG) e a proporção de TG para HDL-colesterol (HDL-C), mas apresentaram níveis mais baixos de HDL-C; A concentração mediana (interquartil) de adiponectina foi de 6,7 (5,2–8,3) µg/mL nos casos e 8,4 (6,5–10,8) µg/mL nos controles;</p> <p>Grupo controle saudável os níveis plasmáticos de adiponectina foram inversamente correlacionados com IMC, PCR-us, insulina aleatória, TG e a proporção de TG para HDL-c e positivamente correlacionados com idade e o nível plasmático de HDL-C;</p> <p>Níveis plasmáticos mais altos de adiponectina foram associados a um menor risco de DM2 e a associação foi persistiu (foi atenuada) após ajuste de variáveis (PCR, TG e HDL-c).</p> <p>Associações significativas foram encontradas em 292 pares de caso-controle com os casos com HbA1c basal &lt; 6,5% (48 mmol/mol) no momento da coleta de sangue, bem como em 279 pares de caso-controle com os casos com HbA1c basal ≥6,5% (48 mmol/mol). Além disso, a associação adiponectina-DM2 permaneceu significativa entre 146 pares de caso-controle com HbA1c &lt; 6,0% (42 mmol/mol). Interação significativa foi encontrada com o status do IMC (P para interação = 0,041), e a associação foi mais forte entre indivíduos com sobrepeso/obesos (IMC</p> |

|  |  |  |   |  |   |   |   |
|--|--|--|---|--|---|---|---|
|  |  |  |   |  |   |   | <p>≥23,0 kg/m<sup>2</sup>) do que contrapartes eutróficas (IMC &lt; 23,0 kg/m<sup>2</sup>).</p> <p>Meta-análise:<br/>Modelo de regressão sugeriu uma relação dose-resposta linear (P = 0,33 para não linearidade) e os riscos relativos de DM2 com incremento de 5 µg/mL nos níveis de adiponectina foram 0,75 (95% CI: 0,73, 0,77) no modelo de efeitos aleatórios. Nenhum viés de publicação significativo foi detectado.</p> <p>Conclusão:<br/>No estudo de caso-controle, foi encontrada uma forte associação dose-dependente entre níveis plasmáticos mais altos de adiponectina e menor risco de DM2, que parecia ser independente de fatores de risco estabelecidos para DM2, incluindo lipídios, biomarcador inflamatório (PCR-hs), glicose aleatória e insulina. Além disso, a associação inversa foi significativamente mais forte entre indivíduos com sobrepeso/obesos do que entre os eutróficos. Além disso, a adiponectina melhorou significativamente a reclassificação do risco de DM2 nessa população. Em uma meta-análise atualizada que reuniu dados de 34 estudos prospectivos, incluindo o estudo caso controle realizado pelos próprios autores, os participantes no tercil mais alto de adiponectina tiveram quase metade do risco de desenvolver DM2 em comparação com aqueles no tercil mais baixo (RR 0,53; IC 95%: 0,47, 0,61), e a associação adiponectina-DM2 pareceu ser linear.</p> |
| <p><b>The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus</b></p> <p>SUN <i>et al.</i>, 2017</p> | <p>Determinar o modelo genético subjacente da herança do DM2 devido ao rs266729 no gene da adiponectina por meio de uma abordagem livre de modelo genético</p> | <p>3 estudos com Asiáticos, 2 com Europeus, 1 com africanos e 1 com americanos</p> | <p>Ambos os sexos;<br/>Idade média dos casos 59,50 anos;<br/>Idade média dos controles: 53,8 anos</p> | <p>Estudos mostrando a associação entre polimorfismos do gene da adiponectina e DM2; artigos originais de estudos prospectivos de coorte, caso-controle ou associação de genoma completo</p> | <p>Não estiverem relacionados ao polimorfismo rs266729 da adiponectina; os dados estavam incompletos; quando vários relatórios publicados da mesma população abrangendo o mesmo</p> | <p>7 estudos; Total de indivíduos: 12.323, compreendendo 5.948 casos e 6.395 controles. A frequência do genótipo CC nos grupos caso e</p> | <p>O alelo rs266729 G da adiponectina foi um fator de risco para DM2, quando resultado foi corrigido por modelo aleatório (95%IC &gt;1, p&lt;0,001).</p> <p>Aumento de risco para DM2 (GG +GC) em comparação com CC, porém, houve heterogeneidade significativa entre os estudos (P = 0,047).</p>   |

|  |   |                                    |  |  |  |   |  |
|--|---|------------------------------------|--|--|--|---|--|
| <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708967/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708967/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p>  |   |                                    |  | <p>com dados brutos; estudos com critérios detalhados para o diagnóstico de DM2; estudos mostrando o tamanho da amostra dos 3 genótipos (CC, GC, GG) em ambos os grupos.</p>   | <p>período de tempo são encontrados, aquele com as informações mais úteis foi incluído; eram séries de estudos, caso em que os últimos eram incluídos enquanto os antigos eram excluídos; o tamanho da amostra de qualquer grupo foi &lt;500; estudos familiares; a distribuição dos genótipos do grupo controle desviou-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).</p> | <p>controle foi de 53,23% e 56,40%, respectivamente, enquanto a do GC foi de 39,64% e 37,75%, respectivamente, e a do GG foi de 7,13% e 5,85%, respectivamente. A frequência do alelo G nos grupos caso e controle foi de 26,95% e 24,73%, respectivamente.</p> | <p>(GC + CC) aumentou o risco de DM2 em comparação com GG (OR = 1,23, 95% CI [1,06, 1,42], P = 0,005), enquanto GC aumentou o risco em comparação com CC (OR = 1,11, 95% CI [1,03, 1,20], P = 0,006), sem heterogeneidade significativa entre os estudos.</p> <p>Quando o efeito genético foi avaliado por regressão logística binária o modelo genético que melhor representou o polimorfismo rs266729 foi o de dominância incompleta: Assim, o risco de desenvolver DM aumentou 13,0% (OR = 1,13) quando o alelo G estava presente em rs266729.</p> <p>Conclusão: o alelo G rs266729 pode aumentar o risco de DM2 em um modelo genético de herança aditiva.</p>  |
| <p><b>Meta-analysis of the association between adiponectin SNP 45, SNP 276, and type 2 diabetes mellitus</b></p> <p>DONG <i>et al.</i>, 2020</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7580922/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7580922/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | <p>Determinar se os polimorfismos em rs2241766 e rs1501299 no gene <i>ADIPOQ</i> estavam relacionados com a susceptibilidade de diabetes mellitus tipo 2 (DM2).</p> | <p>Sexo e idade não relatados.</p> | <p>Estudos na 1 Europa, 1 Itália, 2 Americanos, 23 China, 2 França, 1 Reino Unido, 1 Peru, 1 Bahrein, 1 Romênia, 2 Coréia, 1 Espanha, 2 Índia, 1 Polônia, 2 Japão, 1 México, 1 América Saudita, 1 Finlândia, 2 Irã, 1 Rússia, 1 Bangladesh, 1 Alemanha e 1 em Singapura.</p> | <p>(1) Os estudos de caso-controle ou projetos de coorte sobre a correlação entre o polimorfismo dos genes <i>ADIPOQ</i> rs2241766 ou rs1501299 e T2DM. (2) A distribuição dos genótipos estava de acordo com o equilíbrio HWE (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) na população de controle. (3) A frequência genotípica, o valor da razão de chances (OR) ou o intervalo de confiança (IC) de 95% foram dados diretamente na literatura. (4) O idioma da literatura era chinês ou inglês. (5) Para estudos</p> | <p>Relatos de casos, estudos com animais, revisões, revisões editoriais e literatura com dados incompletos.</p>  | <p>53 estudos elegíveis; Com 9285 casos com rs2241766 e 14156 controles e 7747 casos com rs1501299 e 10607 controles.</p>   | <p>O locus rs2241766 do gene <i>ADIPOQ</i> não mostrou nenhuma correlação com o DM2 nas populações da Europa e do Leste Asiático, enquanto que nas populações do oeste (modelo de gene dominante (TT + TG vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 2,28, IC 95% = 1,21–4,28, P = 0,01; modelo de gene heterozigoto (TG vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 2,22, IC 95% = 1,14–1,32, P = 0,02; modelo de gene homozigoto (TT vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 2,29, IC 95% = 1,21–4,34, P = 0,01); e do sul da Ásia (modelo de gene dominante (TT + TG vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 0,53, 95% CI = 0,34–0,82, P = 0,004; modelo de gene heterozigoto (TG vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 0,54, 95% CI = 0,34–0,86, P = 0,009; modelo de gene homozigoto (TT vs. GG): <math>I^2 = 0\%</math>, OR = 0,53, 95% CI = 0,34–0,83, P = 0,005) estava ligado ao DM2. Além disso, o locus rs1501299 do gene <i>ADIPOQ</i> foi correlacionado com DM2 em todas as populações.</p> <p>Conclusão: foi encontrada associação entre o polimorfismo rs2241766 do gene <i>ADIPOQ</i> e o DM2, mas não em todas as populações analisadas. Na Europa e no leste da Ásia, nenhuma correlação foi estabelecida entre o polimorfismo rs2241766 do gene <i>ADIPOQ</i> e o</p> |

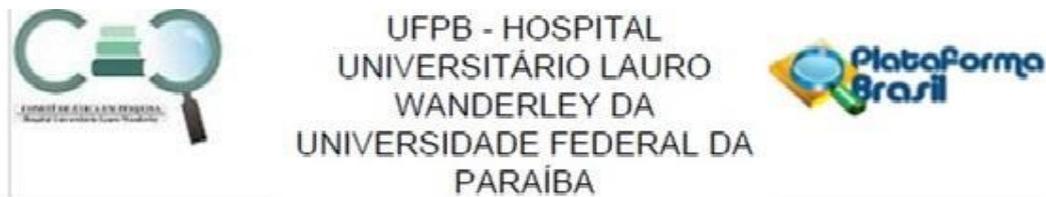
|  |   |                             |  |   |               |  |  |
|--|---|-----------------------------|--|---|---------------|--|--|
|  |   |                             |  | múltiplos do mesmo autor, foi selecionado o estudo mais recente ou com dados suficientes.   |               |  | DM2, enquanto no oeste e no sul da Ásia foi estabelecida uma correlação estatística significativa nos modelos de genes dominantes, heterozigotos e homozigotos. A presença de alelos T aumenta a incidência de DM2 na população da Ásia Ocidental, mas protege a população do sul da Ásia. No entanto, não foi encontrada correlação entre o polimorfismo rs1501299 do gene <i>ADIPOQ</i> e o DM2.   |
| <p><b>Novel Loci for Adiponectin Levels and Their Influence on Type 2 Diabetes and Metabolic Traits: A Multi-Ethnic Meta-Analysis of 45,891 Individuals</b></p> <p>DASTANI <i>et al.</i>, 2012</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315470/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315470/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | Identificar novas variantes comuns que influenciam os níveis de adiponectina e testar sua associação com o risco de DM2 e traços metabólicos relacionados dentro da estrutura de um grande consórcio multiétnico de GWAS. | Sexo e idade não relatados. | Etnias e n estudados: europeus brancos (n = 29.347), afro-americanos (n = 4.232) e asiáticos orientais (n = 1.776)). | Foi aplicando um novo método meta-analítico para heterogeneidade em efeitos alélicos entre populações de diferentes origens étnicas. Em seguida, identificaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) significativos em todo o genoma que estivessem associados à expressão de seu gene mais próximo em adipócitos humanos, a principal fonte de adiponectina. Uma vez que a adiponectina tem sido associada com DM2, resistência à insulina e características metabólicas, foi investigado se haveria um risco genotípico multi-SNP, compreendendo SNPs significativos em todo o genoma | Não relatado. | Foi realizada a combinação dos resultados da associação do genoma de 35.355 indivíduos | <p>Indivíduos de origem europeia branca: dez loci associados a níveis de adiponectina (incluindo <i>ADIPOQ</i> rs6810075[T], <i>KNG1</i> rs2062632[T], em 3q27.3, e <i>CDH13</i> (rs12922394[T] em 16q23.3.</p> <p>Outras associações em: rs9853056 (dentro do gene <i>STAB1</i>, rs4282054 (<i>NT5DC2</i>), rs13083798 (<i>PBRM1</i>), rs1108842 (<i>GNL3</i>), rs11235 (<i>NEK4</i>), rs2710323 (<i>ITIH1</i>), rs3617 (<i>ITIH3</i>) e rs2535627 (<i>ITIH4</i>) em 3p21.1; rs1597466 (<i>TSC22D2</i>) em 3q25. 1; rs2980879 (<i>TRIB1</i>) em 8q24.13; rs7955516 (<i>PDEA</i>) em 12p12.2; rs601339 (<i>GPR109A</i>) em 12q24.31; rs6488898 (<i>ATP6V0A2</i>), rs7133378 (<i>DNAH10</i>), rs7305864 (<i>CCDC92</i>) e rs7978610 (<i>ZNF664</i>) em 12q24.31 e rs731839 (<i>PEPD</i>) em 19q13.11.</p> <p>Uma variante comum (rs601339, alelo G) a jusante do gene <i>GPR109A</i> (o suposto receptor de niacina) foi associada à adiponectina na análise lipídica global. Em uma análise de gene candidato coincidente, 11 SNPs foram visualizados em <i>GPR109A/B</i> nas coortes CoLaus e LOLIPOP, contendo indivíduos de ascendência europeia. Um único SNP R311C de codificação nominalmente significativo (rs7314976) dentro do gene <i>GPR109A</i> foi consistentemente associado à adiponectina nas três coortes (estudo de CoLaus, Fenland e MRC Ely) e HDL-colesterol (HDL-C) em quatro coortes (CoLaus, Fenland, Ely study e Lolipop).</p> <p>A metanálise combinada dos conjuntos de dados GWAS <i>in silico</i> de descoberta e</p> |

|  |   |  |                        |  |   |  |  |
|--|---|--|------------------------|--|---|--|--|
|  |   |  |                        | para os níveis de adiponectina, Meta-Analysis of Glucose and Insulin Related Traits Consortium (MAGIC)<br>Investigação genética de traços de medidas antropométricas (GIANT), Global Lipids Genetic Consortium (GLGC) e Body Fat GWAS consórcios.  |   |  | acompanhamento detectou loci adicionais nos cromossomos 1q41 próximo ao gene <i>LYPLALI</i> (rs3001032) e no cromossomo 6p21.1 próximo ao Gene <i>VEGFA</i> (rs998584) que alcançou significância em todo o genoma.<br><br>Nas populações afro-americanas, apenas associações no locus <i>ADIPOQ</i> atingiram significância em todo o genoma, enquanto na população do Leste Asiático houve evidência de associação nos loci <i>ADIPOQ</i> e <i>CDH13</i> . Na meta-análise que combinou todos os GWAS disponíveis, foram identificados dois loci adicionais no gene <i>IRS1</i> ou próximo a <i>eleem</i> 2q36.3 e em 6q24.1.<br><br>Conclusão: dados apresentados neste estudo fornecem fortes evidências de associação para 10 novos loci para os níveis de adiponectina. Análises posteriores confirmaram que o nível de expressão de alguns desses genes candidatas em adipócitos humanos se correlacionava diretamente com os níveis de adiponectina. |
| <b>Association of Adiponectin SNP+45 and SNP+276 with Type 2 Diabetes in Han Chinese Populations: A Meta-Analysis of 26 Case-Control Studies</b><br><br>LI <i>et al.</i> , 2011<br><br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092748/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092748/</a><br><br><b>Caso- controle com Meta-análise</b> | Avaliar a associação de SNP+276 (rs1501299) com DM2 na população Han na província de Yunnan, no sudoeste da China, e combinar os achados com os de 25 estudos anteriores em uma meta-análise e investigar a associação dos polimorfismos SNP+45 e SNP+276 no gene da adiponectina com DM2 na população Han chinesa. | Meta-análise sem restrição de sexo e idade | População Han chinesa. | Caso controle:<br>Ambos os sexos atendidos no Hospital Popular da Província de Yunnan de dezembro de 2006 a setembro de 2010, com diagnóstico de DM2 segundo critérios da OMS.<br><br>Meta-análise:<br>(a) um desenho de caso-controle não relacionado, (b) todos os indivíduos eram chineses han, (c) genótipos disponíveis e números ou frequências de alelos, (d) publicado | Caso controle:<br>Pacientes que foram tratados com insulina ou um secretagogo de insulina; Indivíduos com diabetes ou intolerância à glicose foram excluídos do grupo controle com base em um teste oral de tolerância à glicose; indivíduos com hipertensão ou doença cardíaca coronária também foram excluídos do estudo.<br><br>Meta-análise:<br>Critérios de exclusão não relatados | Caso controle com 202 (homens = 121; mulheres = 81); O grupo não-diabético (NDM) incluiu 143 indivíduos (homens = 59; mulheres = 84) que não tinham histórico familiar de diabetes mellitus e foram recrutados de uma população não selecionada submetida a exames de saúde;<br><br>Meta-análise de 23 estudos de caso-controle de | No estudo de caso e controle:<br>Parâmetros antropométricos (IMC e Circunferência do quadril) foram significativamente maiores em pacientes com DM2 do que em indivíduos controle sem DM. As frequências genotípicas e alélicas para SNP+276 (G>T (rs1501299)) no gene da adiponectina não diferiram significativamente entre os grupos de DM2 e controle sem DM na população de Yunnan Han.<br><br>Na meta-análise:<br>Os resultados revelaram uma tendência de aumento do risco de DM2 para o alelo SNP+45G (rs2241766 T>G) em comparação com o alelo SNP+45T na população Han chinesa. No entanto, não houve associação entre SNP+276 e DM2.<br><br>Conclusões:<br>Os resultados da meta-análise demonstraram que o alelo SNP+45G pode ser um alelo de  |

|   |  |                |   |   |  |   |  |
|---|--|----------------|---|---|--|---|--|
|   |  |                |   | em qualquer idioma. PCR-polimorfismo conformacional de cadeia simples (PCR-SSCP) ou análise de PCR-RFLP e sequenciamento de DNA. Se houvesse várias publicações do mesmo grupo, apenas o estudo mais recente foi incluído na análise  |  | SNP+45, com um total de 4.161 pacientes com DM2 e 3.709 controles, e 11 estudos de caso-controle de SNP+276, com 2.533 pacientes com DM2 e 2.212 controles, todos os participantes eram chineses Han. | suscetibilidade para DM2 em população Chinesa Han, porém, mesmo sendo de uma mesma etnia, os resultados apresentaram certa heterogeneidade. Não houve nenhuma associação de SNP+276 (rs1501299) com DM2.   |
| <p><b>Association between ADIPOQ +45T&gt;G polymorphism and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis</b></p> <p>FAN <i>et al.</i>, 2014</p> <p><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307270/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307270/</a></p> <p><b>Meta-análise</b></p> | Sintetizar os dados de estudos de caso-controle para avaliar o risco genético do polimorfismo +45T>G no gene ADIPOQ para T2DM. | Ambos os sexos | Foram incluídos 14 estudos com Caucasianos e 30 com Asiáticos | (1) Publicado em inglês ou chinês; (2) Estudo de caso-controle ou coorte; (3) Forneceu as frequências genotípicas em casos e controles; (4) Dados disponíveis para estimar um odds ratio com intervalo de confiança de 95%; e (5) estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) | (1) Nenhum grupo de controle; (2) Estudos que continham dados sobrepostos; e (3) Nenhum relatório sobre a frequência genotípica ou informações insuficientes para extração de dados. | 44 estudos; Um total de 9.786 casos e 16.022 controles foram incluídos na análise +45T>G;   | Em toda a população, foi encontrada uma associação significativa entre o polimorfismo (+45T>G, rs16861194) do gene <i>ADIPOQ</i> e DM2, sob modelos de alelo (G), dominante homocigoto. Na análise de subgrupo em população Asiática houve associação sob modelos: alelo, dominante, recessivo, homocigoto e heterocigoto, no entanto, a análise de vieses de publicação revelou-se significativa em todos os modelos. No subgrupo de Caucasianos não foram encontradas associações com nenhum modelo. |

Fonte: estudos disponíveis na base de dados PubMed.

## ANEXO A- CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO 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:** 18

**CAAE:** 99840118.3.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley

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

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.230.838

#### **Apresentação do Projeto:**

Protocolo de pesquisa - Versão\_18, Emenda\_11

#### **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)

Emendas ao Protocolo de Pesquisa:]

Versão 03 - Emenda\_01 - Parecer nº3328332 - Pendente (15/05/2019)

Versão 04 - Emenda\_01 - Parecer nº3383643 - Aprovado (11/06/2019)

Versão 05 - Emenda\_02 - Parecer nº3453297 - Aprovado (13/07/2019)

Versão 06 - Emenda\_03 - Parecer nº3666978 - Aprovado (29/10/2019)

Versão 07 - Emenda\_04 - Parecer nº 389841 - Aprovado (28/02/2020)

Versão 08 - Emenda\_05 - Parecer nº4031149 - Pendente (15/05/2020)

Versão 09 - Emenda\_05 - Parecer nº4.083.360 - Aprovado (11/06/2020)

Versão 10 - Emenda\_06 - Parecer nº4.164.376 - Aprovado (20/07/2020)

**Endereço:** Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 58.059-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3208-0704

**E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br

## ANEXO B – RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24h

Nome: \_\_\_\_\_ [ ]1° [ ]2° [ ]3°  
 ID: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

| 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,  |
|                           |                |                   |                    |  |
| Lanche                    |                |                   |                    | Se for pequena, / 2 Se for grande, + ½ Se for extra-grande,  |
|                           |                |                   |                    |  |
|                           |                |                   |                    | X 2  |
| Almoço                    |                |                   |                    |  |
|                           |                |                   |                    | (p25 – p50 – p75 – p100)   |
|                           |                |                   |                    | Descrever quantidades de alimentos por preparação: Papas, sopas, macarronada, feijoada, etc. E colocar neste recordatório, perguntado a responsável pela preparação, para quantas pessoas será dividida. |
|                           |                |                   |                    |  |
| Lanche                    |                |                   |                    | Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário.  |
|                           |                |                   |                    |  |
| Jantar                    |                |                   |                    | Descrever o tipo de cocção:<br>- Fritura   |
|                           |                |                   |                    |  |
|                           |                |                   |                    | -Grelhado  |
| Lanche Noturno            |                |                   |                    |  |
|                           |                |                   |                    | -Cozido  |
|                           |                |                   |                    | - Assado   |
| Preferências Alimentares: |                |                   |                    |  |
| Aversões Alimentares:     |                |                   |                    |  |

## ANEXO C - QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA



### QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA

Nome: \_\_\_\_\_

Data: / / Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( )

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação às pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

**1a** Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**1b** Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

Horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**2a.** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

Dias \_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**2b.** Nos dias em que você fez essas atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**3a** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

Dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA**      ( ) Nenhum

**3b** Nos dias em que você fez essas atividades **vigorosas** por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa, visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

**4a.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de **semana**?

Horas \_\_\_\_\_ minutos \_\_\_\_\_

**4b.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de **final de semana**?

Horas \_\_\_\_\_ minutos \_\_\_\_\_

|  |
|--|
| MATSUDO, S.; <i>et al.</i> Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. <b>Rev. bras. ativ. fís. saúde</b> , p. 05-18, 2001. |
|--|