

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

TAINÁ GOMES DINIZ

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DE PACIENTES COM DIABETES
TIPO 2 CONSIDERANDO GENÓTIPOS DO RS266729 DO GENE DA
ADIPONECTINA E A PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES**

João Pessoa

2025

TAINÁ GOMES DINIZ

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DE PACIENTES COM DIABETES
TIPO 2 CONSIDERANDO GENÓTIPOS DO RS266729 DO GENE DA
ADIPONECTINA E A PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição do Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Dra. Darlene Camati Persuhn

Co-orientadora: Dra. Caroline Severo de Assis

João Pessoa

2025

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

D585a Diniz, Taina Gomes.

Análise do perfil metabólico de pacientes com diabetes tipo 2 considerando genótipos do rs266729 do gene da adiponectina e a presença de complicações / Taina Gomes Diniz. - João Pessoa, 2025.

125 f. : il.

Orientação: Darlene Camati Persuhn.

Coorientação: Caroline Severo de Assis.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes mellitus. 2. Complicação diabética. 3. Perfil metabólico. 4. Estilo de vida. 5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN). 6. Espectroscopia. 7. Variabilidade genética. I. Persuhn, Darlene Camati. II. Assis, Caroline Severo de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

TAINÁ GOMES DINIZ

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DE PACIENTES COM DIABETES
TIPO 2 CONSIDERANDO GENÓTIPOS DO RS266729 DO GENE DA
ADIPONECTINA E A PRESENÇA DE COMPLICAÇÕES**

Tese Defendida no dia 15/04/2025

BANCA EXAMINADORA

Dra. Darlene Camati Persuhn

Orientadora e Presidente da Banca examinadora
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)

Dra. Caroline Severo de Assis

Co-orientadora
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)

PhD. Jose Luiz de Brito Alves

Examinador interno (titular)
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)

Dr. Vinicius José Baccin Martins

Examinador interno (titular)
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)



Documento assinado digitalmente

MARIA DA CONCEICAO RODRIGUES GONCALVES

Data: 22/04/2025 19:13:28-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Maria Da Conceição Rodrigues Goncalves

Examinadora interna (suplente)
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)

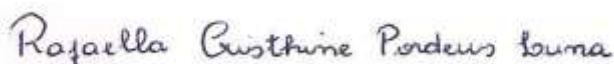


Dra. Rafaela Lira Formiga Cavalcanti de Lima
Examinadora interna (suplente)
(Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição/CCS/UFPB)



Documento assinado digitalmente
GILSON COSTA DOS SANTOS JUNIOR
Data: 13/05/2025 11:15:01-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

PhD. Gilson Costa dos Santos Junior
Examinador Externo ao programa (titular)
(Departamento de genética /UERJ)



Dra. Rafaella Cristhine Pordeus Luna
Examinadora Externo ao programa (suplente)
(Professora adjunta do departamento de Nutrição/CCS/UFPB)



Documento assinado digitalmente
GERALDO PICHETH
Data: 23/04/2025 17:21:13-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Dr. Geraldo Picheth
Examinador Externo à instituição (titular)
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas /UFPR)



Documento assinado digitalmente
FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Data: 22/04/2025 11:51:48-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Examinador Externo à instituição (suplente)
(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPR)

Dedico essa tese de doutorado a minha avó Elza (*in memoriam*), meus pais Valter e Elzabete, ao meu marido Bruno e ao meu filho Teodoro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me proporcionar viver todos os meus sonhos, a minha **mãe do céu** que sem ela eu não sou completa, a eles todo o meu amor e gratidão.

Agradeço imensamente as duas principais pessoas que se fazem presente em minha vida e que são meu porto seguro, minha base e a eles todo o meu amor, que não medem esforços para me ver feliz, que movem montanhas para que meus sonhos sejam realizados, que cuidam, amam, respeitam, os que me deram a vida, meu pai **Valter** e minha mãe **Bete**. Eu sem vocês não sou nada!

Agradeço também a meu marido **Bruno** por toda compreensão, amor, cuidado e companheirismo nos momentos mais difíceis dessa jornada e por me dá no finalzinho desse doutorado meu outro grande amor, nosso filho **Teodoro**. A Minha família que se alegrou com minha conquista, principalmente a minha avó **Elza** que mesmo no meio dessa jornada foi para o céu, mas agora sei que tem mais uma pessoa olhando por mim lá de cima. Eu sempre te amarei minha vó! Ela que em vida se orgulhou pela mulher em que me tornei, a pessoa em que consegue ter o meu infinito amor. A minha prima **Marina** e meu primo **Lucas** Barros, que sempre me escutaram e me incentivaram.

A minha equipe maravilhosa que dividi os momentos de descontração, alegria e aperreios no laboratório **Bruno** e **Carol**... que além de companheira desde o tempo da faculdade agora minha co-orientadora. Não tenho palavras para externar minha gratidão, por toda ajuda que me deu nesse processo.

Ao professor **Alexandre** pela parceria de sempre e ao laboratório de sua responsabilidade (LETFADS).

Ao professor **Josean**, que me permitiu ter uma nova experiência, e a parceria em seu laboratório (LMCA), estendo meus agradecimentos a sua equipe **Evandro, Yuri e Anauara**. Estendo também meus agradecimentos a **Kamila Sabino**, que foi a pessoa que esclareceu o que estava no escuro.

E por último, mas não menos importante, a minha orientadora **Darlene**, que me deu a oportunidade e me ajudou a crescer tanto profissionalmente, quanto estudante, quanto pessoa. Não mediu esforços para me ajudar na escrita de uma assunto totalmente novo e desafiador para mim. Que no meio da minha vida louca e cheia, me apoiou, me ajudou e

me entendeu. Minha eterna gratidão a tudo que me foi proporcionado. A senhora tem um lugar marcado na minhas história.

Agradeço também a universidade federal da paraíba (UFPB), por ter sido o espaço onde cresci academicamente e pude realizar este doutorado. A estrutura, recursos e o ambiente proporcionado foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese, e em particular, sou imensamente grata pela oportunidade de fazer parte de sua comunidade acadêmica. Ao Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba e a todos os pacientes do estudo, que nos permitiram cuidar e ajudar um pouco de sua vida/saúde e que sem eles essa tese não seria possível. Agradeço principalmente a **Dra. Isabela Queiroga** que me recebeu de braços abertos e me ajudou muito. As instituições de apoio financeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Paraíba, Brasil).

RESUMO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular que acomete cerca de 30% dos pacientes com diabetes mellitus (DM) tipo 2. Estudos que explorem fatores de risco para diabetes e para suas complicações são relevantes por desenvolverem mecanismos de reconhecimento antecipado de pacientes em risco. Dentre os genes explorados quanto ao risco de DM2, destaca-se o gene ADP que codifica a Adiponectina uma adipocina que tem papel fundamental na regulação do metabolismo de carboidratos, diminuindo resistência periférica à insulina no diabetes. O polimorfismo rs266729 no gene da ADP, tem sido associado à DM2 contudo há lacunas na literatura quanto à associação com RD. A metabolômica, que é uma análise em larga escala de metabólitos, é uma ferramenta promissora para revelar as alterações metabólicas e o mecanismo subjacente envolvido na patogênese das complicações diabéticas. O objetivo deste estudo foi analisar e comparar o perfil metabolômico de amostras de pacientes saudáveis comparados a DM2 sem RD, portadores de RD em dois estágios de gravidade, não proliferativa (RDNP) e a forma proliferativa (RDP) e também pacientes com amputação de membros. Também analisou-se o perfil metabolômico de pacientes DM2 pertencentes aos diferentes genótipos do rs266729. O estudo é constituído de uma amostra de 127 indivíduos divididos em grupos segundo a classificação na progressão da doença, para a análise de polimorfismo do gene da ADP. Para a metabolômica a população foi agrupada em: controle (CONT), amputados (AMP), pacientes com DM sem RD (DM2), RD não proliferativa (RDNP) e RD proliferativa (RDP). Foram coletados dados sociodemográficos, de atividade física (IPAQ), antropométricos, clínicos e sangue venoso para avaliação do perfil bioquímico (glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total, HDL-c, LDL-c (conteúdo de colesterol nas lipoproteínas de alta e baixa densidade e triglicérides), determinação dos genótipos do polimorfismo *ADIPOQ* utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e análises do perfil metabolômico, que foram realizadas através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Em relação aos metabólitos nos estágios da RD observou-se que na amostra estudada, que a valina, o isobutirato, e as vias da arginina e da prolina foram discriminatórios para o grupo RDNP. O metabolismo de síntese e degradação de corpos cetônicos associado ao metabólito acetoacetato e à biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram discriminatórios para o grupo RDP. O metabolismo da histidina estava presente e discriminatório no grupo AMP. A terapia

com insulina foi mais frequente nos portadores do alelo rs266729 G (grupo CG+GG). O glutamato mostrou-se discriminante para o grupo CG+GG, podendo ser indicativo de um mau prognóstico da doença, já a glutamina e citrulina apresentavam discriminantes para o grupo CC podendo ser indicativo de um bom prognóstico da doença. Já o ciclo da ureia discriminou os grupos CG+GG do grupo CC. Os resultados deste trabalho permitiram avanços na análise da metabolômica de DM2 e suas complicações, trazendo a histidina como discriminante do grupo AMP e a relação glutamato/glutamina com potencial relevância para explicar a associação do alelo rs266729 com DM2.

Palavras-chave: complicação diabética; metabolômica; estilo de vida; espectroscopia de ressonância magnética nuclear; variabilidade genética.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is a microvascular complication that affects approximately 30% of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Studies exploring risk factors for diabetes and its complications are relevant, as they contribute to the development of early recognition mechanisms for patients at risk. Among the genes investigated in relation to T2DM risk, the ADIPOQ gene stands out. It encodes adiponectin, an adipokine that plays a key role in carbohydrate metabolism regulation, reducing peripheral insulin resistance in diabetes. The rs266729 polymorphism in the ADIPOQ gene has been associated with T2DM; however, there are still gaps in the literature regarding its association with DR. Metabolomics, a large-scale analysis of metabolites, is a promising tool for revealing metabolic changes and underlying mechanisms involved in the pathogenesis of diabetic complications. The aim of this study was to analyze and compare the metabolomic profile of samples from healthy individuals and from patients with T2DM without DR, patients with DR in two stages of severity—non-proliferative (NPDR) and proliferative (PDR)—as well as from patients who had undergone limb amputation. In addition, the metabolomic profile of T2DM patients carrying different genotypes of the rs266729 polymorphism was evaluated. The study included a sample of 127 individuals, divided into groups according to disease progression for the analysis of the ADIPOQ gene polymorphism. For the metabolomic analysis, participants were grouped as follows: Control (CONT), Amputees (AMP), T2DM without DR (DM2), Non-proliferative DR (NPDR), and Proliferative DR (PDR). Sociodemographic data, physical activity (IPAQ), anthropometric and clinical data, and venous blood were collected for biochemical profile assessment (glucose, glycated hemoglobin, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, and triglycerides). Genotyping of the ADIPOQ polymorphism was performed using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique, and metabolomic profiling was carried out using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Regarding metabolites in the DR stages, it was observed in the studied sample that valine, isobutyrate, and the arginine and proline pathways were discriminatory for the NPDR group. Ketone body synthesis and degradation metabolism, associated with the metabolite acetoacetate, as well as the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, were discriminatory for the PDR group. Histidine metabolism was present and discriminatory in the AMP group. Insulin therapy was more frequent among carriers of the rs266729 G allele (CG+GG group).

Glutamate was found to be discriminatory for the CG+GG group, potentially indicating a poor disease prognosis, while glutamine and citrulline were discriminatory for the CC group, possibly indicating a more favorable prognosis. The urea cycle also differentiated the CG+GG group from the CC group. The findings of this study contributed to advances in the metabolomic analysis of T2DM and its complications, highlighting histidine as a marker for the AMP group and the glutamate/glutamine ratio as potentially relevant to explain the association of the rs266729 allele with T2DM.

Keywords: diabetic complication; metabolomics; lifestyle; nuclear magnetic resonance spectroscopy; genetic variability.

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 1 – Oftalmoscopia do fundo de olho na RD.....	26
Figura 2 - A interação entre o genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma com o ambiente em um sistema biológico	31
Figura 3 - Fluxo de trabalho da metabolômica por RMN	35
Figura 4 - Metabólitos alterados em diferentes amostras biológicas	43
Figura 5 – Eletroforeses demonstrativas dos perfis adotados para obtenção dos genótipos de <i>ADIPOQ</i> (rs266729)	50
Figura 6 – Metodologia das análises do perfil metabolômico dos pacientes com e sem Retinopatia diabética	52

LISTA DE QUADROS DA TESE

Quadro 1 – Caracterização dos tipos de diabetes.....	21
Quadro 2 – Diagnóstico e classificação da Retinopatia diabética	25
Quadro 3 – Sequência de iniciadores <i>sense</i> e <i>antisense</i> e amplificação por PCR para os polimorfismos <i>ADIPOQ</i> (rs266729)	50

LISTA DE TABELAS DA TESE

Tabela 1 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de DM e pré-diabetes	20
Tabela 2 – Especificidade na coleta e análises de diferentes sítios biológicos	35
Tabela 3 - Resumo dos resultados de artigos observacionais e transversais relacionando aos metabólitos com potenciais biomarcadores para RD.....	40
Tabela 4 - Resumo dos resultados de artigos de revisão e meta-análises relacionando aos metabólitos com potenciais biomarcadores para RD	45
Tabela 5 – Interpretação e diagnóstico nutricional para adultos e idosos	48

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo do estudo.....	84
Figura 2- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo controle e nos grupos diabéticos.....	86
Figura 3- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo SRD e no grupo de diabéticos com retinopatia.....	88
Figura 4- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo AMP e nos demais grupos.....	89
Figura 5- Rotas metabólicas do grupo controle em comparação aos demais grupos.....	91
Figura 6- Via metabólica do grupo S/RD em comparação com os estágios da RD	92
Figura 7- Via metabólica em comparação com o grupo amputado.....	93

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1- Caracterização da população de diabéticos, divididos pelos estágios da RD	82
--	----

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 2

Figura 1- Genotipagem representativa	109
Figura 2- Pontuação VIP para metabólitos relacionados à classificação relativa de metabólitos nos grupos rs266729 CC e rs266729 GC + GG	112
Figura 3- Vias metabólicas da comparação do grupo rs266729 CC versus o grupo rs266729 GC + GG.....	113
Figura 4- Vias metabólicas da comparação do grupo rs266729 CC versus o grupo rs266729 GC + GG em um gráfico de pontos	114
Figura 5- Metabólitos que impactam cada via metabólica, de acordo com os genótipos rs266729.....	120

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1. Parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos de acordo com os genótipos rs266729 (<i>ADIPOQ</i>).....	111
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 ASPECTOS GERAIS DA DIABETES MELLITUS TIPO 2	19
2.2 RETINOPATIA DIABÉTICA COMO MICROCOMPLICAÇÃO DO DIABETES ...	23
2.3 ADIPONECTINA	27
2.3.1 POLIMORFISMOS <i>ADIPOQ</i> DO GENE DA ADIPONECTINA E A RELAÇÃO COM O DIABETES MELITUS TIPO 2.....	28
2.3.2 POLIMORFISMO <i>ADIPOQ</i> rs266729 DO GENE DA ADIPONECTINA E A RELAÇÃO COM RETINOPATIA DIABETICA.	30
2.4 O ESTUDO DA METABOLÔMICA	30
2.4.1 METABOLÔMICA E A RETINOPATIA DIABÉTICA	37
2.4.2 RELAÇÃO ENTRE METABOLÔMICA, DIABETES E AMPUTAÇÃO.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 TIPO DE ESTUDO	46
3.2 POPULAÇÃO	47
3.3 MEDIDAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS	47
3.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA ...	48
3.5 ISOLAMENTO DO DNA DE LEUCÓCITOS.....	49
3.6 POLIMORFISMO DO GENE DA ADIPONECTINA	49
3.7 ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO	50
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
4 RESULTADOS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	69
APÊNDICE A– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	70
APÊNDICE B– INSTRUMENTOS PARA COLETA DE DADOS	72
APÊNDICE C– ARTIGO 1	73
APÊNDICE D- ARTIGO 2	103
ANEXOS	126
ANEXO A– PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO ÉTICA.....	127

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o DM é uma doença crônica, e muitas vezes evitável. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (DM2) incluem desde o excesso de peso, a falta de exercícios físicos e a genética (WHO, 2024). Dados epidemiológicos divulgados pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) em 2021 indicam que a prevalência do DM no Brasil é de 10,5%, o que corresponde a aproximadamente 20 milhões de pessoas. Em nível global, o número de adultos vivendo com a doença ultrapassou os 800 milhões (Gregory *et al.*, 2022). Embora avanços significativos tenham sido alcançados na literatura sobre os mecanismos da DM, ainda existem lacunas importantes, especialmente no que diz respeito à prevenção das suas complicações crônicas. Com isso, este trabalho visa avançar e contribuir com o conhecimento científico, propondo compreender melhor os fatores metabólicos envolvidos na doença crônica e assim contribuir com abordagens mais eficazes para prevenir e tratar as complicações.

Complicações microvasculares podem ser desencadeadas no paciente com DM2 em resposta a hiperglicemia dentre elas a retinopatia diabética (RD). Trata-se de uma complicação de relevância por representar uma das principais causas de cegueira evitável na população trabalhadora adulta (Fernandes Silva *et al.*, 2024). Dados nacionais revelam que a taxa de prevalência de RD afeta cerca de 35% dos pacientes DM (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2021). Isso reflete em um número aproximado de quatro milhões de brasileiros que apresentam algum grau de comprometimento relacionado à RD. Dados mais recentes do VIGITEL (2023), para a cidade de João Pessoa o DM afeta 7,2% da população cerca de 58 mil indivíduos na faixa-etária maior de 18 anos de idade, o que corresponde a uma taxa de 10% na população paraibana (VIGITEL, 2023). Quanto maior o tempo de evolução do DM maior é o risco de desenvolver RD (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2021).

Outro desfecho negativo ocasionado pelo DM é a amputação. Indivíduos com DM2 apresentam um aumentado risco para eventos isquêmicos, como de exemplo a doença arterial periférica, podendo levar a amputação de membros. A glicemia descontrolada pode

levar a perda da sensibilidade dos órgãos, ocasionar mais feridas nos membros, consequentemente deixar o portador de DM mais sujeito a dificuldades na cicatrização e por esse evento podendo desencadear a amputação de membros (Barnes, 2020).

A abordagem genética tem sido utilizada para explicar desfechos negativos do diabetes. Recentemente a literatura vem explorando o gene da adiponectina (ADP) e sua relação com o DM2. O gene responsável pela codificação da ADP, *ADIPOQ*, produz uma adipocina que desempenha um papel fundamental na regulação dos processos metabólicos do corpo, contribuindo para a melhora da função das células β do pâncreas. Portanto, sua função adequada é essencial para a regulação das concentrações glicêmicas (Hotta *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2011).

Em contrapartida, concentrações reduzidas de ADP estiveram associados ao desenvolvimento com DM2 (Alimi *et al.*, 2021). O alelo G do polimorfismo *ADIPOQ* (rs266729) está associado ao aumento no risco da doença (Sun *et al.*, 2017).

A metabolômica é uma ciência que se baseia na análise global quali/quantitativa de metabólitos presentes em um determinado fluido biológico, como sangue, urina e tecidos, e tem sido utilizada como uma ferramenta poderosa para a identificação de biomarcadores para doenças complexas (Lu *et al.*, 2019), como o DM e suas complicações. Essa abordagem complementa os dados dos estudos ômicos. Ela resulta dos processos de transcrição e tradução genética, além de ser influenciada pelas interações com exposições ambientais. Acredita-se que os metabólitos estejam intimamente relacionados ao fenótipo, especialmente em doenças multifatoriais (Yun *et al.*, 2020).

Uma grande vantagem da metabolômica é a capacidade de descobrir metabólitos novos e potencialmente relevantes que podem ser a base de abordagens terapêuticas ou indicadores de prognóstico (Filla; Edwards, 2016). Com relação aos estudos metabolômicos envolvendo RD, a literatura não apresenta dados de população brasileira. Além disso, a análise de grupos com DM2 apresentando amputação e a análise metabolômica à luz dos genótipo rs266729 são lacunas na literatura mundial.

Para tanto, o presente estudo teve como objetivo geral analisar o perfil de metabólitos por RNM presentes nas amostras sanguíneas de indivíduos com diferentes graus de RD ou sem RD categorizados de acordo com os genótipos dos polimorfismos da ADP. E como objetivos específicos, determinar o perfil de metabólitos nos estágios da RD, identificar os genótipos *ADIPOQ* do gene da ADP, avaliar os parâmetros clínicos,

antropométricos, bioquímicos e de estilo de vida e relacionar os metabólitos detectados com os genótipos da ADP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DA DIABETES MELLITUS TIPO 2

DM é uma doença metabólica com características de hiperglicemia resultante de falha da secreção ou ação da insulina ou a junção das duas falhas pela célula β do pâncreas. A longo prazo o DM está associado a complicações crônicas, especialmente dos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024).

A doença em 2021 foi causa direta de 1,6 milhões de óbitos e 47% das óbitos aconteceram antes dos 70 anos. Essa elevada prevalência somada à perspectiva de grande crescimento nas próximas décadas em todos os países, bem como o grande número de mortes e elevados gastos financeiros, faz do DM um grave problema de saúde pública (WHO, 2024).

Na cidade de João Pessoa/PB o DM afeta cerca de 58 mil indivíduos na faixa-etária acima de 18 anos de idade, o que corresponde a uma taxa de 10 % na população paraibana. (Vigitel, 2023). Desde 1980 a prevalência do diabetes quase dobrou passando de 4,7% para 8,5% na população adulta. Ao longo dos anos, a prevalência de diabetes vem aumentando em países de baixa e média renda. O diabetes causou 1,5 milhões de mortes em 2012, tendo a a hiperglicemia como principal causa, ocasionou 2,2 milhões de mortes, aumentando os riscos de doenças cardiovasculares e outras doenças (WHO, 2021).

A hiperglicemia persistente característica do DM é resultado da incapacidade de secreção e/ou atuação da insulina, um hormônio peptídico que é responsável pela captação da glicose plasmática em quase todos os tecidos do organismo humano, logo após à sobrecarga de carboidratos no organismo, assim esse hormônio controla a concentração da glicose no sangue (Ashcroft; Rorsman, 2012).

O diagnóstico laboratorial do DM é caracterizado pela concentração de glicose plasmática maior ou igual a 126mg/dL em jejum; e a HbA1c maior que 6,5%, apresentados na tabela 1 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024).

Tabela 1- Critérios laboratoriais para diagnóstico de DM e pré-diabetes.

Crítérios	Normal	Pré-diabetes	DM
Glicemia de jejum (mg/dl)	< 100	100-125	≥ 126
Glicemia ao acaso (mg/dl) + sintomas	-	-	≥ 200
Glicemia de 1 hora no TTGO (mg/dl)	< 155	155-208	≥ 209
Glicemia de 2 horas no TTGO (mg/dl)	< 140	140-199	≥ 200
HbA1c (%)	< 5,7	5,7-6,4	≥ 6,5

DM: diabetes mellitus; TTGO: teste de tolerância à glicose oral; HbA1c: hemoglobina glicada. *Considera-se como jejum a cessação de ingesta calórica de 8-12 horas. **Carga oral equivalente a 75 g de glicose anidra diluída em água.

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2024.

Todos os tipos de diabetes podem levar a várias complicações como ataque cardíaco, derrame, amputação da perna, insuficiência renal (nefropatia diabética), perda da visão (RD), além de danos nos nervos, podendo levar também a morte prematuramente (WHO, 2019). Os tipos de diabetes estão descritos no quadro abaixo:

Quadro 1 – Caracterização dos tipos de diabetes

Tipo de diabetes	Caracterização da doença
Diabetes Mellitus tipo 1	Conhecida como insulínodépendente para controlar a quantidade de glicose no sangue e doença que se inicia na infância. Caracterizada pela falha na produção da insulina pelas células β do pâncreas. Possui sintomas como micção e sede excessiva, fome constante, perda de peso, alteração na visão e fadiga (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024).
Diabetes Mellitus tipo 2	Conhecida por acometer pacientes na fase adulta, é o responsável pela grande maioria de pessoas com diabetes no mundo. Os sintomas são parecidos com os do DM1, porém menos frequentes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024). O DM2 é resultante por fatores genéticos e metabólicos de estilo de vida, particularmente o excesso de comida e inatividade física sendo os principais determinantes da doença (GBD 2015). A significativa redução na função das células β já está presente no momento do diagnóstico do DM2, e declina continuamente, independentemente do tratamento. A resistência à insulina é uma característica comum do DM2, porém é improvável que essa característica cause a doença a menos que a perda progressiva da função das células beta se desenvolva (Sociedade Brasileira de Diabetes 2024).
Pré-diabetes	São condições intermediárias entre concentrações normais de glicose no sangue e diabetes. Pessoas obesas, hipertensos e pessoas com alterações nos parâmetros lipídicos estão no grupo de alto risco. (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024).
Diabetes gestacional	Esta condição é temporária, ocorre no período de gestação e pode levar ao risco de DM2 a longo prazo, seu diagnóstico é feito no pré-natal (por valores de glicose acima do normal, porém abaixo das concentrações de diagnóstico para o diabetes), em vez dos sintomas relatados (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2024).
Outros tipos de diabetes	• LADA (Diabetes autoimune latente em adultos): Segundo a OMS (2019), o LADA é uma forma híbrida de DM, com características

	sobrepostas de DM1 e DM2. Tendo este quadro sido geralmente observado em adultos. • MODY (Diabetes de início na maturidade dos jovens): Forma monogênica mais comum do DM, sendo autossômico dominante. Ocasionalmente por defeitos em genes que participam da secreção de insulina. São características principais a hiperglicemia de início precoce (< 25 anos), história familiar de DM antes de 25 anos em 2 a 3 gerações, auto anticorpos negativos e peptídeo C detectável (>0,6 ng/ml) após cinco anos do diagnóstico de DM (Shields <i>et al.</i> 2012).
--	---

Legenda: DM1(Diabetes mellitus tipo 1), DM2 (Diabetes mellitus tipo 2), OMS (Organização mundial de saúde).

No DM2 todos esses fatores contribuem para a resistência periférica à ação da insulina (Hu, 2011). As Ilhotas de Langerhans, que consistem tanto em células β , como outras, desempenham um papel de relevância na regulação da glicose sanguínea (Lawlor, 2019). Essas ilhas celulares estão presentes na síntese e secreção de insulina, mantendo as concentrações circulantes de glicose em homeostase. No entanto, ao longo do tempo, juntando com o sedentarismo, alimentação inadequada e a genética, pode levar a uma hiperglicemia crônica que afeta negativamente o funcionamento das células β podendo levar a uma deterioração progressiva, precedendo o desenvolvimento do DM2. A coexistência de resistência à insulina e fatores genéticos pode levar à diminuição da expressão do gene da insulina e à redução da atividade do promotor da insulina, comprometendo ainda mais a função das células β (Lawlor, Stitzel 2019; Solis-herrera, 2021; Sayyed *et al.*, 2023).

Quando há hiperglicemia persistente, existe um maior risco de desenvolvimento de complicações. A hiperglicemia também causa estresse oxidativo na retina e pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da RD, danificando células da retina (Sato *et al.*, 2011). Já o contrário, quando a glicemia está muito baixa, nos dois tipos pode causar convulsões ou perda de consciência. Isso pode ser acarretado por falta de alimentação, exercício intenso, ou alta dosagem do medicamento para controle da glicemia (Lei *et al.*, 2019).

O diabetes prolongado e descontrolado resulta em lesões envolvendo vasos sanguíneos de médio e grande calibre como artérias e veias (complicações macrovasculares) e vasos capilares e arteríolas em tecidos específicos (complicações microvasculares) (Chamnan *et al.*, 2009; Matheus *et al.*, 2013). As lesões microvasculares acometem as vênulas, arteríolas e vasos capilares levando a disfunção de órgãos ou tecidos-alvos tendo seus efeitos mais profundos na retina, rim e nervos periféricos, resultando em retinopatia diabética, nefropatia diabética e neuropatia diabética, respectivamente (Nathan *et al.*, 2009; Litwak *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2016).

A RD é a complicação microvascular decorrente do DM, em resposta à hiperglicemia duradoura, que afeta a retina. Acomete cerca de 1 a cada 3 indivíduos com DM, com incidência de 24 a 39% da população diabética (Brasil, 2021). A Federação Internacional de Diabetes (Idf) (2021) estimou que 10,5% da população adulta (20-79 anos) tem diabetes e quase metade não sabe que possui a doença. Estimou também que a população global com DM em 2045 será de 783 milhões, tendo então um aumento de 46% ao redor do mundo.

2.2 RETINOPATIA DIABÉTICA COMO MICROCOMPLICAÇÃO DO DIABETES

Segundo Antonetti, Klein e Gardner (2012) e Henriques *et al.* (2015) a RD tem uma fisiopatologia classicamente descrita onde as primeiras alterações histológicas ocorrem a concentrações dos capilares retinianos com o espessamento da membrana basal, perda dos pericitos e alterações das *Tight junctions* (que são proteínas de junção e justas entre as membranas laterais das células), levando a uma incompetência de barreira hemato-retiniana, promovendo um aumento da permeabilidade vascular e fenômenos vaso oclusivos. Em estudo mais recente de revisão, Wang (2018) demonstra os achados da literatura que a fisiopatologia da RD, ocasiona danos microvasculares na retina, pelo impacto da hiperglicemia. São vias fisiológicas impactadas pela hiperglicemia: a via dos poliois, o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), a via da proteína quinase C (PKC) e a via da hexosamina que implicam no dano vascular (Bronwlee, 2005). Além de explorar que a RD pode ocorrer por inflamação e neurodegeneração retiniana.

A via dos poliois, tem relação com a enzima aldose redutase, que com a presença da glicose elevada, faz com que se tenha um aumento na susceptibilidade ao estresse

oxidativo intracelular (Engerman, Kern, Larson, 1994). Já o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), pode danificar a célula retiniana por: modificação das proteínas intracelulares envolvidas na regulação da transcrição genética (McLellan *et al.* 1994), precursores de AGE podem se fundir para fora de célula e modificar a matriz extracelular, ocasionando uma disfunção celular (Charonis *et al.* 1990). Além disso, esses precursores de AGE, modificam proteínas circulantes como a albumina. Essa proteínas modificadas podem então se ligar aos AGEs e ativá-los, causando produção de citocinas inflamatórias, ocasionando doença vascular (Li *et al.* 1996).

A via da proteína quinase C (PKC), quando ativada pela hiperglicemia, tem efeitos na expressão gênica aumentando a síntese da molécula diacilglicerol, que é um cofator crítico para as formas de proteína quinase-C (Koya, King, George, 1998). Também o aumento da atividade da via da hexosamina, que ocasiona o processo de fosforilação e a supermodificação dessa glucosamida frequentemente resulta em mudanças patológicas na expressão genica (Kolm-Litty *et al.*,1998).

Para RD alguns fatores de risco já foram estabelecidos, tais como a duração da DM, controle glicêmico, ND (Nefropatia diabética), hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, doença cardiovascular, obesidade, fatores de riscos ambientais (tabagismo, sedentarismo, consumo de bebidas alcoólicas), fatores de riscos oculares e genéticos (Lin *et al.*, 2021).

Tendo a glicemia elevada um dos principais fatores de risco para a RD, Roohi (2023) em sua revisão descreveu que a hiperglicemia é também causada pelo estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático que acomete duplamente o organismo do paciente diabético. O aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) é o que caracteriza o estresse oxidativo, causando os danos celulares, manifestando uma disfunção nas células β .

Também se tem relato na literatura entre semelhança da fisiopatologia entre as duas complicações microvasculares do diabetes, a RD e ND. No estudo de revisão de Tang (2024), o autor trouxe semelhanças notáveis entre as complicações. Relatou que, em ambas possuem disfunção endotelial, como consequência á hiperglicemia que induz a lesão endotelial de ambos os órgãos. Além disso, fatores de crescimento e sinalização como a família VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), a molécula de adesão celular (CAM), e a sinalização Notch estavam envolvidos no desenvolvimento das microcomplicações.

Outro fato importante sobre a desregulação da glicemia como fator de risco para RD, é que esse evento pode desencadear um funcionamento anormal do sistema nervoso autônomo e com isso, ocasionar uma rigidez arterial e consequentemente levar a um aumento da pressão pulsátil, podendo causar danos à microcirculação retiniana, esse evento pode ser desencadeado também pela hipertensão e por alterações na vasculatura (Drinkwater *et al.*, 2021; Prakash, Parija e Kar 2023)

A hiperglicemia persistente desencadeia a maior parte dos processos que promovem o desenvolvimento da RD, assim, um controle glicêmico adequado traz benefícios quanto à prevenção em diabéticos recém diagnosticados e/ou atraso na progressão para estágios mais avançados em indivíduos já afetados. Nesse contexto a principal abordagem na conduta clínica da doença é a redução das concentrações de glicose sanguínea (< 126 mg/dL no jejum) e HbA1c ($< 6,5\%$) (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2021). Concentrações maiores destes dois marcadores caracterizam mau controle glicêmico e sua associação como fator de risco independente para RD tem sido confirmada por vários estudos (Kawasaki *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014).

Em estudo recente de revisão, o autor pontua os fatores de risco para o desenvolvimento da RDP que é o estágio mais avançado da RD, onde a maior característica é a neovascularização anormal na retina, esse estágio mais avançado pode levar o paciente diabético a cegueira. Fatores como aumento da HbA1c, o comprometimento renal, a idade mais jovem para o diagnóstico do DM e aumento dos triglicerídeos, foram listados como os principais fatores para o avanço do estágio da RD para RDP (Perais *et al.*, 2023).

Atualmente os critérios aceitos para a classificação clínica da RD são baseados na metodologia do grupo *Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) padronizada por Wilkinson *et al.*, (2003) e que constitui uma escala de danos visuais encontradas no decorrer da progressão natural da doença (Quadro 2). Clinicamente a RD é identificada pela presença de algumas ou todas as seguintes lesões: microaneurismas, hemorragias, exsudatos duros de lipídios, manchas algodinosas, edema macular, oclusão capilar e neovascularização. A neovascularização marca a progressão para o estágio de pior prognóstico da doença, a RDP, e sua distinção da RDNP no diagnóstico clínico (Figura 1).

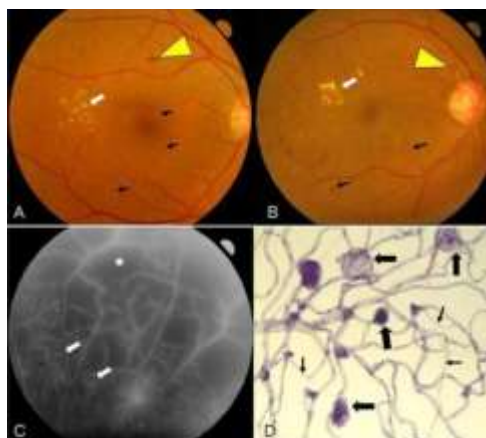
Quadro 2– Diagnóstico e classificação da Retinopatia diabética.

Grau da retinopatia	Achados observados á fundoscopia
---------------------	----------------------------------

Sem RD	Ausência de anormalidades
RD não-proliferativa leve	Apenas microaneurismas
RD não-proliferativa moderada	Mais do que microaneurismas e menos do que RD não-proliferativa grave.
RD não-proliferativa grave	Ausência de RD proliferativa e qualquer das alterações a seguir: mais de 20 hemorragias intra-retinianas em cada um dos 4 quadrantes; dilatação venosa em 2 ou mais quadrantes; anormalidades microvasculares intra-retinianas em 1 ou mais quadrantes
RD proliferativa	Neovascularização, hemorragia vítrea pré-retiniana

Fonte: Wilkinson *et al.*, 2003.

Figura 1– Oftalmoscopia do fundo de olho na RD.



Legenda: A: RDNP severa com microaneurismas (setas pretas), hemorragia (seta amarela) e exsudatos (seta branca); B: RDP com microaneurismas (setas pretas), juntamente com uma área de neovascularização do disco óptico (seta amarela) e exsudatos (seta branca); C: RDP após uso de marcador fluorescente mostrando áreas de profunda não perfusão da retina (estrela) inúmeros pontos brancos indicando aneurismas (setas brancas); D: microaneurismas capilares (setas grossas) e capilares degenerados (setas finas) em RDP. Fonte: Tang; Kern (2011).

Estudos indicam diferença significativa na frequência de RD entre diferentes grupos étnicos bem como sua maior agregação entre irmãos não gêmeos independente dos fatores de risco clínicos e ambientais. Esses resultados fornecem indícios da existência de componente genético na susceptibilidade à esta complicação (Emanuele *et al.*, 2005; Rema *et al.*, 2005).

Uma variedade de genes candidatos tem sido investigada quanto a sua participação na etiologia ou modulação da RD, dentre os quais: genes que codificam proteínas envolvidas em processos oxidativos (Hovnik *et al.*, 2009; El-bab *et al.*, 2013), proliferativos, via do poliol (Abhary *et al.*, 2010) e receptores de produtos de glicação avançada (Yang *et al.*, 2020). Todavia, estudos de revisão indicam que a RD possui um cunho hereditário, entretanto, ainda não existem pesquisas que definam um loci de risco associado ao desenvolvimento da RD (Han *et al.*, 2019).

2.3 ADIPONECTINA

A ADP, é produzida e liberada principalmente pelas células de gordura do tecido adiposo, e em diversos tecidos, possui ações variadas, como no fígado, que diminui a gliconeogênese, liponeogênese e triglicerídeos (Berg, 2001), nos rins, ajuda a regular pressão arterial e a filtração glomerular (Rutkowski, 2013), nas células β do pâncreas, aumentando a secreção de insulina e a sobrevivência das células β e diminuindo a apoptose (Ye, 2014), nos vasos sanguíneos promovendo a vasodilatação e melhora a função endotelial (Okamoto, 2002), nos ossos, promovendo a diferenciação dos osteoblastos e inibe a formação dos osteoclastos (Oshima, 2005) e nas células do sistema imunológico, inibindo a ativação das células T e a produção de citocinas pró inflamatórias (Takemura, 2007), antes de ser depurada pelos hepatócitos (Halberg, 2009).

É uma proteína formada de 244 aminoácidos (Hu; Liang; Spiegelman, 1996). Caracterizada como um hormônio gerado pelos adipócitos cuja função primordial é tornar os órgãos mais sensíveis aos efeitos da insulina. Também é reconhecida como uma molécula que previne a aterogênese, a inflamação e a apoptose, tornando-a uma molécula “antidiabética” (Holland *et al.*, 2011; Yanai, 2019). Concentrações séricas elevadas de ADP estão relacionadas com melhor sensibilidade à insulina (Hotta *et al.*, 2000). E concentrações reduzidas presentes na obesidade passo que aumentam com a perda de peso (Holland *et al.*, 2011; Yanai, Yoshida 2019; Cobos-Palacios *et al.*, 2022; Khalafi *et al.*, 2023). É uma molécula relativamente abundante na circulação apresentando concentrações na faixa de 2–20 $\mu\text{g/mL}$ e nas mulheres as concentrações circulantes são entre 30 – 50% maiores do que nos homens (Turer; Scherer, 2012).

A ADP se diferencia das demais adipocinas pelo fato de sua concentração sérica tendem a reduzir em situações de obesidade. Por outro lado, a maior parte das outras

adipocinas, especialmente as de natureza pró-inflamatória, são liberadas em concentrações maiores conforme o tamanho da célula adiposa aumenta. Este aspecto é crucial para manter o equilíbrio entre a secreção de adipocinas com ações pró e anti-inflamatórias (Skurk *et al.*, 2007; Turer; Scherer, 2012).

Um estudo abrangente indicou concentrações altas de ADP estão ligados em diversas populações a um risco reduzido de desenvolver DM2 (Li, 2009). Em outra revisão foi mostrado que as concentrações de ADP estão correlacionados negativamente com o DM, e demonstraram ser afetados pela nutrição, sendo a ADP um bom biomarcador para o distúrbio do DM (Khoramipour *et al.*, 2021). Uma meta-análise com DM gestacional, avaliou que em concentrações crescentes de ADP circulantes, o risco de DM gestacional diminuiu significativamente em mulheres grávidas, sendo então uma relação inversa entre ADP e diabetes gestacional (Gao *et al.*, 2023). Em contrapartida, um estudo de coorte realizado com a população afro-americana revelou uma correlação positiva e significativa entre a ADP e a previsão de diabetes tipo 2. Essa correlação foi estabelecida através das análises estatísticas que avaliaram as concentrações de ADP em indivíduos sem diabetes inicialmente e ao longo do tempo sua associação com a incidência da doença.

2.3.1 POLIMORFISMOS *ADIPOQ* DO GENE DA ADIPONECTINA E A RELAÇÃO COM O DIABETES MELITUS TIPO 2

Considerando as funções biológicas da ADP, como suas propriedades de sensibilização à insulina, anti-inflamatórias e antiaterogênicas, esta adipocina tem um papel importante no surgimento de resistência insulínica (RI) e DM2 (Lim, Quon, Koh, 2014). Estudos indicam que as concentrações de ADP são diminuídos em casos de DM2, doença hepática gordurosa não alcoólica e obesidade (Kadowaki *et al.*, 2006; Hosseini *et al.*, 2019; Sánchez *et al.*, 2019).

O gene *ADIPOQ* é responsável pela codificação da proteína ADP, se localiza no cromossomo 3q27. Esse gene apresenta vários polimorfismos, muitos deles na região promotora e que impactam na expressão. O rs266729, é um polimorfismo que está localizado no sítio de ligação de um fator de transcrição, desencadeando uma substituição de citosina para guanina na posição 11377 que tem significado clínico já explorado na literatura (Bai, Tang, LI, 2020; Khoramipour *et al.*, 2021). Pesquisas em humanos

mostraram que esta região do gene é descrita como um locus de susceptibilidade à síndromes metabólicas e DM2 e doença coronariana e com isso estudos sobre essas relações vem sendo vastamente exploradas (Vionnet *et al.*, 2000; Mohammadzadeh, Zarghami, 2009; Sun *et al.*, 2017; Khoramipour *et al.*, 2021).

Além desses estudos iniciais, um artigo de caso controle na população iraniana, também descreveu a relação do polimorfismo rs266729 sendo significativamente associado a um aumento do risco de DM2 em comparação ao grupo controle (Alimi, Goodarzi, Nekoe, 2021). Howlader *et al.* (2021) em sua pesquisa de revisão mais abrangente também avaliou o mesmo SNP e a relação com o DM, concluindo que não existe um polimorfismo específico que desencadeia a doença, mas sim vários SNPs do gene da *ADIPOQ* qualificáveis para serem fatores de risco no desenvolvimento da doença. E ainda afirma que firmemente a ADP desempenha um papel crucial na patogênese tanto do DM1, quanto no DM2 e no DM gestacional. Possuindo a informação adicional que os polimorfismos rs2241766 e rs266729 foram amplamente associados ao diabetes gestacional.

Pesquisa atual e transversal com a população de 789 indivíduos vietnamitas, diabéticos e com síndrome metabólica (SM), avaliou quatro SNPs (rs266729, rs1501299, rs3774261 e rs822393) do gene *ADIPOQ* com intuito de avaliar as potenciais associações com DM2 e SM. Concluiu que apenas o SNP rs266729 era o principal candidato ao risco aumentado do indivíduo desenvolver DM2 (Truong, *et al.*, 2022).

Como a relação entre o SNP rs266729 e o DM2 é bem descrita na literatura concluímos essa afirmação com estudo de meta análise de Wu e Wang, (2019), que demonstrou que esse polimorfismo tinha relação com a doença em diversas populações como a caucasiana, asiáticas e norte americanas.

Além disso, estudos vem relacionando o alelo G com o DM2. Em estudo de meta análise, os resultados revelaram que o rs266729 é um local de suscetibilidade ao DM2, e que o alelo G neste local é o que contribui para o desenvolvimento do DM2 (Sun *et al.* 2017).

Concentrações plasmáticas de ADP parece ser influenciadas por variações genéticas como foi explanado no mesmo estudo descrito acima em população iraniana que mostrou concentrações plasmáticas mais baixos em portadores dos genótipo GC + GG tanto em indivíduos saudáveis quanto portadores de DM2 (Alimi, Goodarzi, Nekoe, 2021). O alelo G desse polimorfismo associa-se com menores concentrações de ADP mesmo em

populações distintas como americanos e russos (Zhang *et al.*, 2009; Christodoulou *et al.*, 2020; Smetnev *et al.*, 2019). Na população mexicana, o alelo G também se associou como fator de risco para o desenvolvimento de SM (Robles *et al.*, 2020). Esse alelo aumenta o risco de DM2 em 1,13 vezes comparando com os não portadores do alelo. Indivíduos com o genótipo GG *versus* CC têm um risco aumentado de 3 vezes para o desenvolvimento de DM2, já para o grupo GC o aumento chega a ser 2 vezes maior comparado ao genótipo CC (Sun *et al.*, 2017; Kaftan; Hussain *et al.*, 2015).

Corroborando também com esses achados, De Luís *et al.* (2020) traz em seu estudo de cunho transversal a informação que a presença do alelo G do SNP rs266729 em indivíduos homozigotos e heterozigotos apresentou valores elevados de insulina e HOMA-IR, e valores baixos de ADP. Contudo, portadores do alelo G apresentaram maior taxa de diabetes mellitus e hiperglicemia.

2.3.2 POLIMORFISMO *ADIPOQ* rs266729 DO GENE DA ADIPONECTINA E A RELAÇÃO COM RETINOPATIA DIABÉTICA.

Em seu estudo transversal Li *et al.* (2016), avaliou 372 pacientes DM2 com RD e 145 pacientes DM2, sem RD, sendo todos chineses. Concluiu que a combinação da utilização da terapia de insulina com o genótipo GG do SNP rs266729, podem mediar os efeitos da insulina no risco da RD. Porém não houve associação entre genótipos ou alelos e RD e seus estágios (RDNP e RDP).

Até essa última atualização da escrita dessa tese, apenas um artigo de Li *et al.* (2016) descreve sobre a relação do rs266729 e a retinopatia diabética, demonstrando então que o papel da ADP na patogênese da RD ainda é desconhecido.

2.4 O ESTUDO DA METABOLÔMICA

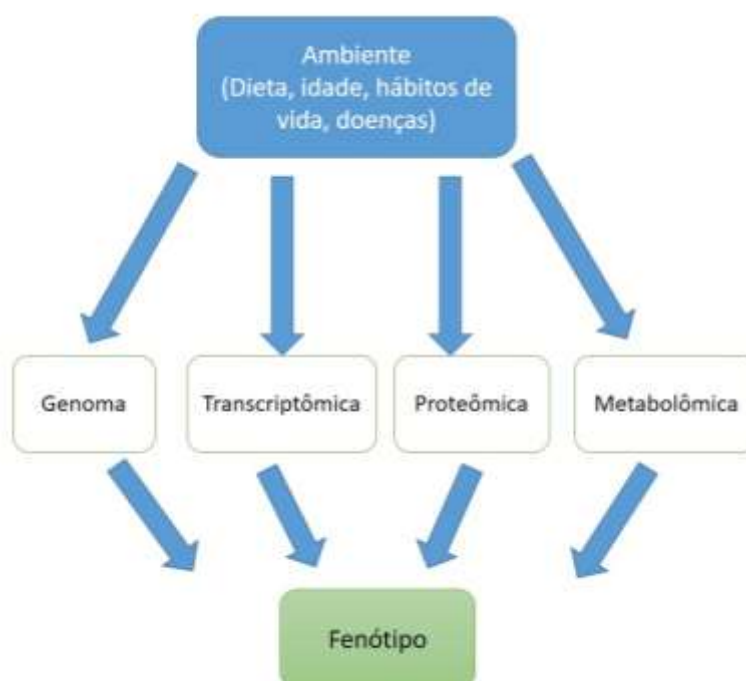
A metabolômica refere-se a um estudo de larga escala de pequenas moléculas presentes em um determinado fluido biológico, como sangue, urina, humor vitreo, humor aquoso e tecidos, e tem sido utilizada como uma ferramenta poderosa para a identificação de biomarcadores para doenças complexas (Whishart, *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2019), como o DM e suas complicações. Os metabólitos circulantes são intermediários ou produtos finais das diversas vias metabólicas, além de ser influenciada pelas interações ambientais. Outro aspecto é que os dados metabolômicos trazem não só moléculas formadas endogenamente

mas também os exógenos que estão circulantes (Tan, *et al.* 2016). Acredita-se que os metabólitos estejam intimamente relacionados ao fenótipo, especialmente em doenças multifatoriais (Yun *et al.*, 2020).

Essa ciência vem ganhando cada vez mais espaço, surgindo principalmente pelo paradigma que sustenta a fenotipagem metabólica clínica ou qualquer mudança de saúde, física ou histológica no humano, pode resultar em alterações caracterizadas em amostras biológicas, que podem estar conectadas a doenças crônicas e interações gene-ambiente. Com isso, a metabolômica ganha ainda mais importância, pois permite a previsão dos riscos de doenças e das respostas aos tratamentos de forma individualizada (Holmes *et al.*, 2015; Ashrafian *et al.*, 2021).

A metabolômica é considerada o centro dos estudos “ômicos” (Figura 2) por trazer informações sobre o que de fato está ocorrendo no organismo. Acredita-se que é o método mais sensível para identificar fenótipo (Elis, *et al.*, 2007). As mudanças no metaboloma podem ocorrer em questões de segundos, portanto, ele reflete com precisão o estado da condição clínica quase que instantaneamente (Goodrac, *et al.*, 2004).

Figura 2- A interação entre o genoma, o transcriptoma, o proteoma e o metaboloma com o ambiente em um sistema biológico.



Autor: Adaptado de Tan, Begley, Mullard, Hollywood e Bishop, 2016.

Seus produtos biológicos são denominados metabólitos, são resultantes do metabolismo das mais diversas substâncias dos organismos, são pequenas moléculas circulantes que estão livres em diversos fluidos biológicos ou tecidos (Roberts *et al.*, 2014). Esses metabólitos são de baixo peso molecular em matrizes biológicas complexas (Lu *et al.* 2019). Visto que os metabólitos são também resultados de influências ambientais e microbianas, o estudo da metabolômica se torna uma interação dos fatores genéticos e ambientais. A metabolômica tem sido amplamente utilizada em diversas áreas da pesquisa biomédica, incluindo a identificação de biomarcadores para doenças complexas, como o diabetes mellitus, o câncer e as doenças cardiovasculares (Tzekov, 2011, Morze *et al.*, 2022).

São métodos analíticos da metabolômica a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (MS do inglês *Mass Spectroscopy*) que engloba à cromatografia gasosa (GC-MS) ou cromatografia líquida (LC-MS). Para esse estudo, a metabolômica foram realizadas por RMN.

MS é uma técnica que identifica e quantifica os compostos biológicos do organismo com resolução e sensibilidade pois reduz a supressão de íons e melhora a precisão quantitativa dos resultados, especialmente para metabolitos menos abundantes. Permite identificar isômeros. Os compostos são inicialmente separados pelas técnicas (ou seja, GC ou LC) com função de reduzir a supressão de íons (Utilizado na técnica para que tenha uma separação das moléculas, evitando assim, que cheguem muitas moléculas na fonte de ionização, aumentando assim a capacidade das moléculas se ionizarem e serem analisadas), antes da quantificação e identificação pelo espectrômetro de massa. A GC-MS é mais adequada para metabolitos mais voláteis, não polares e de baixo peso molecular, já a LC-MS é mais indicada para metabolitos de alto peso molecular, termolábeis e polares. Todas elas os metabolitos passam por uma coluna ou gasosa ou líquida, que é o que distingue a técnica MS utilizada (Chen, Gerszten, 2020; Jin, Ma, *et al.*, 2021; He *et al.*, 2023).

A RMN é a técnica analítica multifuncional, com caráter mais qualitativo, contudo, também pode ser quantitativa, sendo altamente automatizável, confiável e muito rápida. Utilizada para detectar simultaneamente vários metabólitos de fluidos corporais. O preparo

e a análise das amostras por RMN são etapas cruciais da metabolômica, garantindo assim dados precisos e relevantes (Ghafari, Sleno, 2024).

Nos estudos sobre metabolômica observamos duas abordagens principais que são mais comumente utilizadas, a abordagem não direcionada (conhecida como perfil metabolômico) e abordagem direcionada (que é a quantitativa). A não direcionada engloba uma etapa de identificação dos metabolitos detectados, seguida de sua quantificação relativa, geralmente comparando grupos dentro do mesmo conjunto de dados. Essa abordagem é útil para gerar hipóteses (Kapoor, Vaidyanathan, 2016). Em contra partida, a abordagem direcionada é mais focada na quantificação de metabolitos específicos e previamente definidos. Nessa abordagem o número de metabolitos analisados é bem menor. No entanto, a abordagem direcionada é altamente sensível e seletiva, sendo ideal para a quantificação integral (Ghafari, Sleno, 2024).

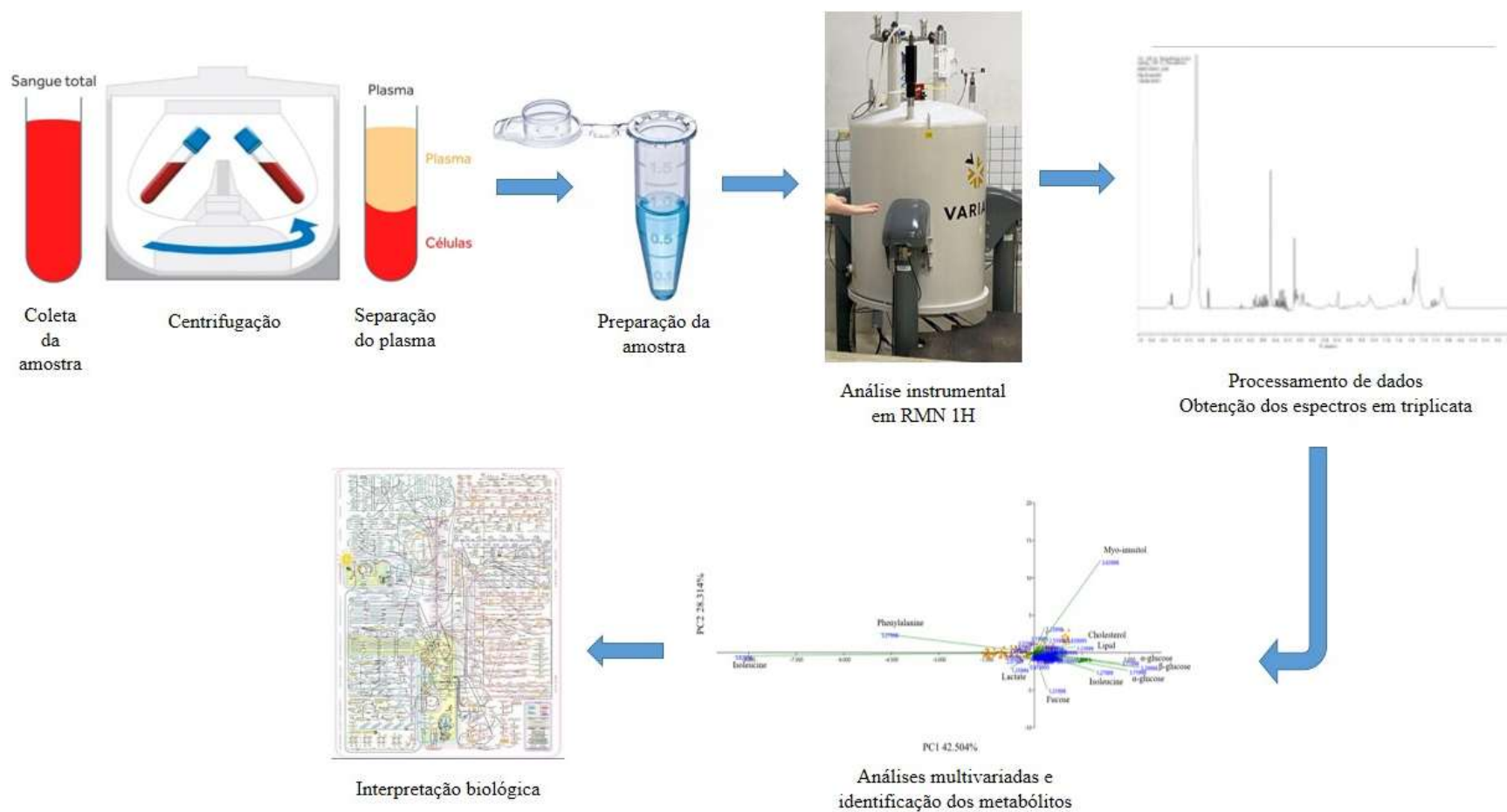
A RMN de prótons (^1H) (^1H RMN), é empregada em maior conjunto de estudos sobre metabolômica, pelo fato dos átomos de ^1H serem encontrados em quase todos os compostos orgânicos e, portanto, em quase todos os metabolitos conhecidos (Emwas *et al.*, 2019). Ela emprega campos magnéticos estáticos e de radiofrequência para criar imagens baseadas nas variações na atenuação de energia de núcleos específicos. Se baseia no comportamento previsível dos núcleos atômicos, como o hidrogênio (^1H), quando expostos a campos magnéticos fortes e na frequência da radiação eletromagnética para identificar estruturas de compostos moleculares. É fundamental na pesquisa metabolômica devido às suas vantagens únicas, como o manuseio direto de amostras, propriedades não destrutivas, uma ampla gama de ferramentas analíticas, imparcialidade e análise rápida. (Dumas, Kinross, Nicholson, 2014; Zhang *et al.*, 2024).

O preparo das amostras para análises por RMN começa por dissolver o fluido em água deuterada, para calibrar os pulsos e evitar interferências nos sinais (Tredwell *et al.*, 2016). Após essa etapa é ajustado o pH para um valor neutro, pois as variações de pH podem interferir nos deslocamentos químicos dos metabolitos, interferindo assim a precisão dos resultados (Saoi, Britz-Mckibbin, 2021). Já nos tecidos biológicos. Inicialmente, é homogeneizado com água deuterada, centrifugada para assim separar os metabolitos solúveis da fração sólida (Saoi, Britz-Mckibbin, 2021; Lutz, Bernard, 2022; Ouyang *et al.*, 2023). A remoção de proteínas e lipídeos, por meio de precipitação, é

imprescindível para evitar interferências na análise (Emwas *et al.*, 2019, Gowda, Ga, Raftery, 2014; Nagana, G.A, Raftery, 2021).

No entanto, a RMN tem limitações, por exemplo, a janela de deslocamento químico relativamente pequena ou a largura espectral associada à espectroscopia de RMN de ^1H significa que há uma maior probabilidade de picos sobrepostos (Emwas *et al.*, 2019). Picos sobrepostos levam a uma maior ambiguidade na identificação e quantificação de compostos. Os picos gerados são constantemente a integração de sinais de vários compostos diferentes. As análises são realizadas por aparelho Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), operando entre 400 a 600 MHz. O tratamento dos espectros obtidos é feito a partir da correção de linha de base, correção de fase e referenciamento. Realizado o alinhamento dos espectros e a normalização é obtido o espectro de binnings (Nicholson, Buckingham, Sadler, 1983; Chen, Gerszten, 2020).

Figura 3- Fluxo de trabalho da metabolômica por RMN.



Autor: autoral

As análises dos metabólitos do corpo humano, pode ser feita em diferentes sítios biológicos, tais como: urina, sangue, humor vítreo, humor aquoso e cada uma delas com sua especificidade na coleta e análises de seus fluidos, estão presentes na tabela abaixo.

Tabela 2- Especificidade na coleta e análises de diferentes sítios biológicos

Sítios biológicos	Coleta	Armazenamento	Análises	Referência
Sangue	Soro ou plasma Coleta de sangue inteiro da veia periférica diretamente em tubos.	Baixa temperatura (-80°C)	LC-MS GC-MS RMN	HERNANDES, BARBAS, DUDIK, 2017.
Humor vítreo	Vitrectomia	Baixa temperatura (-80°C)	LC-MS GC-MS RMN	YOON <i>et al.</i> , 2023; FANG <i>et al.</i> , 2023
Humor aquoso	Paracentese	Baixa temperatura (-80°C)	LC-MS GC-MS RMN	JIN <i>et al.</i> , 2019.
Saliva	Estimulada, coleta por kit comercial	Baixa temperatura (-80°C)	GC-MS RMN	SAKANAKA, <i>et al.</i> , 2021; CIALIÉ SQUARA, <i>et al.</i> , 2023
Urina	Primeira urina do dia em jejum	Baixa temperatura (-20°C)	LC-MS GC-MS RMN	MARTIAS <i>et al.</i> , 2021

Legendas: LC-MS (espectrometria de massa, cromatografia líquida); GC-MS (espectrometria de massa, cromatografia gasosa), RMN (Ressonância magnética nuclear).

Segundo Holmes *et al.* (2008) e Walker *et al.* (2016) o estudo de fenótipos metabólicos em associação com estados de doença pode revelar novos conhecimentos sobre o mecanismo e a fisiopatologia da doença. Nas últimas décadas, a metabolômica tem sido cada vez mais usada para identificar biomarcadores associados as doenças metabólicas (Holmes *et al.*, 2008).

2.4.1 METABOLÔMICA E A RETINOPATIA DIABÉTICA

A metabolômica da RD é um estudo a luz da comparação entre amostras DM2 e RD e entre amostras de diferentes estágios de RD. Os artigos tem explorado tanto amostra de sangue (Rhee *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2020; Peters *et al.*, 2022; Ancel *et al.* 2023; Diniz *et al.* 2024) quanto de líquidos biológicos oculares, como o humor aquoso (Barbas-Bernardos *et al.*, 2016; Wang, *et al.* 2020; Du *et al.* 2022) e o humor vitreo (Haines, *et al.* 2018; Tomita, *et al.* 2021; Du *et al.* 2022; Fang *et al.* 2023). Como esse trabalho analisa amostras de plasma a revisão está concentrada nos artigos que utilizaram essa amostra biológica.

Revisões sistemáticas e meta-análises demonstram concentrações aumentadas em torno de 1,5 a 2 x de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) em pacientes DM2 em comparação com o grupo saudável, devido as seguintes razões metabólicas e fisiológicas:

1. Resistência insulínica, concentrações elevadas de BCAAs no sangue ativam cronicamente a via de sinalização do gene mTOR (mammalian target of rapamycin) e em paralelo inibem a via AMPK (adenosina monofosfato ativada por proteína quinase), promovendo assim resistência em tecidos periféricos como músculo e fígado (Nie *et al.*, 2018, Tanase *et al.*, 2023).
2. Inflamação, os BCAAs também estão relacionados com o aumento da inflamação, sendo os dois relacionados com a RI e progressão do DM. O acúmulo de BCAAs, pode alterar o perfil inflamatório, ativando citocinas como TNF- α e IL-6, subsequente a ativação do gene mTOR que contribuem para RD (Gong *et al.* 2022).
3. Alteração na microbiota intestinal, esses aminoácidos também influenciam o microbioma humano, desempenhando um papel importante na homeostase metabólica. Um desequilíbrio na microbiota intestinal pode aumentar a absorção de BCAAs, favorecendo o aparecimento de DM2 (Nie *et al.*, 2018). Portanto, a ativação de mTOR induzida pela hiperglicemia é mais estimulada por BCAAs em células de Müller e, portanto, aumentou as concentrações de citosinas pró-inflamatórias (Gong *et al.* 2022, Tanase *et al.*, 2023).

Conceitualizando essas células Muller, são responsáveis por manter a nutrição estabilidade no meio extracelular da retina, por também armazenar glicogênio para posterior conversão em lactato, sintetizando o ácido retinóico, regulam também a concentração de íons extracelular para modular a polarização/despolarização da membrana

plasmática, participam com os neurônios no ciclo glutamato-glutamina para controlar a neurotransmissão, e protegem os neurônios do glutamato (Lieth, 2001).

Portanto o aumento da concentração desses aminoácidos é um preditor confiável de resistência insulínica entre os pacientes com DM2. Aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) e maiores proporções de glutamato em relação a glutamina nessa população também foram bem elucidadas na literatura. Outros metabólitos como ácidos orgânicos (ácido acético, éster dimetílico, ácido maleico, alfa-hidroxibutirato), também foram associados ao DM2, por inibirem a fosforilação oxidativa, essencial para a produção de ATP, gerando uma disfunção energética e promovendo a disfunção endotelial e RI. Também relacionaram outros compostos orgânicos, como purinas e metabólitos do ciclo da ureia, incluindo arginina, citrulina e ornitina, ao DM2 (Arneth, Arneth, Shams, 2019; Chen, Gerszten, 2020; White, *et al.*, 2021; Jin, MA, 2021; Morze, *et al.*, 2022).

Pietzner *et al.*(2017) evidenciou que aminoácidos ligados ao ciclo da ureia permaneciam associados a indicadores inflamatórios e estresse oxidativo. O ciclo da ureia que ocorre no fígado, tem a função principal na formação da ureia. A arginina é convertida em ornitina ou citrulina auxiliando a arginase pela produção de ureia ou moléculas de óxido nítrico. Alterações no metabolismo de aminoácidos no ciclo da ureia podem ser correlacionadas com a resistência à insulina. Durante esse ciclo, várias enzimas responsáveis pela remoção de nitrogênio dos aminoácidos são reguladas pelos hormônios glucagon e insulina. Essas enzimas também desempenham um papel na síntese de óxido nítrico (Burrage *et al.*, 2019)

Outro estudo de revisão mostrou além dos aminoácidos (de cadeia ramificada, aromáticos, alanina, glutamato, lisina e metionina), carboidratos e metabólitos relacionados à energia (manose, trealose e piruvato) e acilcarnitinas foram associadas a maior risco de DM2. Já concentrações mais altas de glutamina foi associada a menor risco de DM 2 (Morze, *et al.*, 2022). Sabe-se que a glutamina exerce um papel no aumento da sensibilidade à insulina, aprimorando os estados de hiperglicemia, exercendo um efeito sobre a glicose plasmática quando usada em abordagens de suplementação dietética (HASANI *et al.*, 2021). A glutamina também foi relacionado favoravelmente por prover energia para o ciclo de Krebs através da ativação da via da GDH (glutamato desidrogenase) que promove a produção de alfa-cetoglutarato a partir do glutamato

independentemente da via glicolítica e atuando negativamente na expressão de genes promotores de inflamação (Petrus *et al.*, 2020).

Os estudos da metabolômica da RD estão em avanço. Os descritos na literatura utilizam de humor vítreo, plasma ou soro dos pacientes, sendo o primeiro descrito como mais invasivo. Estudos que usam o humor vítreo relataram marcadores de metabólitos globais (Lehmann *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Paris *et al.*, 2016, Fortenbach *et al.*, 2023).

Com o objetivo de proporcionar um melhor entendimento, sintetizamos os resultados de estudos observacionais e transversais que investigaram a relação entre metabólitos e potenciais biomarcadores para RD, apresentando essas informações em forma de tabela (tabela 3).

Tabela 3- Resumo dos resultados de artigos observacionais e transversais relacionando aos metabólitos com potenciais biomarcadores para RD.

Autor	Local do estudo	População	Amostra	Metabólitos como Potenciais biomarcadores
Chen <i>et al.</i> (2016)	Índia	44 RDNP e 40 RDP	Plasma	1,5-anidroglicitol, 1,5-gluconolactona, ácido 2-desoxirribônico, ácido 3,4-di-hidroxi-butírico, eritritol, ácido glucônico, lactose/celobiose, maltose/trealose, manose, ribose e ureia
Rhee <i>et al.</i> (2018)	Coreia	124 RD e 32 Diabéticos sem RD	Plasma	Glutamina e ácido glutâmico
Sumarriva <i>et al.</i> (2019)	Nashville, Estados Unidos	83 RD e 90 Diabéticos sem RD	Plasma	Arginina, citrulina, γ -semialdeído glutâmico e desidroxicarnitina
Luo <i>et al.</i> (2020)	China	162 RD e 879 Diabéticos sem RD	Plasma	Fenilalanina e a tirosina
Curovic <i>et al.</i> (2020)	Dinamarca	141 RD e 504 Diabéticos sem RD	Plasma	Ácido 2,4-dihidroxi-butírico (DHBA), 3,4-DHBA, ácido ribônico e ribitol
Peters <i>et al.</i> (2022)	Nashville, Estados Unidos	315 DM2, 83 RD, sendo 34 RDP, 49 RDNP e 90 Diabéticos sem RD	Plasma	Arginina e citrulina
Ancel <i>et al.</i> (2023)	Marselha, França	200 DM2, 100 RD (moderado, grave, proliferativa ou com edema macular e 100 com RD leve	Plasma	Triptofano, metilglutarilcarnitina, Glicose-6-Fosfato

		ou Sem RD		
--	--	-----------	--	--

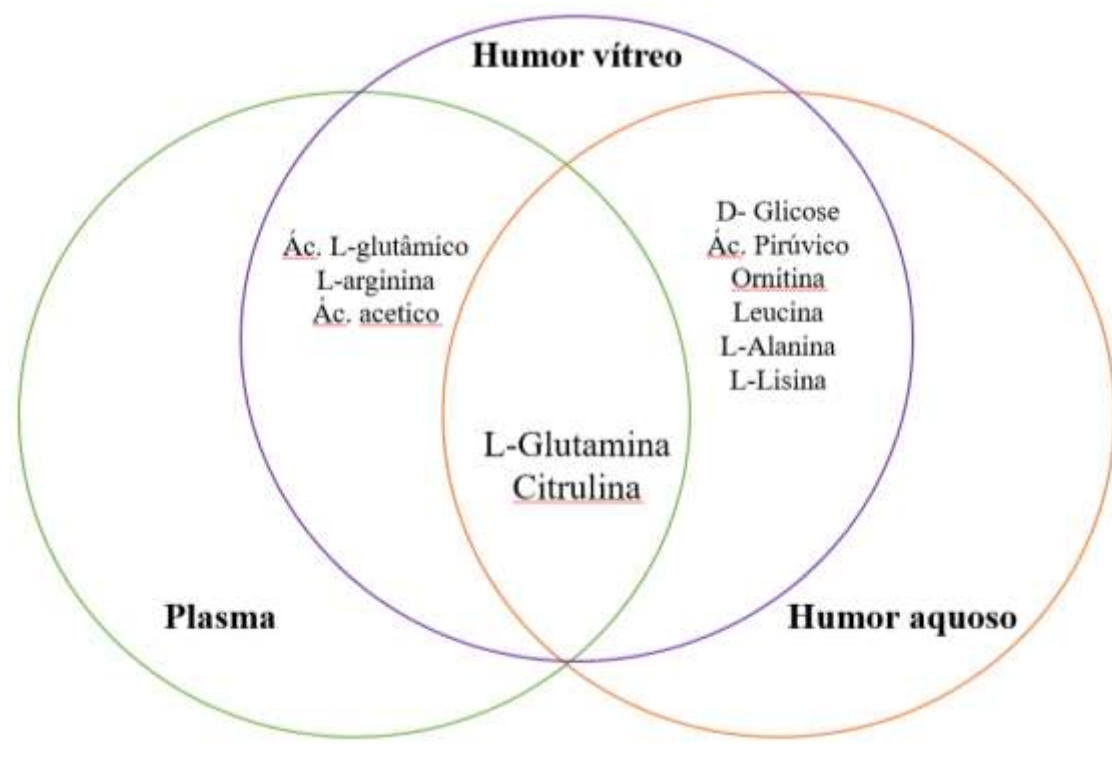
Legenda: DM2 (Diabetes mellitus tipo 2); RD (Retinopatia diabética); RDNP (Retinopatia diabética não proliferativa); RDP (Retinopatia diabética proliferativa).

Em relação às alterações metabólicas sistêmicas, estudos têm demonstrado que pacientes com diabetes e RD apresentam um perfil metabólico alterado, com aumento das concentrações de glicose, lipídios, aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos graxos livres, e consequentemente aumento das concentrações de aminoácidos aromáticos (Bloomgarden, 2018; Sun *et al.*, 2021; Holecek, 2023). Essas alterações metabólicas estão associadas ao processo inflamatório e oxidativo que ocorre na RD (Wang *et al.*, 2020).

O ácido ribônico encontrado como metabólito discriminante para RD no estudo de Curovic *et al.* (2020) é derivado da ribose, que é ativo na via da pentose fosfato e na produção de ácidos nucleicos e nucleotídeos. Além disso, foi identificada como uma via crucial independente de insulina relevante no início da RD, e foi sugerida como um possível alvo terapêutico no tratamento da RD.

Já em estudos de revisão, fortalecem os resultados dos artigos descritos na tabela 2. Um artigo de revisão resumiu sistematicamente metabólitos que podem ser potenciais biomarcadores. Os autores encontraram que os metabólitos L -glutamina, L -ácido láctico, ácido pirúvico, ácido acético, L -ácido glutâmico, D -glicose, L -alanina, L -treonina, citrulina, L -lisina e ácido succínico foram considerados potenciais biomarcadores de RD, por serem repetidamente identificados nos estudos. Observou-se que a L -glutamina e a citrulina se mostraram discriminantes em todas as amostras biológicas (Hou, Wang, Pan, 2021). Os autores trouxeram um esquema de fácil entendimento (figura 4).

Figura 4- Metabólitos alterados em diferentes amostras biológicas.



Fonte: Adaptada de Hou, Wang, Pan, 2021.

Para um melhor entendimento sobre o assunto, partes do olho são utilizadas para estudo como humor vítreo e humor aquoso, onde os dois são fluídos que preenchem partes diferentes do olho, desempenhando assim funções diferentes. O humor vítreo é localizado na parte posterior do olho, ajudando a retina se manter no local. Já o humor aquoso é encontrado na região anterior do olho, é um fluído mais líquido e continuamente drenado para manter a pressão intraocular. Composto principalmente de glicose e aminoácidos nutrindo assim as estruturas oculares. Sendo assim utilizados como fluidos intraoculares, para entender melhor as alterações metabólicas na retina (Jin *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2023; Fang *et al.*, 2023).

Outro estudo de revisão, um ano mais recente, que também juntou estudos com todos os tipos de amostra: humor vitreo/aquoso, plasma, soro, urina, fezes e retina, analisou metabólitos globais da RD e percebeu que os metabólitos alanina, lactato e glutamina estavam presentes em todos os estudos, podendo ser característicos da RD. A alanina pode participar da regulação do metabolismo da glicose suprimindo a secreção de insulina por

meio da estimulação dos receptores N-metil-D-aspartato que leva um influxo de cálcio alterando assim as vias intracelulares e inibindo a liberação da insulina (Brennan, *et al.*, 2002). Quantidades de lactato tanto elevados quanto abaixo do recomendado podem causar estresse oxidativo e neuroinflamação, levando as vezes à hipóxia retiniana, já podendo deteriorar a estrutura e a função da barreira celular endotelial da retina (Daulatzai, 2017; Hou, Wang, Pan, 2021). A glutamina baixa, por sua vez, indica um distúrbio na reciclagem do glutamato, que pode afetar a ativação das células de Müller (Du *et al.*, 2022).

Atualmente, um estudo de revisão mostrou que em amostras plasmáticas em diferentes populações, metabólitos como arginina e citrulina, estavam aumentados, já o triptofano se mostra diminuído em pacientes com RD. A carnitina serviu como metabólito capaz de distinguir RDNP e RDP. Em amostras de soro o triptofano também foi descrito como potencial biomarcador de piora no RD. Metabólitos biossintéticos da arginina, do ácido linoleico e ácido 3,4 di-hidroxibutírico foram identificados como um marcador para progressão da RD, sendo o último um marcador independente. Mostrou também que o metabólito L-metilhistidina contribui para a disfunção endotelial diabética, podendo causar ND e RD. Em amostras de humor vítreo, ácido láctico, ácido pirúvico, prolactina e citrulina foram metabólitos que diferenciaram os grupos DM e RDP. Já em amostras de humor aquoso cisteína e citrulina foram os metabólitos que mais eram relatados que tem o potencial de serem biomarcadores para a progressão da RD (He *et al.*, 2023).

Na tabela 4 demonstramos o resumo dos resultados provenientes dos artigo de revisão sistemática e meta-análises relacionando aos metabólitos com potenciais biomarcadores para RD.

Tabela 4- Resumo dos resultados de artigos de revisão e meta-análises relacionando aos metabólitos com potenciais biomarcadores para RD.

Amostra	Metabólitos como Potenciais biomarcadores	Autor
Todas as amostras biológicas	L -glutamina e a citrulina	Hou, Wang, Pan, (2021)
Todas as amostras biológicas	Alanina, lactato e glutamina	Du <i>et al.</i> (2022)
Soro, plasma e humor vítreo	12-HETE e 2-piperidona estavam discriminando os grupos nas amostras de soro, citidina e 3,4-DHBA estavam mais presentes nas amostras de plasma dos pacientes com RD e o piruvato que foi o metabólito relatado mais significativo em amostras de humor vítreo.	Jian, Wu, Zhang, (2022)
Soro, humor vítreo e humor aquoso.	Em amostras de soro metabolitos como a aginina, citrulina, triptofano, carnitina, ácido linoleico e ácido 3,4-DHBA foram mais relatados; em amostras de humor vítreo, foram relatados o ácido láctico, ácido pirúvico, prolactina e citrulina. Já em amostras de humor aquoso cisteína e citrulina foram os metabólitos que mais eram relatados que tem o potencial de ser biomarcadores para a progressão da RD	He <i>et al.</i> (2023)

Legenda: HETE (hidroxieicosatetraenóico); DHBA (ácido di-hidroxibutírico).

Além disso, a metabolômica tem sido utilizada para identificar biomarcadores precoces da RD. Estudos têm demonstrado que alterações metabólicas locais, como a diminuição das concentrações de glutamato e taurina na retina afetam a neurotransmissão visual, prejudicando assim a troca de informações das células da retina, associando então à perda progressiva da visão observada na RD (Yu *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2010; Hou, 2021).

2.4.2 RELAÇÃO ENTRE METABOLÔMICA, DIABETES E AMPUTAÇÃO

A relação entre os temas diabetes, metabolômica e amputação na literatura é escassa. Já se sabe que a amputação é um dos desfechos negativos do diabetes, pelo fator da hiperglicemia e por consequência na dificuldade de cicatrização, podendo ocorrer formação de úlceras e desencadear a amputação de membros. Os membros que possuem um risco aumentado para amputação são os inferiores, por consequência de neuropatias periféricas (sendo esse o principal fator para esse desfecho) e a falta de sensibilidade nesses órgãos (Sloan, Selvarajah, Tesfaye, 2021, Chaudhary *et al.*, 2021, Yao *et al.*, 2023).

Álvarez-Rodríguez *et al.* (2020) em seu estudo observacional, transversal e comparativo em população mexicana relacionou a metabolômica das úlceras do pé diabético, encontrando as fosfatidiletanolaminas e fosfatidilcolinas como os principais metabólitos nesse quadro. Porém, concluiu que, curiosamente, perfis metabolômicos eram semelhantes em diferentes estágios das úlceras do pé diabético, sugerindo que a progressão depende principalmente de fatores extrínsecos e não de alterações metabólicas globais.

Um estudo feito em Taiwan, contendo 57 indivíduos diabéticos em tratamento hospitalar para úlceras nos pés, teve como objetivo avaliar aminoácidos presentes na cicatrização das feridas. Dois desses pacientes tiveram amputações em seu membro inferior. O estudo concluiu que houve uma associação entre aminoácidos como arginina, isoleucina, leucina e treonina com cicatrização das úlceras (Hung *et al.*, 2019).

Com isso, percebemos a importância de um estudo de cunho observacional na população brasileira, para preencher a lacuna de informações sobre os metabólitos impactantes para discriminar amputação em pacientes diabéticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O protocolo da pesquisa transversal ao qual está vinculado a um estudo maior intitulado: “Caracterização nutricional metabólica genética e de conhecimento de portadores de retinopatia diabética”, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para

Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (parecer: 3.053.068, data 03/12/2018 – Anexo A) e todos os procedimentos seguiram os padrões éticos da instituição e foram em cumprimento com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.2 POPULAÇÃO

O total de 360 pacientes provenientes do ambulatório de Endocrinologia e da Unidade de Visão do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil foram recrutados entre dezembro de 2018 e agosto de 2022. Foram incluídos pacientes adultos e idosos, com mais de 5 anos de diagnóstico de DM2, de ambos os sexos, e foram excluídos aqueles que tiveram amostras de DNA insuficientes. Uma sub amostra de 127 indivíduos foi utilizada para a metabolômica. Destes, 6 indivíduos controles saudáveis (CONT), 35 não apresentaram sinais de RD no exame de fundo de olho e foram considerados controles neste estudo (DM2). No grupo de casos 35 indivíduos apresentavam retinopatia não proliferativa (RDNP), 35 apresentavam retinopatia proliferativa (RDP) e 16 indivíduos diabéticos com amputação (AMP).

Todos os participantes envolvidos no estudo foram previamente esclarecidos quanto aos propósitos e procedimentos e foram solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A), atendendo a resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.3 MEDIDAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS

O peso corporal foi medido com aproximação de 0,1 kg em balança eletrônica (Filizola®) e a estatura com aproximação de 0,5 cm em estadiômetro (Filizola®). O índice de massa corporal (IMC) (kg/m^2) foi calculado como o peso dividido pelo quadrado da altura (Tabela 5) (WHO, 1995). A circunferência da cintura (CC) (cm) foi medida no nível do ponto médio entre a margem inferior da última costela e a crista ilíaca medida horizontalmente com fita de tensão constante (Sanny) com o paciente em pé. A

circunferência do quadril (CQ) foi medida no nível da maior circunferência sobre os grandes trocanteres. A relação cintura-quadril (RCQ) foi obtida pela relação da medida da CC para a CQ. Com corte para risco cardiovascular igual ou maior que 0,85cm para mulheres e 0,90cm para homens (Pereira, 1999).

Tabela 5– Interpretação e diagnóstico nutricional para adultos e idosos

Adultos- 20 a 59 anos	
-Peso atual; -Altura Atual	
VALORES CRÍTICOS	DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL
<18,5 kg/m ²	Desnutrição
>18,5 e < 25 kg/m ²	IMC adequado ou eutrófico
≥25 e <30 kg/m ²	Sobrepeso
≥30 kg/m ²	Obesidade
Idoso- a partir de 60 anos	
<22 kg/m ²	Baixo peso
>22 e < 27 kg/m ²	IMC adequado ou eutrófico
≥27 e <30 kg/m ²	Sobrepeso
≥30 kg/m ²	Obesidade

Fonte: WHO, 1995.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO BIOQUÍMICA

As coletas das amostras biológicas ocorreram em laboratório terceirizado, em dias anteriormente combinados com o indivíduo. Todas as amostras foram relacionadas a códigos a fim de resguardar 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. Para análises posteriores as alíquotas de soro e plasma foram armazenadas sob -80°C no Hemocentro da Paraíba.

Uma quantidade de 6 µL do sangue total foi utilizada para determinação da HbA1c. Sendo 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).

Alíquota do soro foram utilizadas para determinar a glicose plasmática (método enzimático-colorimétrico) creatinina sérica (método cinético-colorimétrico), HDL-c (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: $[\text{LDL-colesterol}] = [\text{colesterol total}] - [\text{HDL}] - [\text{triglicerídios}/5]$.

3.5 ISOLAMENTO DO DNA DE LEUCÓCITOS

As amostras de sangue total foram processadas utilizando kit de isolamento de DNA comercial Tissue Handbook – QIAGEN. As amostras de DNA purificado foram armazenadas a -20°C para posterior análises moleculares.

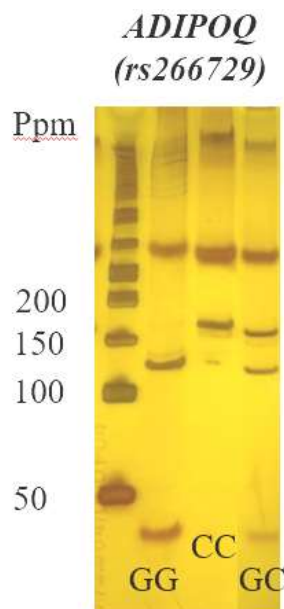
3.6 POLIMORFISMO DO GENE DA ADIPONECTINA

A presença de polimorfismos foi determinada usando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) por amplificação de um fragmento do gene da ADP por PCR usando iniciadores e ciclos de temperatura descritos por metodologias consolidadas. Para a análise do *ADIPOQ* (rs266729) foram utilizados os iniciadores: 5'- CATCAGAATGTGTGGCTTGC -3' (sense) e 5'- AGAAGCAGCCTGGAGAACTG-3' (antisense) (Prior, *et al.*, 2009) e à amplificação ocorreu a 65°C para o anelamento.

O produto de 163 pb foi digerido com a enzima de restrição *HhaI*. O tratamento com essa enzima gera 2 fragmentos para o alelo polimórfico G (121 pb e 42 pb) ou 3 fragmentos para o alelo ancestral C (163 pb, 121 pb e 42 pb). Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coloração com

nitrito de prata 0,5%, presente na figura 5. Por conveniência, para análises de polimorfismo foi utilizado a população geral.

Figura 5– Eletroforeses demonstrativas dos perfis adotados para obtenção dos genótipos de *ADIPOQ* (rs266729).



Legenda –ppm: padrão de peso molécula; *ADIPOQ*: gel de poliacrilamida a 15%, corrida a 100 volts por 2h, (foram aplicados 5 uL de amostra digerida) corado com nitrito de prata. **Fonte:** Autoral.

Quadro 3– Sequência de iniciadores *sense* e *antisense* e amplificação por PCR para os polimorfismos *ADIPOQ* (rs266729).

Gene (Polimorfismo)	Sequência de primers	Anelamento (°C)	Enzima de restrição	Produto (pb)	Referência
<i>ADIPOQ</i> (rs266729)	F: 5' - CATCAGAATGTGTGGCTTGC -3' R: 5 - AGAAGCAGCCTGGAGAACTG -3'	65°C	HhaI	CC: 163 CG: 163, 121, 42 GG:121,42	PRIOR <i>et al.</i> , 2009

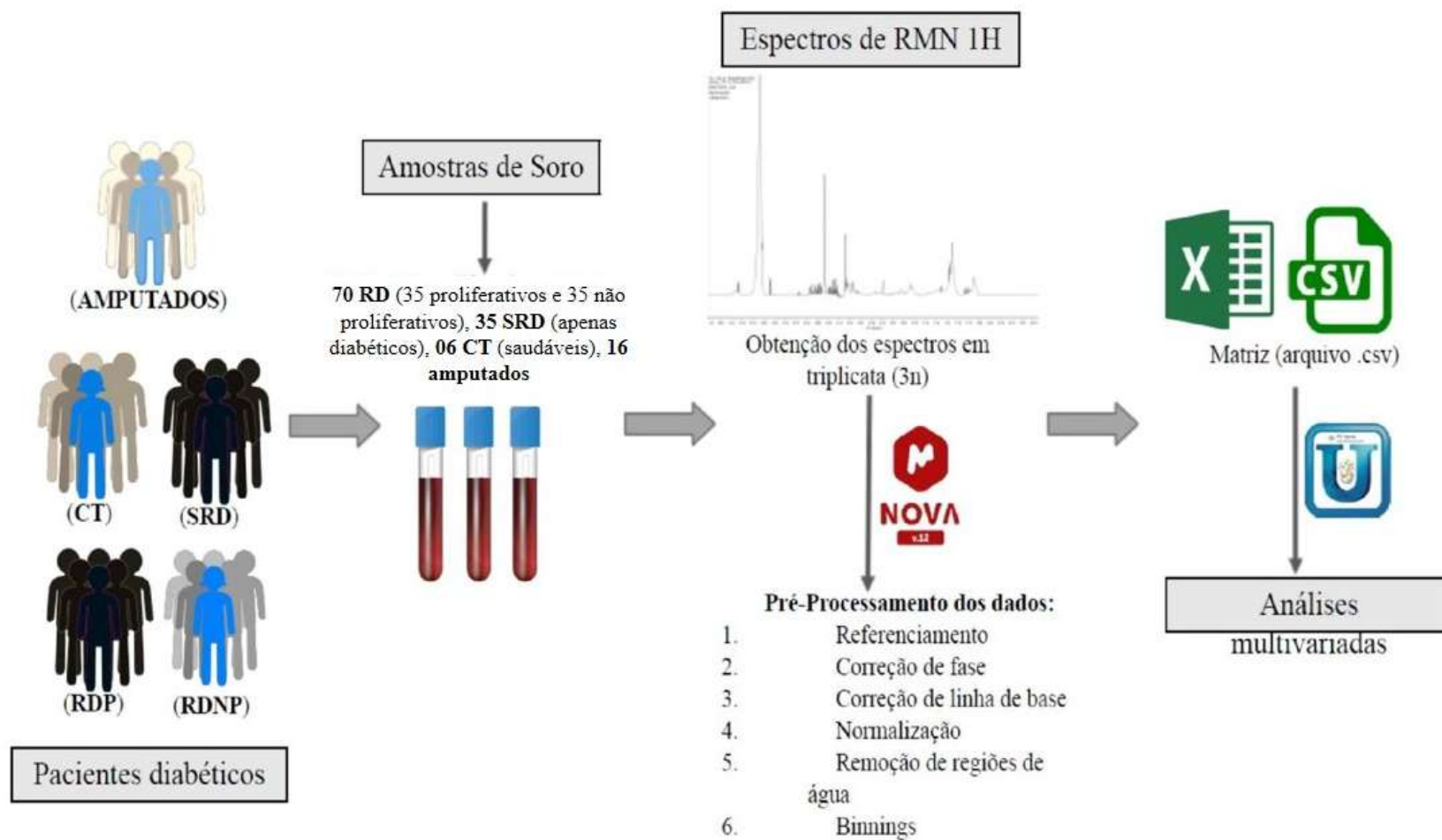
ADIPOQ: gene no promotor de ADP; F: iniciador 5' forward; R: iniciador 3'reverse; Pb: pares de base.

3.7 ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO

As análises do perfil metabôlômico foram realizadas por aparelho Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), modelo Bruker Ascend operando a 400 MHz, localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A análise do plasma dos pacientes foi realizada

com 5 ml de sangue venoso coletado em tubos de polipropileno com EDTA, em jejum. Após a coleta, o mesmo foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 4 °C para isolar o plasma. O plasma foi transferido para um tubo esterilizado e armazenado a -80 °C, o qual foi descongelado para utilização, sendo retirado 200 uL de plasma e adicionado 300 uL de tampão fosfato (0.2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) e realizada a homogeneização em vortex por 30 segundos, logo após centrifugadas a 14000 x g, durante 10 minutos em 4 °C. Após a centrifugação, são adicionados 50 uL de água deuterada (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt 0,05% w/w). Em seguida, foram realizadas as análises no aparelho de RMN e o sobrenadante transferido para o tubo de RMN 400 MHz em tubo de 5 mm. A sequência de pulso utilizada para obtenção dos espectros de ^1H foi cpmgpr1d, número de scans: 128, ganho do receptor: 58.8, tempo de aquisição: 4,08s, spectral size:64k e temperatura: 30°C e foram feitas em triplicatas. O tratamento dos espectros obtidos foi realizado a partir da correção de linha de base, correção de fase, referenciamento a partir do TSP (0 ppm), foi utilizado o recurso peak picking para assinalamento dos deslocamentos químicos presente nos espectros, line boarding: 0,3, realizado o alinhamento dos espectros, a normalização pela área total e utilizado o intervalo de 0,03 ppm para obtenção do espectro de binnings. O espectro de binning foi utilizado em análises multivariadas com posterior identificação dos binning mais importantes utilizando o banco de dados de ressonância magnética biológica. As análises estão esquematizadas na figura 6.

Figura 6– Metodologia das análises do perfil metabolômico dos pacientes com e sem Retinopatia diabética.



3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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). As variáveis categóricas expressas em números (n) e porcentagem. As diferenças entre variáveis independentes normalmente distribuídas e contínuas foram avaliadas pelo teste t Student bidirecional (two-tailed) para amostras independentes; aquelas sem uma distribuição normal foram comparadas utilizando teste U de Mann-Whitney. O qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher foram utilizados para variáveis categóricas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises. O software utilizado foi o SPSS na versão 26.0.

Os binnings foram pré-tratados com o método de auto escalonamento e avaliados mediante a análise de componentes principais (PCA) multivariada não supervisionada para identificar tendências nos grupos e outliers dentro do conjunto de dados. Em seguida, os binnings foram submetidos a análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) multivariada supervisionada para otimizar a separação entre os grupos e obter os valores de Importância da Variável na Projeção (VIP) para identificar potenciais biomarcadores discriminatórios entre os grupos. O modelo foi validado estatisticamente pelo teste de validação cruzada de 10 vezes, onde o valor do parâmetro R^2 para a qualidade do ajuste estava entre 0,0660 a 0,648 e o valor do parâmetro Q^2 para a qualidade da previsão estava entre 0,030 a 0,609; e, pelo teste de permutação de 100 repetições que teve um $p < 0,001$ (Figure S1). Os binnings com valores VIP maior que um ($VIP > 1$) foram identificados e submetidos a análise de vias metabólicas no software MetaboAnalyst v.5.0 (Xia Lab, McGill University, Montreal, Canada) usando a base de dados Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG). O impacto na via maior que 0,2 ($> 0,2$) e a significância estatística de 5% ($p < 0,05$) foram usados para escolher as vias metabólicas mais afetadas entre os grupos do estudo.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese foram publicados sob a forma de dois artigos originais em revistas de alto impacto, incluídos nos Apêndices C e D. O artigo apresentado no apêndice C está intitulado como análise metabolômica dos estágios da retinopatia e amputação no diabetes tipo 2. Aborda sobre os aspectos metabolômicos de pacientes diabéticos com e sem RD e amputação.

Apresentou como principais resultados os metabólitos valina e isobutirato sendo discriminantes para o grupo RDNP, juntamente com a via da arginina e prolina. Um dado inédito de nosso trabalho demonstrou que o metabolismo de síntese e degradação de corpos cetônicos associado ao metabólito acetoacetato e a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram discriminantes para o grupo RDP. É importante ressaltar que relatamos pela primeira vez que o metabolismo da histidina, estava presente e discriminante no grupo de AMP.

Já o segundo artigo apresentado no apêndice D intitulado como análise de metabólitos associados com genótipos *ADIPOQ* em indivíduos com *Diabetes Mellitus* Tipo 2, avaliou aspectos metabolômicos de pacientes diabéticos tipo 2 em relação ao polimorfismo do gene *ADIPOQ*.

Nossos principais resultados mostraram a relação do uso da insulina com o alelo G do polimorfismo do gene *ADIPOQ*. E em relação a metabolômica a relação glutamina/glutamato provavelmente está relacionada à influência do rs266729 no risco de diabetes. No entanto, estudos adicionais que possam quantificar esses metabólitos nos grupos rs266729 são necessários para dar suporte a essa descoberta.

Como perspectiva futura, destaca-se o potencial da metabolômica como uma ciência promissora para a prevenção das complicações do diabetes mellitus (DM), bem como para o desenvolvimento de estratégias nutricionais e de suplementação.

Entre as possíveis aplicações para a área da nutrição, destacam-se: a suplementação com glutamina em casos de DM com descontrole glicêmico; o uso de histidina para indivíduos diabéticos com feridas em membros distais; e a orientação baseada nos resultados dessa referida tese que aponta não ser segura a suplementação com BCAAs para pacientes com diabetes.

REFERÊNCIAS

- ABHARY, S. *et al.* Aldose reductase gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility. **Diabetes Care**, v. 33, n. 8, p. 1834-6, 2010.
- ANCEL, Patricia *et al.* Untargeted multiomics approach coupling lipidomics and metabolomics profiling reveals new insights in diabetic retinopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12053, 2023.
- 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.
- ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, Ignacio I. *et al.* Non-targeted metabolomic analysis reveals serum phospholipid alterations in patients with early stages of diabetic foot ulcer. **Biomarker Insights**, v. 15, p. 1177271920954828, 2020.
- ANTONETTI, D.A.; KLEIN, R.; GARDNER, T. W. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* v. 29, s. 366, n. 13, p. 1227-39, 2012.
- ARNETH, Borros; ARNETH, Rebekka; SHAMS, Mohamed. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2467, 2019.
- ASHRAFIAN, Hutan *et al.* Metabolomics: the stethoscope for the twenty-first century. **Medical Principles and Practice**, v. 30, n. 4, p. 301-310, 2021.
- ASHCROFT, F. M; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-71, 2012.
- BAI, Yu; TANG, Lei; LI, Ling. The roles of ADIPOQ rs266729 and MTNR1B rs10830963 polymorphisms in patients with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. **Gene**, v. 730, p. 144302, 2020.
- BARBAS-BERNARDOS, Cecilia *et al.* Looking into aqueous humor through metabolomics spectacles—exploring its metabolic characteristics in relation to myopia. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 127, p. 18-25, 2016.
- BARNES, J. Aaron *et al.* Epidemiology and risk of amputation in patients with diabetes mellitus and peripheral artery disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 40, n. 8, p. 1808-1817, 2020.
- BERG, Anders H. *et al.* The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature medicine**, v. 7, n. 8, p. 947-953, 2001.

BLOOMGARDEN, Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? **J Diabetes**. v. 10, n. 5, 2018.

BRENNAN, Lorraine *et al.* A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative l-alanine metabolism and l-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic β -cell line: metabolism of l-alanine is important to the regulation of insulin secretion. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1714-1721, 2002.

BURRAGE, Lindsay C. *et al.* Untargeted metabolomic profiling reveals multiple pathway perturbations and new clinical biomarkers in urea cycle disorders. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1977-1986, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 10, de 27 de abril de 2021. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Retinopatia Diabética**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/arquivos/2021/portal-portaria-conjunta_pcdt_retinopatia-diabetica_.pdf. Acesso em: 16 dez. 2024.

BROWNLEE, Michael. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

CHAMNAN, P. *et al.* Cardiovascular risk assessment scores for people with diabetes: a systematic review. **Diabetologia**, v. 52, n. 10, p. 2001-2014, jul, 2009.

CHARONIS, Aristidis S. *et al.* Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. **Diabetes**, v. 39, n. 7, p. 807-814, 1990.

CHAUDHARY, Natasha *et al.* Lower Limb Amputation Rates in Patients With Diabetes and an Infected Foot Ulcer: A Prospective Observational Study. **Wound Management & Prevention**, v. 67, n. 7, p. 22-30, 2021.

CHEN, L. *et al.* Plasma Metabonomic Profiling of Diabetic Retinopathy. **Diabetes**. v. 65, n. 4, p. 1099-1108, 2016.

CHEN, Zsu-Zsu; GERSZTEN, Robert E. Metabolomics and proteomics in type 2 diabetes. **Circulation research**, v. 126, n. 11, p. 1613-1627, 2020.

CIALIÈ ROSSO, Marta *et al.* Exploring extra dimensions to capture saliva metabolite fingerprints from metabolically healthy and unhealthy obese patients by comprehensive two-dimensional gas chromatography featuring Tandem Ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, p. 403-418, 2021.

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

COBOS-PALACIOS, Lidia *et al.* Obesidade metabolicamente saudável: biomarcadores inflamatórios e adipocinas na população idosa. **PLoS One** , v. 17, n. 6, p. e0265362, 2022.

CUROVIC, Viktor Rotbain *et al.* Circulating metabolites and lipids are associated to diabetic retinopathy in individuals with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 69, n. 10, p. 2217-2226, 2020.

DAULATZAI, Mak Adam. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 4, p. 943-972, 2017.

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

DINIZ, Tainá Gomes *et al.* Analysis of metabolites associated with ADIPOQ genotypes in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 28093, 2024.

DRINKWATER, J. J. *et al.* The association between carotid disease, arterial stiffness and diabetic retinopathy in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study Phase II. **Diabetic Medicine**, v. 38, n. 4, p. e14407, 2021.

DU, Xiaohui *et al.* Metabolomics of various samples advancing biomarker discovery and pathogenesis elucidation for diabetic retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1037164, 2022.

DUMAS, Marc–Emmanuel; KINROSS, James; NICHOLSON, Jeremy K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 46-62, 2014.

EL-BAB, M. F. *et al.* Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. **Int. J. Gen. Med.** v. 6, p. 799-806, 2013.

ELLIS, David I. *et al.* Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 9, p. 1243-1266, 2007.

EMANUELE, N. *et al.* Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. **Diabetes Care**. v. 28, n. 8, p. 1954-8, 2005.

EMWAS, Abdul-Hamid *et al.* NMR spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 123, 2019.

ENGERMAN, R. L.; KERN, T. S.; LARSON, M. E. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. **Diabetologia**, v. 37, p. 141-144, 1994.

FANG, Junwei *et al.* Integration of vitreous lipidomics and metabolomics for comprehensive understanding of the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. **Journal of Proteome Research**, v. 22, n. 7, p. 2293-2306, 2023.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES. **IDF Atlas 10th edition**. 2021. Disponível em: [https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/?dlmodal=active&dlsrc=https%3A%2F%2Fdiabetesatlas.org%2Fidfawp%2Fresource-files%2F2021%2F07%2FIDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf] Acesso em: 04 de março de 2024.

FERNANDES SILVA, Lilian *et al.* Metabolites as risk factors for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes: a 12-year follow-up study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 109, n. 1, p. 100-106, 2024.

FILLA, L. A.; EDWARDS, J. L. Metabolomics in diabetic complications. **Mol Biosyst.** v. 12, n. 4, p. 1090–1105, 2016.

FORTENBACH, C. R. Metabolic and proteomic indications of diabetes progression in human aqueous humor. **PLoS One**. v. 18, n. 18, 2023.

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.

GAO, Shen *et al.* The effect of circulating adiponectin levels on incident gestational diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **Annals of Medicine**, v. 55, n. 1, p. 2224046, 2023.

GBD. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**. v. 386, p. 2287–323, 2015.

GHAFARI, Nathan; SLENO, Lekha. Challenges and recent advances in quantitative mass spectrometry-based metabolomics. **Analytical Science Advances**, v. 5, n. 5-6, p. e2400007, 2024.

GOODACRE, Royston *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 245-252, 2004.

GONG, Qiaoyun *et al.* SGLT2 inhibitor-empagliflozin treatment ameliorates diabetic retinopathy manifestations and exerts protective effects associated with augmenting branched chain amino acids catabolism and transportation in db/db mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 152, p. 113222, 2022.

GOWDA, GA Nagana; RAFTERY, Daniel. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 11, p. 5433-5440, 2014.

GREGORY, Gabriel A. et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 10, n. 10, p. 741-760, 2022.

HAINES, Nathan R. *et al.* Metabolomics analysis of human vitreous in diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 7, p. 2421-2427, 2018.

HALBERG, Nils *et al.* Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. **Diabetes**, v. 58, n. 9, p. 1961-1970, 2009.

HAN, Jonathan *et al.* Genetics of diabetic retinopathy. **Current diabetes reports**, v. 19, p. 1-8, 2019.

HASANI, Motahareh *et al.* Effect of glutamine supplementation on cardiometabolic risk factors and inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis. **BMC cardiovascular disorders**, v. 21, p. 1-21, 2021.

HE, Shuling *et al.* Recent Advances and Perspectives in Relation to the Metabolomics-Based Study of Diabetic Retinopathy. **Metabolites**, v. 13, n. 9, p. 1007, 2023.

HENRIQUES, J.; *et al.* Diabetic eye disease. **Acta Med Port.** V. 28, p. 107-113, 2015.

HERNANDES, Vinicius Veri; BARBAS, Coral; DUDZIK, Danuta. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. **Electrophoresis**, v. 38, n. 18, p. 2232-2241, 2017.

HOLLAND, William L. *et. al.* Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 55-63, 2011.

HOLECEK, M. Role of Impaired Glycolysis in Perturbations of Amino Acid Metabolism in Diabetes Mellitus. **Int. J. Mol. Sci.** v. 24, n. 2, 2023.

HOLMES, Elaine *et al.* The promise of metabolic phenotyping in gastroenterology and hepatology. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 8, p. 458-471, 2015.

HOSSEINI, Hossein *et al.* Resveratrol alleviates non-alcoholic fatty liver disease through epigenetic modification of the Nrf2 signaling pathway. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 119, p. 105667, 2020.

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.

HOU, Xiao-Wen; WANG, Ying; PAN, Chen-Wei. Metabolomics in diabetic retinopathy: a systematic review. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 62, n. 10, p. 4-4, 2021.

HOVNIK, T., *et al.* Genetic Polymorphisms in Genes Encoding Antioxidant Enzymes Are Associated With Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, n. 12, p. 2258-2262, dez. 2009.

HOWLADER, Mithu *et al.* Adiponectin gene polymorphisms associated with diabetes mellitus: A descriptive review. **Heliyon**, v. 7, n. 8, 2021.

HU, F. B. Globalization of diabetes. **Diabetes Care**. v, 34, n. 6, p. 1249-1257, jun. 2011.

HU, Erding; LIANG, Peng; SPIEGELMAN, Bruce M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity (*). **Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697-10703, 1996.

HUNG, Shih-Yuan *et al.* Amino acids and wound healing in people with limb-threatening diabetic foot ulcers. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 33, n. 10, p. 107403, 2019.

JIAN, Qizhi; WU, Yingjie; ZHANG, Fang. Metabolomics in diabetic retinopathy: from potential biomarkers to molecular basis of oxidative stress. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3005, 2022.

JIN, Huiyi *et al.* Metabolic characterization of diabetic retinopathy: An ¹H-NMR-based metabolomic approach using human aqueous humor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 414-421, 2019.

JIN, Qiao; MA, Ronald Ching Wan. Metabolomics in diabetes and diabetic complications: insights from epidemiological studies. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 2832, 2021.

KADOWAKI, Takashi *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.

KAPOORE, Rahul Vijay; VAIDYANATHAN, Seetharaman. Towards quantitative mass spectrometry-based metabolomics in microbial and mammalian systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2079, p. 20150363, 2016.

KHALAFI, Mousa *et al.* The impact of exercise and dietary interventions on circulating leptin and adiponectin in individuals who are overweight and those with obesity: A systematic review and meta-analysis. **Advances in Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 128, 2023.

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

KOYA, Daisuke; KING, George L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, v. 47, n. 6, p. 859-866, 1998.

- 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. 2288-94, set. 2011.
- KHORAMIPOUR, Kayvan *et al.* Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1180, 2021.
- KIM, J; *et al.* Prevalence and Associated Factors of Diabetic Retinopathy in Rural Korea: The Chungju Metabolic Disease Cohort Study. *Journal of Korean Medical Science*. v. 26, n. 8, p. 1068-1073, jul, 2011.
- KOLM-LITTY, Verena *et al.* High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 1, p. 160-169, 1998.
- LAWLOR, Nathan; STITZEL, Michael L. (Epi) genomic heterogeneity of pancreatic islet function and failure in type 2 diabetes. **Molecular metabolism**, v. 27, p. S15-S24, 2019.
- LEE, Yong-ho *et al.* Effects of leptin and adiponectin on pancreatic β -cell function. **Metabolism**, v. 60, n. 12, p. 1664-1672, 2011.
- LEI, X. W., *et al.* The Protective Roles of Folic Acid in Preventing Diabetic Retinopathy Are Potentially Associated with Suppressions on Angiogenesis, Inflammation, and Oxidative Stress. **Ophthalmic Res**. v. 62, n. 2, p. 80-92, 2019.
- LEHMANN, M., *et al.* Metabolomic analysis of serum from diabetic patients with and without retinopathy (Abstract). **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**. v. 52, p. 3563, 2011.
- LI, Yong Ming *et al.* Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 20, p. 11047-11052, 1996.
- LI, Shanshan *et al.* Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 302, n. 2, p. 179-188, 2009.
- LI, X., *et al.* Metabolomics study of diabetic retinopathy using gas chromatography-mass spectrometry: a comparison of stages and subtypes diagnosed by Western and Chinese medicine. **Mol Biosyst**. v. 7, p. 2228–2237, 2011.
- 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.
- LIETH, Erich *et al.* Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1712-1723, 2001.
- LIM, Soo; QUON, Michael J.; KOH, Kwang Kon. Modulation of adiponectin as a potential therapeutic strategy. **Atherosclerosis**, v. 233, n. 2, p. 721-728, 2014.

LIN, K. Y. *et al.* Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. **J Diabetes Investig.** v. 12, n. 8, p. 1322-1325, 2021.

LITWAK, L; *et al.* Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A1chieve study. **Diabetology and Metabolism Syndrom.** v. 5, n. 1, p. 57, 2013.

LUO, Hui-Huan *et al.* Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 8, n. 1, p. e000877, 2020.

LU, J., *et al.* High-Coverage Targeted Lipidomics Reveals Novel Serum Lipid Predictors and Lipid Pathway Dysregulation Antecedent to Type 2 Diabetes Onset in Normoglycemic Chinese Adults. **Diabetes Care.** v. 42, p. 2117, 2019.

LUO, Hui-Huan *et al.* Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 8, n. 1, p. e000877, 2020.

LUTZ, Norbert W.; BERNARD, Monique. Methodological developments for metabolic NMR spectroscopy from cultured cells to tissue extracts: Achievements, progress and pitfalls. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4214, 2022.

MARTIAS, Cécile *et al.* Optimization of sample preparation for metabolomics exploration of urine, feces, blood and saliva in humans using combined NMR and UHPLC-HRMS platforms. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4111, 2021.

MATHEUS, A. S. M., *et al.* Impact of diabetes on cardiovascular disease: An update. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, p. 01-15, 2013.

MCLELLAN, Antony C. *et al.* Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. **Clinical Science**, v. 87, n. 1, p. 21-29, 1994.

MOHAMMADZADEH, Ghorban; ZARGHAMI, Nosratollah. Associations between single-nucleotide polymorphisms of the adiponectin gene, serum adiponectin levels and increased risk of type 2 diabetes mellitus in Iranian obese individuals. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 69, n. 7, p. 764-771, 2009.

MORZE, Jakub *et al.* Metabolomics and type 2 diabetes risk: an updated systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Diabetes Care**, v. 45, n. 4, p. 1013-1024, 2022.

NAGANA GOWDA, G. A.; RAFTERY, Daniel. NMR-based metabolomics. **Cancer Metabolomics: Methods and Applications**, p. 19-37, 2021.

NATHAN, D. N; *et al.* Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration. **Arch. Intern. Med.** v. 169, n. 14, p. 1307-1316, jul. 2009.

NICHOLSON, Jeremy K.; BUCKINGHAM, Malcolm J.; SADLER, Peter J. High resolution ¹H nmr studies of vertebrate blood and plasma. **Biochemical Journal**, v. 211, n. 3, p. 605-615, 1983.

NIE, Cunxi *et al.* Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 954, 2018.

OKAMOTO, Yoshihisa *et. al.* Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 22, p. 2767-2770, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação do diabetes mellitus. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2019.

OSHIMA, Kazuya *et. al.* Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 331, n. 2, p. 520-526, 2005.

OUYANG, Ting *et al.* ¹H NMR-based metabolomics of paired tissue, serum and urine samples reveals an optimized panel of biofluids metabolic biomarkers for esophageal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1082841, 2023.

PARIS, L. P. *et. al.* Global metabolomics reveals metabolic dysregulation in ischemic retinopathy. **Metabolomics**. v. 12, n. 15, 2016.

PERAIS, Jennifer *et al.* Prognostic factors for the development and progression of proliferative diabetic retinopathy in people with diabetic retinopathy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2023.

PEREIRA, R. A., SICHIERI, R., MARINS, V. M. R. Razão cintura/quadril como preditor de hipertensão arterial. *Cad. Saúde Pública* v. 15, P. 333-4, 1999.

PETERS, Katherine S. *et al.* Plasma arginine and citrulline are elevated in diabetic retinopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 235, p. 154-162, 2022.

PETRUS, Paul *et al.* Glutamine links obesity to inflammation in human white adipose tissue. **Cell metabolism**, v. 31, n. 2, p. 375-390. e11, 2020.

PIETZNER, Maik *et al.* Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals. **BMC medicine**, v. 15, p. 1-12, 2017.

PRAKASH, KJ Hari; PARIJA, Sucheta; KAR, Manisha. Assessment of the relationship of systemic vascular dysfunction and cardiac autonomic neuropathy (CAN) with diabetic retinopathy. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 12, n. 12, p. 3236-3241, 2023.

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.

REMA, M., *et al.* Prevalence of diabetic retinopathy in urban India: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES) eye study, I. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 46, p. 2328–33, 2005.

RHEE, Sang Youl *et al.* Plasma glutamine and glutamic acid are potential biomarkers for predicting diabetic retinopathy. **Metabolomics**, v. 14, p. 1-10, 2018.

ROBERTS, L. D., *et al.* Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. **Lancet Diabetes Endocrinology**. v. 2, n. 13, p. 65–75, 2014.

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

ROOHI, Tamsheel Fatima *et al.* Beyond Glucose: The Dual Assault of Oxidative and ER Stress in Diabetic Disorders. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 30, n. 6, p. 513-531, 2023.

RUTKOWSKI, Joseph M. *et. al.* Adiponectin promotes functional recovery after podocyte ablation. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 24, n. 2, p. 268, 2013.

SHIELDS, B. M. *et al.* The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. **Diabetologia**, v. 55, p. 1265-1272, 2012.

SÁNCHEZ, María Patricia *et al.* Association between +45T> G adiponectin polymorphism gene and type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome in a Venezuelan population. **F1000Research**, v. 8, 2019.

SAKANAKA, Akito *et al.* Saliva and plasma reflect metabolism altered by diabetes and periodontitis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 742002, 2021.

SAOI, Michelle; BRITZ-MCKIBBIN, Philip. New advances in tissue metabolomics: a review. **Metabolites**, v. 11, n. 10, p. 672, 2021.

SQUARA, Simone *et al.* Extending the breadth of saliva metabolome fingerprinting by smart template strategies and effective pattern realignment on comprehensive two-dimensional gas chromatographic data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, n. 13, p. 2493-2509, 2023.

SATO, F. *et al.* MicroRNAs and epigenetics. **FEBS Journal**, v. 278, p. 1598-1609, 2011.

SAYYED KASSEM, Laure *et al.* Beta-cell function in type 2 diabetes (T2DM): Can it be preserved or enhanced?. **Journal of Diabetes**, v. 15, n. 10, p. 817-837, 2023.

SLOAN, Gordon; SELVARAJAH, Dinesh; TESFAYE, Solomon. Pathogenesis, diagnosis and clinical management of diabetic sensorimotor peripheral neuropathy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 7, p. 400-420, 2021.

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

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.

SOLIS-HERRERA, C. *et al.* Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Endotext [Internet]**, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2017-2018, ISBN: 978-85-93746-02-4, editora Clannad, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2**. São Paulo. 21 de Fev. 2024.

[[https://diretriz.diabetes.org.br/diagnostico-e-rastreamento-do-diabetes-tipo-2/#:~:text=O%20diagn%C3%B3stico%20de%20diabetes%20mellitus,a%20hemoglobina%20glicada%20\(A1c\)](https://diretriz.diabetes.org.br/diagnostico-e-rastreamento-do-diabetes-tipo-2/#:~:text=O%20diagn%C3%B3stico%20de%20diabetes%20mellitus,a%20hemoglobina%20glicada%20(A1c))]. Acesso em: 04 de fevereiro de 2024.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tipos de Diabetes**. São Paulo. 2024. [<https://diabetes.org.br/tipos-de-diabetes/>]. Acesso em: 04 de fevereiro de 2024.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Manifesto para Publicação do Protocolo de Retinopatia Diabética**. São Paulo. 15 de Ago. 2021. [<https://diabetes.org.br/manifesto-para-publicacao-do-protocolo-de-retinopatia-diabetica/>]. Acesso em: 04 de fevereiro de 2024.

SUMARRIVA, Katherine *et al.* Arginine and carnitine metabolites are altered in diabetic retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 60, n. 8, p. 3119-3126, 2019.

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

SUN, Y. *et al.* Plasma Metabolomics Reveals Metabolic Profiling For Diabetic Retinopathy and Disease Progression. **Front Endocrinol.** v. 29, n. 12, 2021.

TAN, SZ *et al.* Introdução à metabolômica e suas aplicações em oftalmologia. **Eye**. v. 30, n. 6, p. 773-783, 2016.

TANASE, Daniela Maria *et al.* Depiction of branched-chain amino acids (BCAAs) in diabetes with a focus on diabetic microvascular complications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 18, p. 6053, 2023.

TANG, Shanshan *et al.* Parallelism and non-parallelism in diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, p. 1336123, 2024.

TANG, J.; KERN, T.S. Inflammation in diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 30, n. 5, p. 343-58, 2011.

TAKEMURA, Yukihiro; WALSH, Kenneth; OUCHI, Noriyuki. Adiponectin and cardiovascular inflammatory responses. **Current atherosclerosis reports**, v. 9, n. 3, p. 238-243, 2007.

TOMITA, Y. *et al.* Vitreous metabolomics profiling of proliferative diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 64, n. 1, p.70-82, jan., 2021.

TREDWELL, Gregory D. *et al.* Modelling the acid/base ¹H NMR chemical shift limits of metabolites in human urine. **Metabolomics**, v. 12, p. 1-10, 2016.

TRUONG, Steven *et al.* Association of ADIPOQ single-nucleotide polymorphisms with the two clinical phenotypes type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome in a Kinh Vietnamese population. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, p. 307-319, 2022.

TURER, A.T.; SCHERER, P.E. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2319-2326, 2012.

TZEKOV, R. *et al.* Protein misfolding and retinal degeneration. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 1, n. 3, p. 11, 2011.

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.

VIGITEL BRASIL 2023: **Surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of frequency and sociodemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states and the Federal District in 2023.** Brasilia-DF, 2023.

[<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico>]. Acesso em: 04 de fevereiro de 2024;

VIONNET, Nathalie *et al.* Genomewide search for type 2 diabetes–susceptibility genes in French Whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2–diabetes locus on chromosome 1q21–q24. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1470-1480, 2000.

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

WALKER, D. I., *et al.* Population screening for biological and environmental properties of the human metabolic phenotype: implications for personalized medicine. **Metabolic Phenotyping in Personalized and Public Healthcare**. p. 167–211, 2016.

WANG, Wei; LO, Amy CY. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1816, 2018.

WANG, H. *et al.* Metabolomic profile of diabetic retinopathy: a GC-TOFMS-based approach using vitreous and aqueous humor. **Acta Diabetol**. v. 57, n. 1, p. 41-51, 2020.

WISHART, David S. *et al.* HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D801-D807, 2012.

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

WHITE, Phillip J. *et al.* Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: a two-way street. **Molecular metabolism**, v. 52, p. 101261, 2021.

WHO. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. Report of a WHO Consultation. Geneva, 1995.

WHO. Diabetes. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> > Acesso em: 16 de dezembro de 2024.

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

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em: 07 de Janeiro de 2021.

WU, Ling; WANG, Chi Chiu. Genetic variants in promoter regions associated with type 2 diabetes mellitus: A large-scale meta-analysis and subgroup analysis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 8, p. 13012-13025, 2019.

YANAI, Hidekatsu; YOSHIDA, Hiroshi. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, p. 1190, 2019.

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.

YAO, Yangxue *et al.* A mitochondrial Nanoguard modulates redox homeostasis and bioenergy metabolism in diabetic peripheral neuropathy. **ACS nano**, v. 17, n. 22, p. 22334-22354, 2023.

YE, Risheng *et al.* Adiponectin is essential for lipid homeostasis and survival under insulin deficiency and promotes β -cell regeneration. **Elife**, v. 3, p. e03851, 2014.

YOON, Chang-Ki *et al.* Vitreous fatty amides and acyl carnitines are altered in intermediate age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 64, n. 3, p. 28-28, 2023.

YU, X. *et al.* Dietary taurine supplementation ameliorates diabetic retinopathy via anti-excitotoxicity of glutamate in streptozotocin-induced Sprague-Dawley rats. **Neurochem Res.** v. 33, n. 3, p.500-507, 2008.

YUN, J. H., *et al.* Metabolomics profiles associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patient. **PLoS One**. v. 15, n.10, 2020.

ZENG, K. *et al.* Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism. **Mol Cell Neurosci.** v. 45, n. 2, p. 192-199, 2010.

ZHANG, Dongying *et al.* A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 23, n. 4, p. 265-272, 2009.

ZHANG, Feixue *et al.* Advanced Mass Spectrometry-Based Biomarker Identification for Metabolomics of Diabetes Mellitus and Its Complications. **Molecules**, v. 29, n. 11, p. 2530, 2024.

APÊNDICES

APÊNDICE A– 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 do diabetes que acontecem numa região dos olhos denominada retina. A finalidade deste trabalho é contribuir para identificar marcadores genéticos e precoces da retinopatia diabética, podendo abrir caminho para identificação antecipada de indivíduos com risco da complicação ou da sua rápida progressão.

Solicitamos a sua colaboração para 1) *responder algumas questões sobre sua condição de saúde, medicamentos que toma, e o conhecimento que possui sobre diabetes utilizando questionários apropriados que demorarão em torno de 20 minutos*, 2) *permitir aos pesquisadores determinar seu peso em balança apropriada; altura, medida da cintura e quadril utilizando fita métrica*; 3) *Permitir a 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 tente a desaparecer em poucos dias. Caso ocorra dor ou aparecimento de hematoma devido a coleta de sangue, você deverá entrar em contato com os pesquisadores e será orientado sobre a utilização de compressas e utilização de medicamentos de uso tópico. Por participar deste projeto, sua condição de diabético pode ficar exposta, no entanto, toda a identificação de materiais será realizada através de códigos para evitar sua exposição.

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

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

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

João Pessoa , ____ de ____ de ____

Impressão
dactiloscópica

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--0704 .

APÊNDICE B– INSTRUMENTOS PARA COLETA DE DADOS

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: _____			

DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS

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

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

Tempo de Diagnóstico da Diabetes: _____

Tempo de Diagnóstico da RD: _____

Casos de DM na família:
☐ sim ☐ não ☐ 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/m²) Estado Nutricional:
CIRCUNFERÊNCIAS		
Cintura(cm):	Quadril(cm):	Relação C/Q: Resultado:
DOBRAS CUTÂNEAS (Referência DURNIN E WOMERSLEY, 1974)		
Tricipital(mm):	Bicipital(mm):	
Subscapular(mm):	Suprailíaca(mm):	
Percentual de gordura (%):		

APÊNDICE C– ARTIGO 1

Artigo publicado na Clinical nutrition ESPEN (Fator de impacto: 3,2; Qualis A4, segundo a SCOPUS)

Publicado online em 24 de março de 2024; doi: 10.1016/j.clnesp.2024.03.013

Análise metabolômica dos estágios da retinopatia e amputação no diabetes tipo 2

Tainá Gomes Diniz: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: tainagdiniz@gmail.com
ORCID: 0000-0002-2211-1858.

Caroline Severo de Assis: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: carolsevero5@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0525-1418.

Bruno Rafael Virginio De Sousa: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: brunorafaelnt@gmail.com
ORCID: 0000-0003-2026-5025

Kamila Sabino Batista: ^bInstituto Nacional do Semiárido - INSA/MCTI, Av. Francisco Lopes de Almeida, S/N - Bairro Serrotão - CEP: 58429-970 - Campina Grande (PB). Email: kamila.sabino@outlook.com.
ORCID: 0000-0001-5766-8595

Alexandre Sérgio Silva: ^eDepartamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil. E-mail: alexandresergiosilva@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-3576-9023

Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista: ^fCentro de Referência em Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. Email: queirogaisabella@gmail.com
ORCID: 0000-0003-1127-718X

Marina Gonçalves Monteiro Viturino: ^gUnidade de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Email: mariinagm@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-3112-3030

Yuri Manguera do Nascimento: ^hInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil. Email: yurimanguera@luf.ufpb.br
ORCID: 0000-0002-9732-6191

Evandro Ferreira da Silva: ⁱInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil. Email: evandro@luf.ufpb.br

ORCID: 0000-0002-8072-6658

Josean Fechine Tavares: ^JInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil.Email: josean@ltf.ufpb.br

ORCID: 0000-0003-0293-2605

Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro: ^KNutricionista e coordenadora de curso nas faculdades Três Marias e EESAP, João Pessoa, PB, Brasil. Email:mussara.monteiro@hotmail.com ORCID:0000-0001-7138-2876

Carla Patricia Novaes dos Santos Fechin: ^LFisioterapeuta e professora do Centro Universitário de João Pessoa, João Pessoa, PB, Brasil.Email:carlafechine@hotmail.comORCID:

ORCID: 0000-0002-2736-9006

Darlene Camati Persuhn: Endereço para correspondência: Dra. Darlene Camati Persuhn
Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa-PB
Brasil
CEP 58051-900
Contato: darlenecp@hotmail.com

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, podendo desencadear complicações, especialmente nos olhos (retinopatia diabética) ou amputações de membros. A metabolômica é uma ciência atualmente explorada na busca de biomarcadores ou de perfis que identifiquem doenças ou complicações. Este estudo teve como objetivo analisar pela abordagem metabolômica, amostras de sangue periférico de indivíduos DM2, comparando com portadores de retinopatia diabética e de amputação de membros. A amostra foi constituída de 127 participantes, divididos em grupos: controle, DM2 sem RD (SRD), RD não proliferativa (RDNP), RD proliferativa (RDP) e DM2 amputados (AMP). Metabólitos provenientes do plasma sanguíneo, foram classificados pelos espectros por meio da ressonância magnética nuclear (RMN), as rotas metabólicas de cada grupo pelo metaboanalyst. Identificamos que o metabolismo da fenilalanina, tirosina e triptofano foi discriminante para o grupo RDP. Já biossíntese de histidina, estava estatisticamente associado ao grupo de AMP. Os resultados desse trabalho consolidam metabólitos como glutamina e citrullina discriminantes para RDP, os aminoácidos de cadeia ramificada importantes para a RD e demonstra a relação entre o metabolismo de corpos cetônicos, com metabólito

acetoacetato discriminante para o grupo RDP e a histidina sendo um metabólito significativo no grupo AMP, quando comparado ao grupo S/RD.

Palavras-chave: Ressonância magnética, retinopatia diabética, estágios da doença, metabólica.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um relevante problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018), o DM é uma doença crônica, caracterizada por distúrbios metabólicos, levando a uma hiperglicemia resultante da falha na secreção pela célula β no pâncreas ou ação da insulina ou a junção das duas. Quando os níveis de glicose sanguínea permanecem elevados, poderão ocorrer complicações crônicas, especialmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Dados mais recentes da WHO (2019) mostram que a hiperglicemia causa quase quatro milhões de mortes anualmente elevando os riscos de doenças cardiovasculares e outras patologias.

Dados brasileiros revelam que a taxa de prevalência de retinopatia diabética (RD) afeta cerca de 35 a 40% dos pacientes DM. Isso reflete em um número aproximado de quatro milhões de brasileiros que apresentam algum grau de comprometimento relacionado à RD. Na Paraíba e em João Pessoa o DM afeta respectivamente cerca de 200 mil e 40 mil indivíduos na faixa-etária entre 30 e 69 anos de idade, o que corresponde a uma taxa de 10 % na população paraibana. O edema macular diabético é uma das características da RD, e é o principal responsável pela perda irreversível de acuidade visual, sendo a RD considerada a maior causa de cegueira na população entre 16 e 64 anos. Quanto maior o tempo de evolução do DM maior é o risco de desenvolver RD (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2020).

O controle glicêmico é o fator de risco modificável associado com o desenvolvimento da retinopatia diabética. A sustentação para esta associação baseia-se em ensaios clínicos e estudos epidemiológicos. Há um consenso de que a duração do diabetes e da gravidade da hiperglicemia são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de RD. Recomenda-se que o valor de hemoglobina glicada (HbA1c) seja menor ou igual a 7%, sendo primordial no controle da glicemia na maioria dos pacientes, podendo haver melhoras se permanecer com um valor menor do que 6,5% (American academy of ophthalmology, 2017). Todavia, um grupo de DM desenvolvem retinopatia muito leve, enquanto outro grupo também de DM parecem estar significativamente predispostos a retinopatia grave no mesmo espaço de tempo

de manifestação da doença (Touzani *et al.*, 2019). Isto indica que pode haver diferentes fatores potenciais patogênicos por trás da complicação da RD e que ainda faltam marcadores eficazes para detectar e controlar a ocorrência e progressão da RD (Porta e Striglia, 2020).

A metabolômica é abordagem científica que pode vir a ajudar na análise de marcadores e assim controlar a progressão da doença. Por apresentar avaliação qualitativa e quantitativa dos metabólitos nos fluidos corporais, sendo estes metabólitos resultante dos processos de transcrição e tradução genética e também das interações dos genes com exposições ambientais. Por estes motivos, acredita-se que os metabólitos estejam intimamente relacionados ao fenótipo, especialmente para doenças multifatoriais (Yun *et al.*, 2020). Uma grande vantagem da metabolômica é a capacidade de descobrir metabólitos novos e potencialmente relevantes que podem ser a base de abordagens terapêuticas ou indicadores de prognóstico (Filla; Edwards, 2016). Com relação aos estudos metabolômicos envolvendo retinopatia diabética, o campo permanece pouco explorado, com poucos estudos publicados até o momento e baixa replicação dos resultados (Hou, Wang, Pan 2021).

Ainda que existam relatos acerca de dados metabolômicos de pacientes com RD, a identificação de diferentes metabólitos no desenvolvimento de RD e no desfecho negativo da doença como amputação de membros, especialmente em população brasileira, nunca foi relatada na literatura. Com intuito de preencher essa lacuna, analisamos o perfil metabolômico em plasma de pacientes brasileiros com DM2 com e sem RD. Este estudo teve como objetivo identificar metabólitos alterados em pacientes brasileiros e diabéticos com ou sem RD e amputados, bem como as diferenças metabólicas entre grupos. Além disso, também comparamos as rotas metabólicas diferenciais entre os estágio de RD. A identificação dessas diferenças nos perfis metabólicos pode auxiliar no esclarecimento dos mecanismos moleculares de RD e facilitar a identificação de novos alvos terapêuticos.

MATERIAS E MÉTODOS

Tipo de estudo

Estudo epidemiológico, transversal avaliando aspectos metabolômicos de pacientes diabéticos com e sem RD e amputação.

População

Utilizou-se uma amostra não probabilística de 127 pacientes recrutados nos ambulatórios de endocrinologia e oftalmologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley

(HULW/UFPB). Considerando o universo de diabéticos, esse tamanho amostral foi representativo dessa população para um nível de confiança de 95% e margem de erro de 9,3%. Os participantes eram de ambos os sexos, 55 homens e 72 mulheres, idade média de $60,4 \pm 9,6$ anos com tempo médio de diagnóstico de diabetes mellitus há cerca de $15,6 \pm 8,1$ anos, com ou sem complicações microvasculares na retina. Os participantes foram alocados em cinco grupos: grupo controle (GC) contendo 5 participantes saudáveis; grupo contendo 35 pessoas diabéticas e sem retinopatia (SRD); grupo contendo com 35 pessoas diabéticas com retinopatia não proliferativa (RDNP); grupo contendo 35 pessoas diabéticas com retinopatia proliferativa (RDP); grupo contendo 17 pessoas diabéticas com amputação de membro (AMP). Esta pesquisa foi previamente submetida e aprovada pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba parecer nº 3.053.068. Todos os procedimentos do estudo seguiram os padrões éticos da instituição e foram em cumprimento com a resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e da Declaração Internacional de Helsinque. Todos os voluntários receberam esclarecimentos sobre os procedimentos que seriam realizados, logo após assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Desenho do estudo

O perfil sociodemográfico, dados antropométricos e clínicos (tempo de DM, DM familiar e insulino terapia) foram coletados por meio de um formulário próprio e para quantificar o nível de atividade física foi aplicado um instrumento específico (IPAQ versão curta) (PARDINI, 2001). A pressão foi aferida por um profissional de enfermagem ou nutricionista capacitado utilizando um estetoscópio e um esfigmomanômetro da marca premium empregando a metodologia descrita na diretriz brasileira de hipertensão arterial (Barroso *et al.*, 2021). Em seguida, foi realizada coleta de sangue venoso após jejum de 12 horas para determinação de dados bioquímicos e do perfil metabólico. Também foram submetidos a um exame de fundoscopia realizado por uma médica oftalmologista, para o diagnóstico da presença de RD, seu estágio ou ausência da RD. O diagnóstico teve como parâmetro os seguintes critérios: RDNP apresentando microaneurismas, hemorragia e exsudatos; RDP com microaneurismas, juntamente com uma área de neovascularização do disco óptico, hemorragia vítrea pré-retiniana e exsudatos (Wilkinson *et al.*, 2003).

Dados antropométricos

Para aferição do peso, foi utilizada balança eletrônica com capacidade de até 150 kg e sensibilidade de 100g (Filizola®). Os indivíduos foram pesados em postura ereta, descalços, pés paralelos e totalmente apoiados na plataforma da balança e com os braços alinhados ao longo do corpo. A estatura foi medida por meio de um estadiômetro fixo a parede, que consiste de uma régua de papelão, medindo até 200 cm com divisões de 0,5 cm. Os sujeitos estavam em postura ereta, pés juntos, calcanhares contra a parede e sem adornos na cabeça. O ápice da orelha e o canto externo do olho ficavam em uma linha paralela ao chão, formando um ângulo de 90° com o chão (WHO, 1995). Para o Índice de Massa Corporal foi calculado dividindo-se o peso (em kg) pela altura (em metros) ao quadrado. Os valores obtidos foram categorizados em baixo peso, peso normal, sobrepeso ou obesidade para adultos e magreza, peso normal e sobrepeso para idosos de acordo com os pontos de corte da WHO (1995).

Para aferição da circunferência da cintura o paciente estava com as pernas ligeiramente afastadas e a fita métrica inelástica passava a 2 cm acima da linha da cicatriz umbilical, já para a circunferência do quadril, os participantes se encontravam com as pernas juntas e a fita métrica inelástica passava na parte mais proeminente do glúteo para o diagnóstico do resultado. O valor de referência para homens é 0,95 cm e para mulheres, 0,85 cm (Pereira, 1999).

Nível de atividade física

Para quantificar o nível de atividade física (NAF) dos pacientes, foi utilizado o IPAQ versão curta (Pardini, *et al.*, 2001) permitindo gerar uma estimativa do tempo semanal despendido pelos pacientes em atividades físicas em diferentes intensidades (leves, moderadas ou vigorosas). Em diferentes atividades diárias como trabalho, transporte, tarefas domésticas e lazer, bem como o tempo estimado gasto em atividades na posição sentada. O IPAQ foi aplicado individualmente por um pesquisador devidamente treinado.

Segundo a WHO (2019) para ser classificado como ativo são necessários pelo menos 150 minutos de atividade física leve ou moderada por semana ou pelo menos 75 minutos de atividade física intensa por semana.

Em seguida, os indivíduos foram divididos em dois grupos, os ativos e os insuficientemente ativos de acordo com a nomenclatura do IPAQ.

Coleta de amostras biológicas

O sangue foi coletado por punção venosa de todos os voluntários após jejum de 12 horas. Para análises bioquímicas de HB1AC, glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos e creatinina.

Uma quantidade de 10 µl do sangue total obtido foi usada para determinação da HbA1c. Para esta análise foi utilizada a técnica de imunoturbidimetria em analisador automatizado (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) a 2 horas após a coleta, utilizando kit comercial e seguindo as orientações do fabricante.

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

Em outra alíquota de soro (250 µl) foram feitas dosagens de HDL (método ultracentrifugação-detergente seletivo) colesterol total e triglicerídeos (método enzimático-Trinder) em analisador automatizado, utilizando kit comercial de acordo com as orientações recomendadas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Concentração de colesterol LDL foi determinada pela fórmula de Friedewald onde: $[LDL] = [\text{colesterol total}] - [HDL] - [\text{triglicerídios}/5]$.

Análise do perfil metabólico por RMN de 1H

As análises do perfil metabólico foram realizadas por aparelho Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), modelo Bruker Ascend operando a 400 MHz, localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). De acordo com o protocolo próprio do laboratório, a análise do plasma dos pacientes foi realizada com 5 ml de sangue venoso coletado em tubos de polipropileno com EDTA, em jejum. Após a coleta, o mesmo foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 4 °C para isolar o plasma. O plasma foi transferido para um tubo esterilizado e armazenado a -80 °C, o qual é descongelado para utilização, sendo retirado 200 uL de plasma e adicionado 300 uL de tampão fosfato (0.2 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 7.4) e realizada a homogeneização em vortex por 30 segundos, logo após centrifugadas a 14000 x g, durante 10 minutos em 4 °C. Após a centrifugação, são adicionados 50 uL de água deuterada (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt 0,05% w/w). Em seguida, foram realizadas as análises no aparelho de RMN e o sobrenadante transferido para o tubo de RMN 400 MHz em tubo de 5 mm. A sequência de pulso utilizada para obtenção dos espectros de 1H foi cpmgpr1d, número de scans: 128, ganho do receptor: 58.8, tempo de aquisição: 4,08s,

spectral size:64k e temperatura: 30°C e foram feitas em triplicatas. O tratamento dos espectros obtidos foi feito a partir da correção de linha de base, correção de fase, referenciamento a partir do TSP (0 ppm), foi utilizado o recurso peak picking para assinalamento dos deslocamentos químicos presente nos espectros, line boarding: 0,3, realizado o alinhamento dos espectros, a normalização pela área total e utilizado o intervalo de 0,03 ppm para obtenção do espectro de binnings. O espectro de binning foi utilizado em análises multivariadas com posterior identificação dos binning mais importantes utilizando o banco de dados de ressonância magnética biológica.

Análises estatísticas

Os dados clínicos, IPAQ e bioquímicos 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 categóricas expressas em números e porcentagem. As diferenças entre variáveis independentes normalmente distribuídas e contínuas foram avaliadas pelo teste t de amostras independentes; aquelas sem uma distribuição normal foram comparadas utilizando teste U de Mann-Whitney. O qui-quadrado de Pearson foi utilizado para variáveis categóricas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os dados.

Os binnings foram pré-tratados com o método de auto-escalonamento e avaliados mediante a análise de componentes principais (PCA) multivariada não supervisionada para identificar tendências nos grupos e outliers dentro do conjunto de dados. Em seguida, os binning foram submetidos a análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) multivariada supervisionada para otimizar a separação entre os grupos e obter os valores de Importância da Variável na Projeção (VIP) para identificar potenciais biomarcadores discriminatórios entre os grupos. O modelo foi validado estatisticamente pelo teste de validação cruzada de 10 vezes, onde o valor do parâmetro R^2 para a qualidade do ajuste estava entre 0,0660 a 0,648 e o valor do parâmetro Q^2 para a qualidade da previsão estava entre 0,030 a 0,609; e, pelo teste de permutação de 100 repetições que teve um $p < 0,001$ (Figure S1). Os binnings com valores VIP maior que um ($VIP > 1$) foram identificados e submetidos a análise de vias metabólicas no MetaboAnalyst v.5.0 program (Xia Lab, McGill University, Montreal, Canada) usando a base de dados Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG). O impacto na via maior que 0,2 ($> 0,2$) e a significância estatística de 5%

($p < 0,05$) foram usados para escolher as vias metabólicas mais afetadas entre os grupos do estudo.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a caracterização populacional quanto ao estilo de vida, dados demográficos, clínicos, bioquímicos e antropométricos da amostra. As comparações mostram que os grupos com RD (RDNP e RDP) ou com amputação (AMP) apresentam mais pacientes do sexo masculino, maior prevalência de inatividade física e maior tempo de diagnóstico de DM2.

Tabela 1- caracterização da população de diabéticos, divididos pelos estágios da RD.

	S/RD	RD	p-value	RDNP	p-value	RDP	p-value	AMP.	p-value
	(n=35)	(n=70)	OR (IC 95 %)	(n= 35)	OR (IC 95 %)	(n= 35)	OR (IC 95%)	(n=17)	OR (IC 95%)
Idade	61,94±10,35	59,73±9	0,268	61,58±9,33	0,901	57,88±8,45	0,082	60,7±11,3	0,710
Sexo (fem)	28 (80%)	35 (50%)	0,008* 3,543(1,358-9,24)	18 (51,4%)	0,025* 3,33(1,13-9,76)	17 (48,6%)	0,013* 3,76(1,28-11,01)	7 (41,2%)	0,005* 5,7(1,6-20,4)
IPAQ – ativ. Física (insufic.)	10 (28,6%)	40 (57,1%)	0,002* 0,250(0,103-0,607)	17 (48,6%)	0,041* 0,353 (0,129-0,969)	23 (65,7%)	0,001* 0,174(0,061-0,494)	14 (82,3%)	0,000* 0,086(0,020-0,364)
Tempo Diag. DM2	12,43±6,84	16,26 ± 8,1	0,019*	17,03±7,96	0,166	15,48±8,28	0,101	18,6±8,3	0,007*
DM familiar	27 (77,14%)	51 (72,8%)	0,807 1,134(0,413-3,118)	23 (65,7%)	0,361 1,677 (0,550-5,112)	28 (80%)	0,562 0,689(0,195-2,437)	10 (58,8%)	0,120 2,7(0,755-9,656)
Insulinoterapia	18 (51,4%)	43 (61,4%)	0,236 0,602(0,259-1,397)	21 (60%)	0,375 0,643(0,242-1,710aqui e)	22	0,252 0,563 (0,209-1,512)	13 (76,5%)	0,105 0,346(0,094-1,280)
HbA1c (%)	8,20 (8-9,18)	7,10 (6,95-7,57)	0,000*	7,10 (6,80-7,83)	0,001*	7,15 (6,82-7,58)	0,001*	7,7 (7,09,12)	0,429
Glicemia de Jejum	128,5 (122-160)	131 (121,42-141,69)	0,635	132 (120-149)	0,792	127,50 (113,36-143)	0,581	129 (107,12-159,23)	0,915

Colesterol Total	172,11±40,21	168,5±42,5	0,680	175,12±48,69	0,183	161,88±34,77	0,267	166,12±46,30	0,633
Colesterol HDL	43,9±9,56	43±12,7	0,723	45,5±11,61	0,047*	40,64±13,56	0,249	42,09±11,34	0,542
Colesterol LDL	95,9±29,11	94,4±34,5	0,818	98,7±40,6	0,084	90±26,9	0,387	94,5±39,5	0,879
Triglicerídeos	133 (120-170,5)	128 (133,19-180,33)	0,957	129 (121-179,8)	0,864	119 (124,57-201,88)	0,792	102 (92,26-195,08)	0,321
Creatinina	0,70±0,240	0,92±0,286	0,000*	0,94±0,309	0,092	0,89±0,263	0,003*	0,91±0,19	0,003*
PAS	135,14±15,21	142,42±21,322	0,076	141,8±22,42	0,007*	143,04±20,5	0,075	144,7±22,4	0,076
PAD	86,02±8,45	87,26±9,36	0,515	86,03±9,06	0,818	88,5±9,6	0,264	84,7±10,07	0,622
IMC	28,45 (27,6-31,5)	27,85 (27,41-29,5)	0,462	27,8 (26,9-29,8)	0,519	27,94 (26,97-30)	0,542	27,77(25,44-29,7)	0,208
Relação C/Q	2 (1,73-1,98)	2 (1,84-1,98)	0,413	2 (1,81-2)	0,482	2 (1,80-2,01)	0,510	2(1,39-1,90)	0,095

*p <0.05= diferença estatisticamente significativa. Variáveis quantitativas analisadas pelo teste t independente (quando em distribuição normal e/ou homogênea) e apresentadas como média±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); hemoglobina glicada (Hb1AC).

Nas análises bioquímicas, observa-se maiores níveis séricos de Hb1Ac no grupo S/RD comparado aos demais ($p<0,05$). O colesterol HDL e a PAS estavam significativamente maiores no grupo da RDNP ($p<0,05$). A creatinina também se apresentou elevada ($p<0,05$) no avanço da doença e na sua complicação (RDP e amputação). E em relação aos índices nutricionais, não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos para os dados de IMC e relação C/Q.

Os binnings foram previamente avaliados na PCA (Figura S1) e em seguida na PLS-DA que identificou os binnings mais significativos na projeção (valores de VIP > 1,0), sendo eles atribuídos a 16 metabólitos que discriminaram os grupos (Figura 1): metilamina, aspartato, citrato, tirosine, coline, arginina, histidina, β -glucose, mio-inositol, fenilalanine, colesterol and lipideo (predomínio LDL), TMAO, glutamina, prolina, citrulina e creatina. Cada bin foi representado por seu valor máximo de deslocamento químico que foi então relacionado a um metabólito com base na literatura (Nicholson and Foxall, 1995).

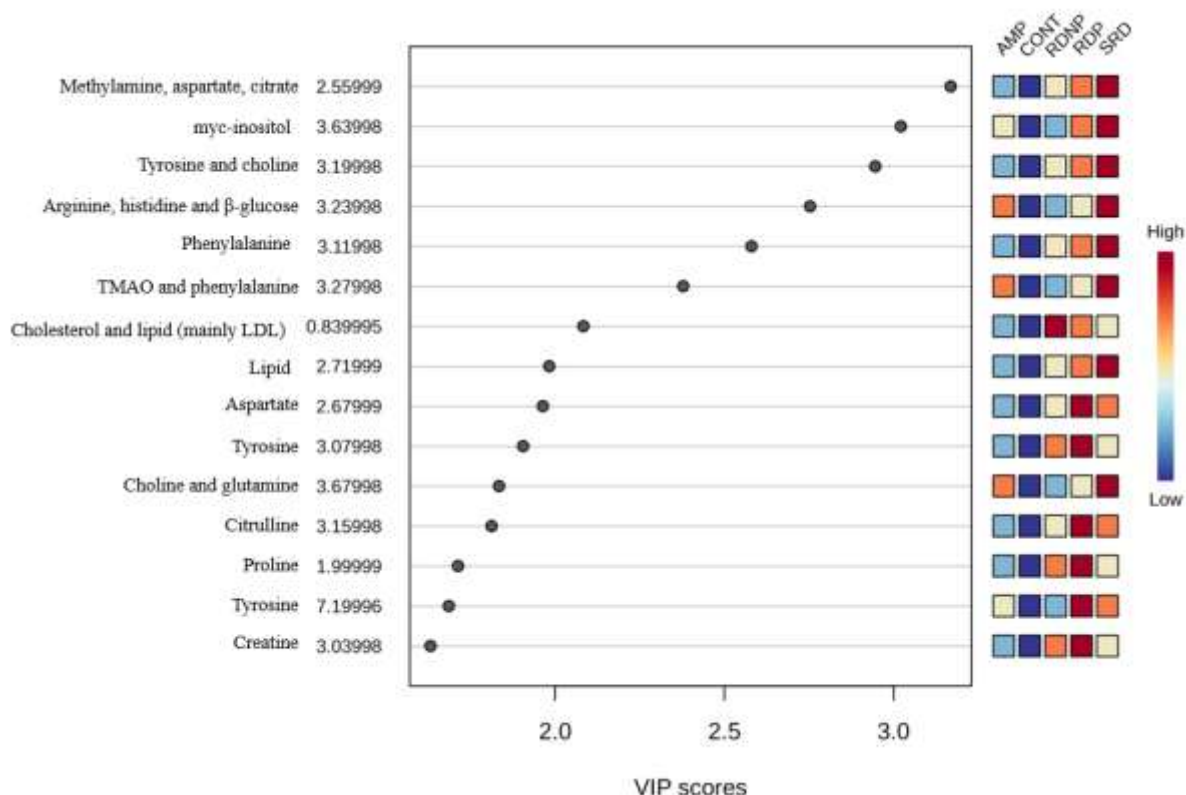


Figura 1- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos em cada grupo do estudo.

A PLS-DA foi realizada também para a comparação de dois grupos com intuito de validar os metabólitos mais discriminantes entre os grupos. Os grupos S/RD, RD (RDP + RDNP), RDNP e RDP quando comparados com o grupo controle (Figura 2A-2D) apresentaram maior concentração relativa dos dezesseis metabólitos com $VIP > 1,0$. Todavia, o grupo S/RD quando comparado o grupo controle teve metabólitos adicionais como a α -glucose e os aminoácidos leucine, isoleucine e alanine no soro (Figura 2A).

Leucina, metionina, glutamato, glicoproteína e isoleucina foram metabólitos encontrados no soro dos grupos RD, RDNP e RDP quando comparados ao grupo controle, (Figura 2B, 2C e 2D). Além disso, a creatinina e albumina estavam em maiores concentrações relativas e tiveram maiores valores VIP no grupo RDNP (1.90 e 1.77, respectivamente) (Figura 2C).

Quando a comparação foi feita entre o grupo controle e o grupo RDP, lipídeo e creatinina estavam mais concentrados e tiveram elevados valores VIP no grupo RDP (1.75) *versus* o grupo controle (1.67) (Figura 2D). Além dos metabólitos listados anteriormente, valina, hhidroxibutirato e acetoacetato se encontraram discriminantes para o grupo RDP.

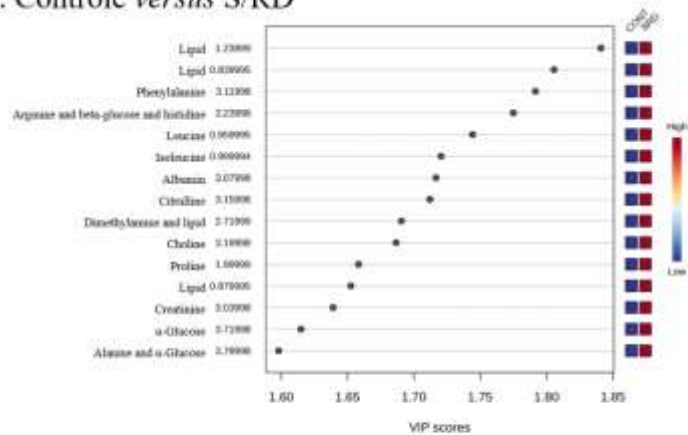
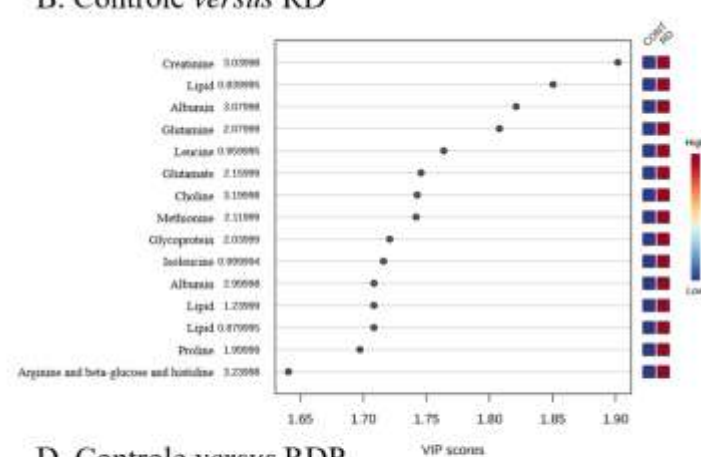
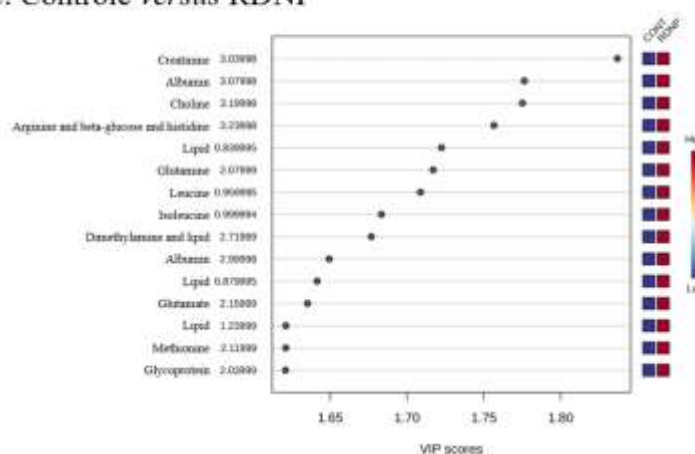
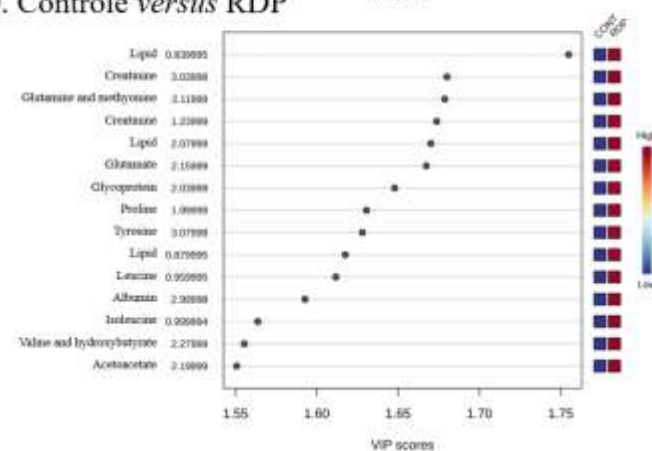
A. Controle *versus* S/RDB. Controle *versus* RDC. Controle *versus* RDNPD. Controle *versus* RDP

Figura 2- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo controle e nos grupos diabéticos.

Quando o grupo SRD foi comparado com os demais grupos (Figura 3), metabólitos discriminantes para esse grupo foram myo-inositol, glutamine e methilamine. Já o metabólito isobutyrate foi encontrado apenas nos grupos RD e RDNP (Figura 3A e 3B). Hydroxybutyrate e oxoglutarate foram metabólitos encontrados apenas nos grupos RD e RDP (Figura 3A e 3C). E a valina foi encontrado no grupo RDP quando comparado com SRD, porém não teve impacto quando separou os grupos em RDNP e RDP.

O metabólito mio-inositol (VIP = 2.4) foi encontrado no grupo dos AMP quando comparado com o grupo SRD (Figura 4B) e grupo RD (Figura 4C). Os metabólitos valina (VIP = 2,25), treonina (VIP = 2.3), prolina (VIP = 1.95), glicerol (VIP = 1,5), glutamina (VIP = 1) e piruvato (VIP = 1.0) se mostraram discriminantes para o grupo AMP quando comparado com o grupo SRD. Glutamina (VIP = 2,08), colina (VIP = 2.5) e histidina (VIP = 2.05) foram metabólitos discriminantes para o grupo AMP quando comparado com o grupo RD.

Após a identificação dos metabólitos mais importantes em cada grupo através dos valores VIP, avaliamos as rotas metabólicas afetadas por esses metabólitos (impacto da via $>0,2$; $p<0,05$). A partir dessas análises, identificou-se as vias mais afetadas (Figura 5 e Tabela S1) foram o metabolismo da alanina, aspartato e glutamato (metabólito impactante: L-glutamato) e o metabolismo de D-glutamina e D-glutamato (metabólitos impactantes: L-glutamato e L-glutamina), sendo que os metabólitos que impactaram estas vias estavam em maiores concentrações relativas nos grupos RD ($p<0,01$) (Figura 5C), RDNP ($p<0,01$) (Figura 5D), RDP ($p<0,01$) (Figura 5E) quando comparados ao grupo controle e, não foram afetadas no grupo SRD (Figura 5B, Tabela S1).

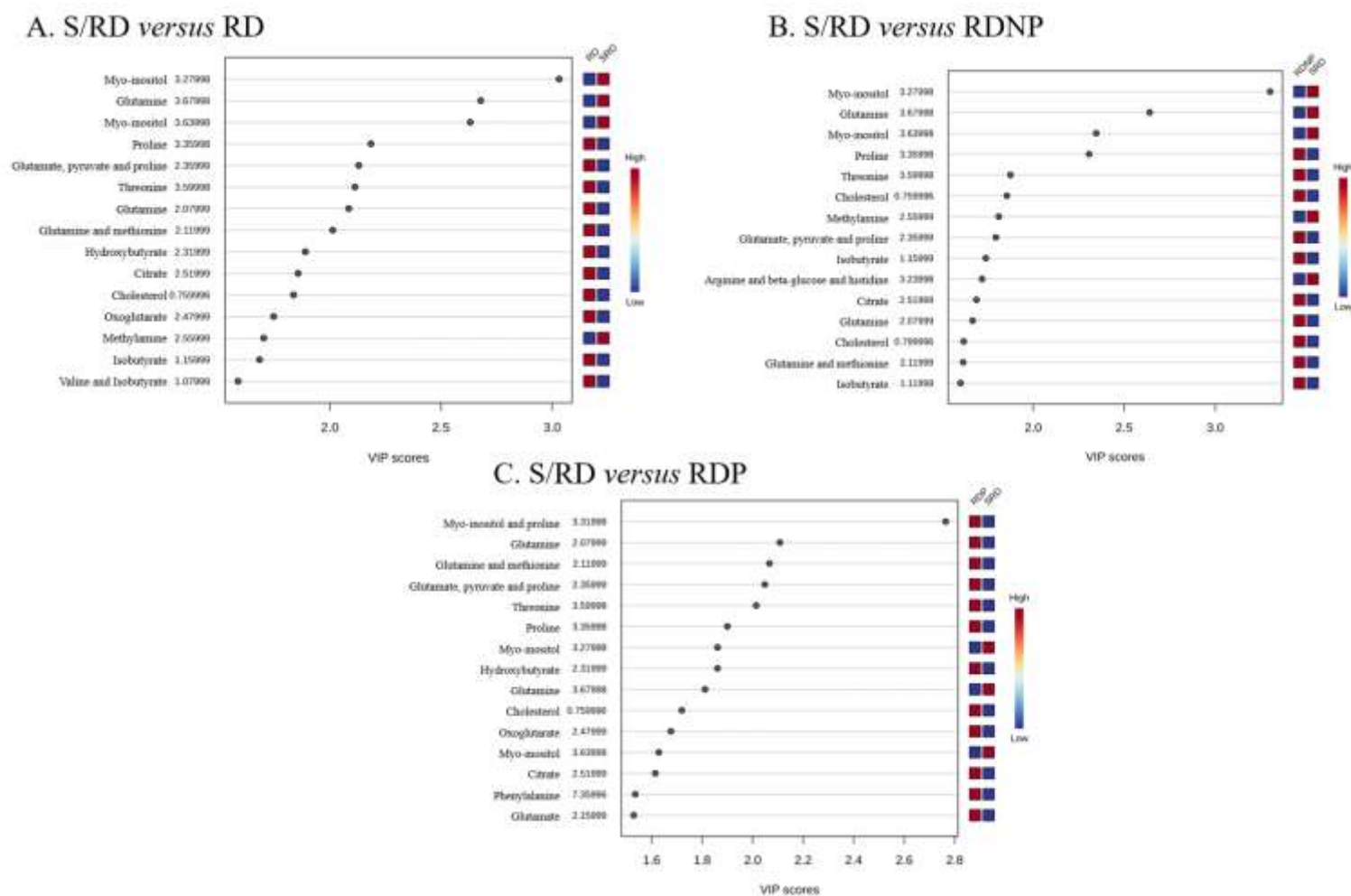
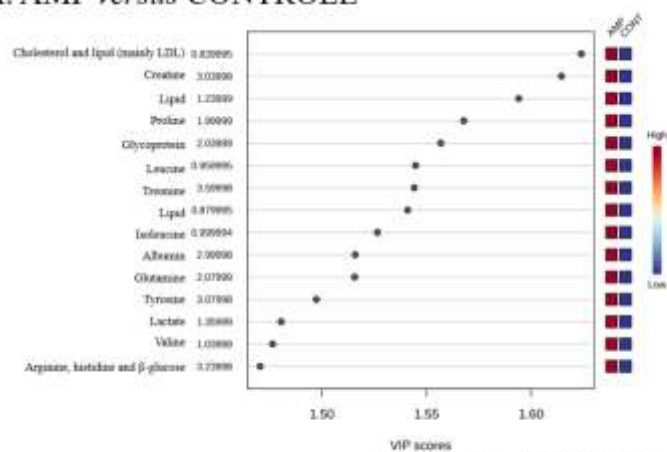
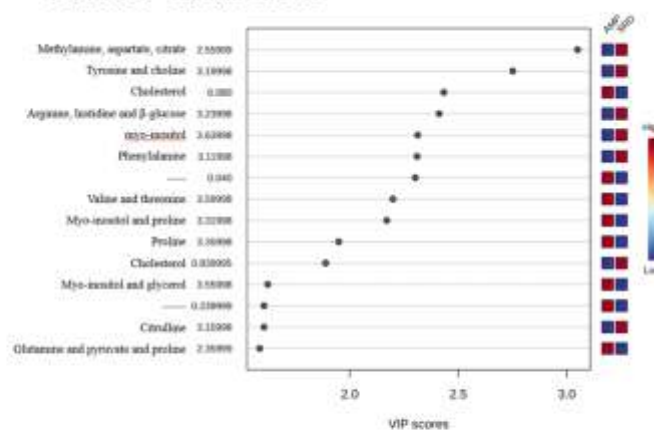


Figura 3- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo S/RD e no grupo de diabéticos com retinopatia.

A. AMP versus CONTROLE



B. AMP versus S/RD



C. AMP versus RD

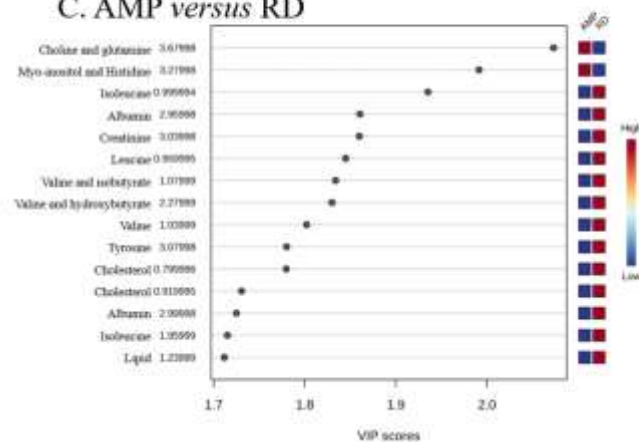


Figura 4- Pontuação VIP para metabólitos relacionados aos binnings e concentrações relativas dos metabólitos no grupo AMP e nos demais grupos.

O metabolismo da histidina (metabólitos impactantes: L-histidina e L-glutamato) se mostrou impactado apenas no grupo RDNP ($p<0,04$) (figura 5D, tabela S1). No grupo RDP (figura 5E, tabela S1) o metabolismo da degradação de corpos cetônicos (metabólito impactante: acetoacetato) se mostrou alterado significativamente ($p<0,03$), podendo ser uma via discriminante desse grupo.

Pode-se então perceber que o glutamato (metabólito que impactou nas vias D-glutamato, D-glutamina, alanina, aspartato e glutamato, arginina e prolina e via da histidina) discrimina a presença de RD quando comparado ao grupo controle (figura 5C) e o acetoacetato (metabólito que impactou na via de síntese e degradação de corpos cetônicos) caracterizou o grupo RDP (figura 5E).

Os metabólitos de todos os grupos com retinopatia (RDNP e RDP) ainda foram comparados com os metabólitos do grupo S/RD (figura 6 e tabela S2) resultando em alterações no metabolismo da histidina (metabólitos impactantes: L-histidina e L-glutamato) e no metabolismo da arginina e prolina (metabólitos impactantes: arginina, prolina, piruvato e glutamato)-apenas no grupo RDNP (figura 6B, tabela S2). A biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (metabólitos impactantes: L-histidina e fenilalanina) e o metabolismo da fenilalanina (metabólitos impactantes: L-fenilalanina) foram afetados apenas no grupo RDP (Figura 6C, Tabela S2), discriminando os estágios da doença.

O metabolismo da fenilalanina, tirosina e triptofano (metabólitos impactantes: L-tirosina e L-fenilalanina) se mostrou alterado no grupo amputado quando comparado com os grupos controle (Figura 7A), S/RD (Figura 7B) e RD (Figura 7C) (Tabela S3). Podendo mostrar que é um metabolismo que discrimina um desfecho negativo da doença.

A biossíntese de arginina (metabólitos impactantes: L-citrulina; L-glutamina, L-aspartato, L-arginina) e o metabolismo da histidina (metabólitos impactantes: L-histidina e L-aspartato) foram mais impactados quando comparado AMP com S/RD (figura 7B).

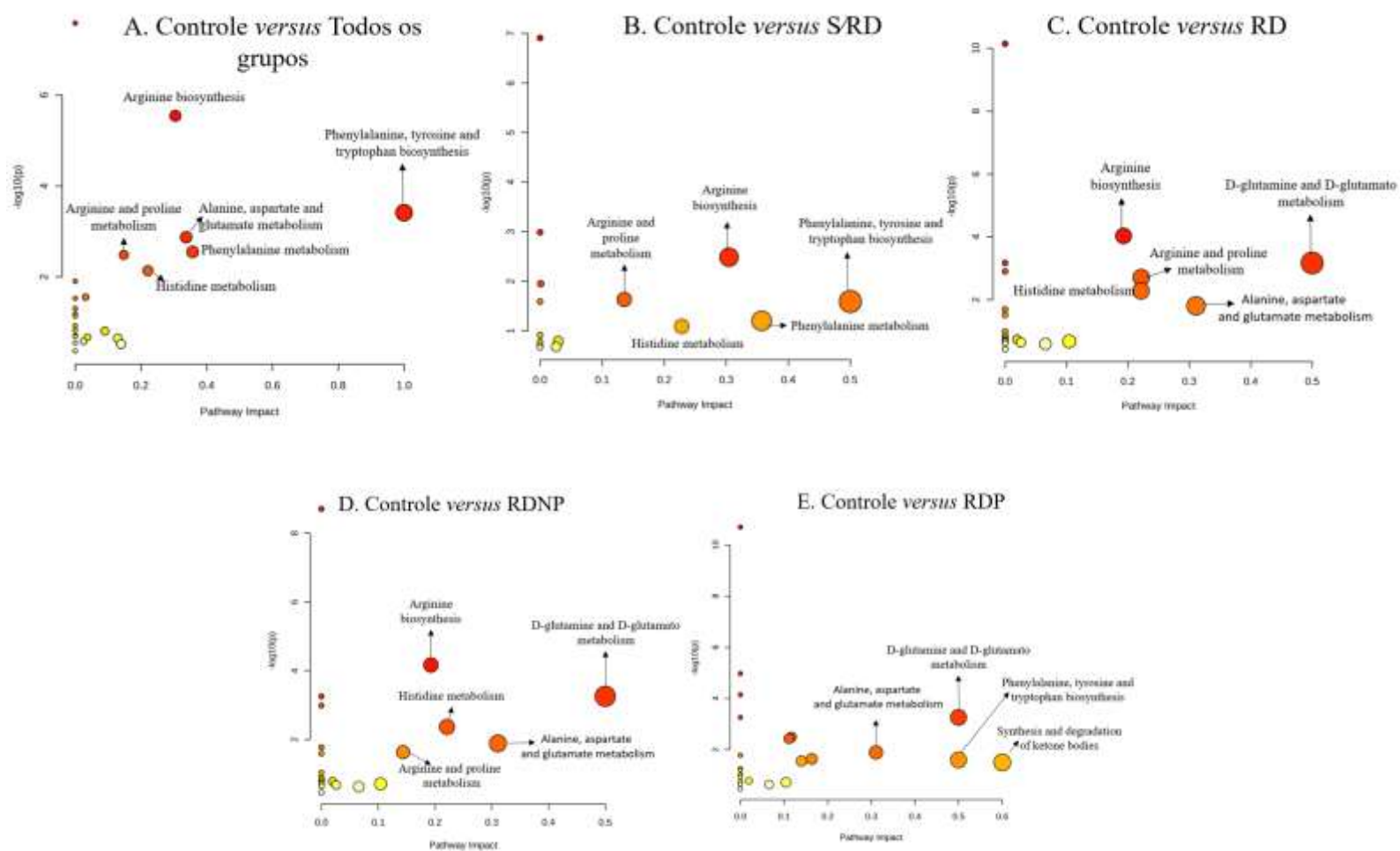


Figura 5- Rotas metabólicas do grupo controle em comparação aos demais grupos. **Legenda:** A intensidade da cor (branca a vermelha) reflete o aumento da significância estatística e o diâmetro do círculo varia com o impacto da via metabólica.

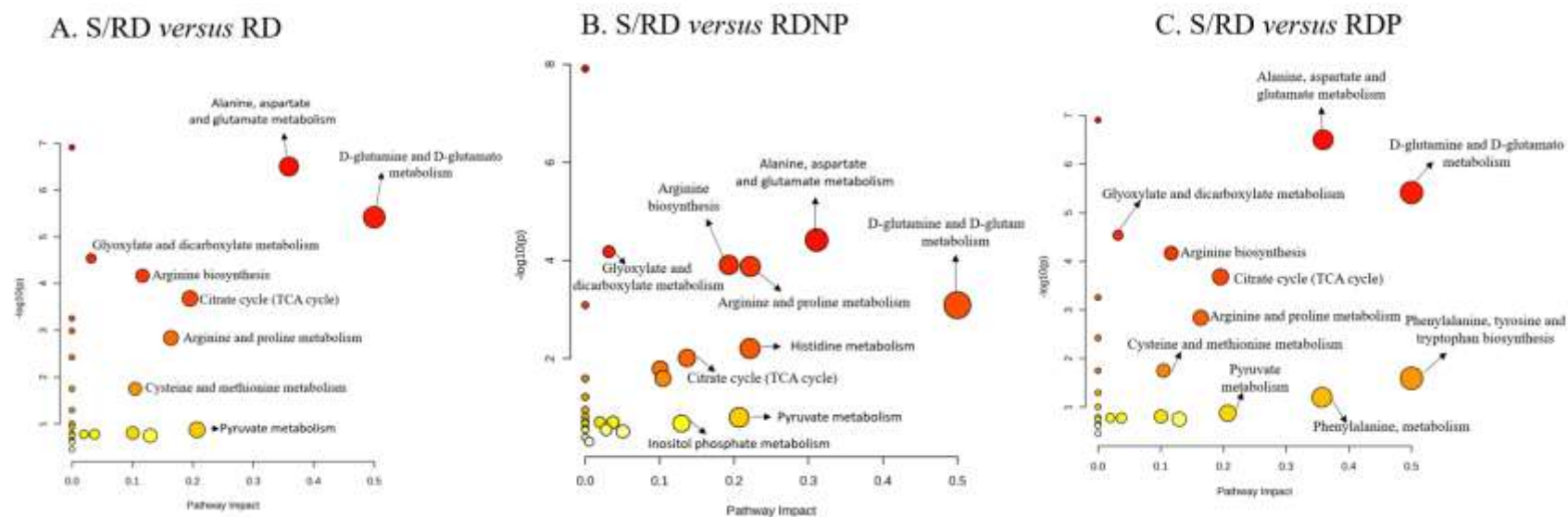


Figura 6- Via metabólica do grupo S/RD em comparação com os estágios da RD. **Legenda:** A intensidade da cor (branca a vermelha) reflete o aumento da significância estatística e o diâmetro do círculo varia com o impacto da via metabólica.

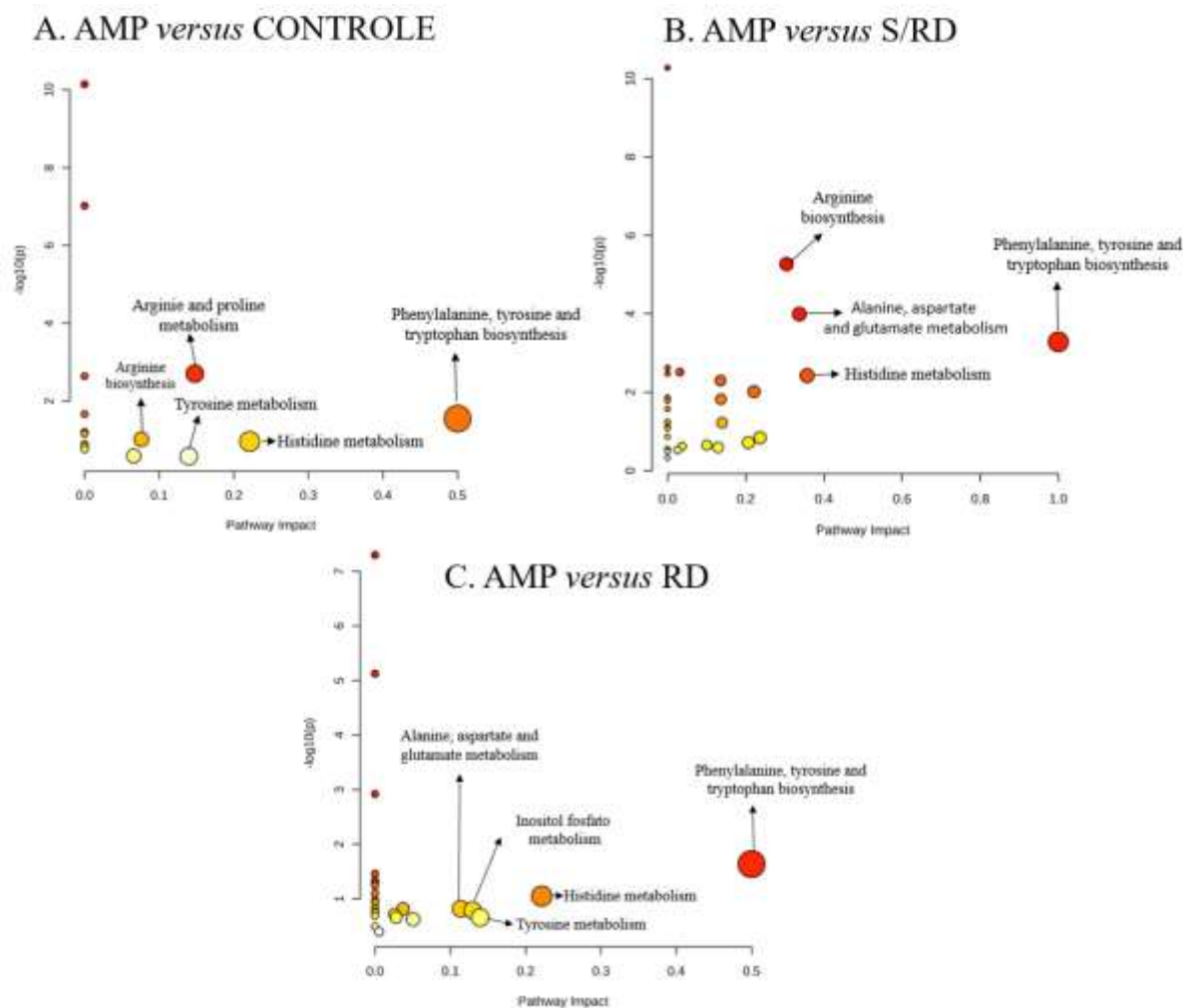


Figura 7- Via metabólica em comparação com o grupo amputado. **Legenda:** A intensidade da cor (branca a vermelha) reflete o aumento da significância estatística e o diâmetro do círculo varia com o impacto da via metabólica.

DISCUSSÃO

Nesse estudo utilizamos a metabolômica por RNM, por ser considerado um novo método de abordagem importante na descoberta de novos marcadores fisiopatológicos nas doenças humanas, com identificação de biomarcadores circulantes, contribuindo assim para o diagnóstico, prognóstico e estimativa de risco de doenças. Destacamos a comparação pioneira de potenciais metabólitos biomarcadores dos estágios da RD, utilizando comparações entre grupo controle saudável, DM S/RD, RDNP, RDP e AMP. Importantes achados inéditos de nosso estudo demonstrou que o metabolismo de síntese e degradação de corpos cetônicos junto com o metabólito acetoacetato e a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram discriminantes para o grupo RDP. E a via da biossíntese da histidina se mostrou significativa no grupo AMP, quando comparado com o grupo S/RD.

Um achado de nosso estudo foi os metabólitos valina e isobutirato que foram discriminantes para o grupo RDNP, corroborando com o estudo de Silva *et al.* (2023) que observaram que a valina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, glicina e hidroxilisina estavam associados a um risco maior de RD em pacientes com DM2 acompanhados por 12 anos. Entretanto, no estudo em questão os participantes não foram analisados quanto aos estágios da doença. Wang *et al.* (2020) analisando amostras de humor vítreo sem levar em consideração os estágios apontaram a valina como um metabólito alvo que caracteriza a RD, além disso, valores elevados de valina, leucina e isoleucina, aminoácidos formadores do BCAA, foram considerados um dado de acompanhamento para aumento do nível neurotóxico de glutamato na retina, que pode desempenhar um papel importante na neurodegeneração da RD. O isobutirato é produto do metabolismo da valina e tem função de promover a captação de ácidos graxos, podendo resultar em resistência insulínica e aumentar o risco de doenças cardiovasculares (Jang *et al.*, 2016). Não há dados na literatura que mencionem esse metabólito na população diabética.

Em relação as vias metabólicas que discriminavam o grupo RDNP encontramos o metabolismo da arginina e prolina, sendo a prolina um metabólito da arginina. Peters (2022), avaliou por metabolômica que os níveis plasmáticos de arginina e citrulina, outro aminoácido presente na via da arginina, estavam aumentados em pacientes diabéticos nos estágios de RDNP e RDP.

Em relação ao grupo RDP, metabólitos como oxoglutarato e acetoacetato, impactaram na via do metabolismo da síntese e degradação dos corpos cetônicos sendo discriminantes para o grupo RDP. O oxoglutarato, é um ácido orgânico, que já havia sido previamente descrito como discriminador sérico de RDP em pacientes com DM2 por Wang *et al.* (2022).

O acetoacetato e o hydroxibutirato, são substratos energéticos que substituem a glicose em condições de insuficiência alimentar. A formação de corpos cetônicos é regulada principalmente pelo suprimento de acetil- CoA que quando entra no ciclo de Krebs é um precursor de ácidos graxos para o fígado. Altos níveis de ácidos graxos e glucagon estimulam a insulina e inibe a cetogênese hepática. No DM1, a depender da glicemia descontrolada, a cetoacidose pode ocorrer se houver um aumento e acumulação dos corpos cetônicos, isso pode ocorrer quando há falta ou resistência à insulina. No DM2 a produção suficiente de insulina continua a prevenir a cetogênese excessiva (Moller, 2020). Em nosso estudo 74 dos 122 participantes com DM2, estavam em tratamento com insulina, o que pode evidenciar que há pelo menos uma ineficácia parcial da ação da insulina, podendo culminar na presença dos corpos cetônicos descritos. Não encontramos dados prévios que associem o metabolismo de corpos cetônicos, metabolômica e RD.

A glutamina que consiste em metabólito impactante na via D-glutamina e D-glutamato, foi importante que na discriminação do grupo RD. Esse dado foi comparado com os achados da literatura prévia em amostras de plasma que destacam glutamina sendo metabólito potencialmente relacionados a RD (Rhee, 2018; Zhu, 2019). Sendo um aminoácido de importante fonte de carbono para a síntese endógena de glicose, é também um precursor da gliconeogênese (Darmaun, Santiago, Mauras, 2019) e desempenha um papel na desregulação metabólica da RD via reciclagem de glutamato (Du *et al.*, 2022). Corroborando ainda com Peters *et al.* (2022) e seus achados, o glutamato e a citrulina eram outros metabólitos com potenciais biomarcadores para RD. A citrulina ocasiona um melhor funcionamento cerebral, pois garante a oxigenação do tecido e reduz a produção de amônia e ácido láctico, garantindo melhor controle de pressão arterial e captação de glicose. Em nosso estudo, a citrulina se mostrou significativa no gráfico da PLS-DA em pacientes com RDP, quando comparado todos os grupos. Foi um metabólito que impactou na via da arginina quando comparou os grupos AMP com S/RD. Já o glutamato impactou o metabolismo da alanina e aspartato nas comparações entre os grupos S/RD *versus* RD e

controle *versus* RDP, assim o glutamato foi um outro metabólito discriminante para o grupo RD.

A biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano se mostrou presente e discriminante para o grupo RDP. Não encontramos dados prévios que demonstrem essas vias e metabólitos relacionados a microcomplicação do diabetes na retina. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina foram associados a resistência insulínica, característica presente no DM2 (Bloomgarden, 2018). O estudo de caso controle de Hosseinkhani *et al.* (2022) realizado com 412 indivíduos e que teve como objetivo de analisar a metabolômica direcionada de aminoácidos e acilcarnitinas como marcadores de risco para diabetes pela técnica de LC-MS/MS, apresentou que os metabólitos fenilalanina, tirosina e triptofano e outros foram positivamente associados ao diabetes. Os achados de Hosseinkhani *et al.* (2022) corroboram com outros estudos prévios (Mulwijk, *et al.*, 2020; Gunther, *et al.*, 2020; Bos, *et al.*, 2020; Li, *et al.*, 2021).

A fenilalanina, tirosina e triptofano são aminoácidos aromáticos, sendo o triptofano e a fenilalanina aminoácidos essenciais na dieta humana. O metabolismo do triptofano está ligado à produção de serotonina, que é um neurotransmissor ligado ao bem estar. A fenilalanina é convertida pela enzima fenilalanina hidroxilase no aminoácido não essencial tirosina (Lichter, 1999). A ativação dessa enzima pode ser alterada pela inflamação ocasionada por algumas doenças, resistência insulínica e glicemia em jejum alterada (Bloomgarden, 2018).

O metabolismo de fenilalanina esteve presente apenas nas amostras do grupo de SRD, quando comparado com o grupo controle. Nossos resultados são corroborados por Wang *et al.* (2022), que demonstraram que o metabolismo de fenilalanina é capaz de diferenciar os grupos de pacientes asiáticos com DM2 e RDP. Todavia, outro estudo que avaliou a fenilalanina e tirosina plasmáticas e suas interações para risco de RD em diabetes tipo 2, também na população asiática, concluiu que redução concomitante dos níveis plasmáticos de fenilalanina e tirosina aumentam de forma sinérgica o risco de RD em DM2. Contudo, não houve diferença significativa que discriminasse o risco de RD quando esses níveis estavam baixos de forma isolada (Luo, *et al.* 2020). Vale ressaltar que a fenilalanina modifica o receptor beta de insulina e inativa a sinalização de insulina e a captação de glicose (Zhou, 2022).

O metabolismo de alanina, aspartato e glutamato foi outro destaque do nosso estudo, uma vez que, estava presente nos grupos RD em todos os estágios e ausente no grupo AMP quando comparado ao grupo controle, não sendo discriminantes entre os grupos. Entretanto, Wang (2022) mostraram que o metabolismo de alanina, aspartato e glutamato estava desregulado em pacientes asiáticos com RD, o considerando como via metabólica que poderia distinguir RDP de RDNP. Nosso trabalho teve desenho do estudo semelhante aos os dados prévios publicados por Wang (2022). Ambos são estudos observacionais que analisaram metabólitos no plasma de participantes latino-americanos utilizando a RMN neste estudo e soro de participantes asiáticos utilizando a espectrometria de massa de alta resolução com cromatografia líquida com uma população de total de 60 participantes asiáticos, sendo 45 diabéticos (Wang *et al.*, 2022).

Zhu (2019) também relataram que o metabolismo da alanina, aspartato e glutamato foi mais significativamente enriquecido no grupo RDP em comparação com o grupo RDNP. Jin (2019) analisou metabólitos em humor aquoso de pacientes DM e com RD, por RMN, e encontrou que a via metabólica da alanina, aspartato e glutamato influenciava a discriminação entre os grupos DM e RD, estando mais presente no grupo RD, contudo o estudo não avaliou os estágio da RD. Salientando que esses estudos foram em participantes asiáticos.

O metabolismo da histidina se mostrou presente e discriminante para o grupo RDNP e o grupo amputado, quando comparado ao grupo SRD e RD. É um dado ainda não relatado na literatura para a população latino-americana e com o tamanho amostral significativo. Azab *et al.* (2020), correlacionou as menores concentrações de histidina e outros metabólitos com o alto risco de amputação em pacientes com doença arterial periférica. Apoiando esses achados, Welsh (2018) encontrou que menores concentrações de histidina foram associadas com maior risco de doenças cardiovasculares em pacientes DM2. A histidina é um aminoácido essencial, presente na alimentação, principalmente nos alimentos ricos em proteínas, tem relações bioquímicas e fisiológicas no humano, podendo prevenir doenças relacionadas ao envelhecimento, síndrome metabólica, doenças oculares que são complicações segundo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO'S) e aumento de glicação de proteínas (Babizhayev, Guiotto, Jacobi, 2009; Nicolantonio, McCart, Okefe 2018). A histidina tem função antioxidante, sendo então protetora contra a formação de ERO's, doenças cardiovasculares e DM que possuem características gerais de

estresse oxidativo e produção aumentada de citocinas inflamatórias, tem como efeito anorexígeno da suplementação com histidina e suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes podem ser benéficos nessas populações, visto que quando esse metabólito está em baixas concentrações vimos que está relacionado com o risco de amputação em pacientes com doença arterial periférica e um aumento no risco de complicações macrovasculares no DM.

Os resultados aqui relatados encorajam novos trabalhos focalizados em determinar a quantidade desses metabólitos, para que alvos terapêuticos com esses aminoácidos possam ser idealizados. A limitação deste estudo foi de estiveram relacionadas à utilização do equipamento de RMN de 400 MHz, que tem uma maior dificuldade na obtenção dos espectros e consequentemente na maior dificuldade de discriminar melhor os sinais dos possíveis metabólitos presentes na matriz em comparação com o modelo de equipamento de 600MHz.

CONCLUSÃO

Nosso estudo vem com um diferencial no tamanho amostral e ser um estudo com população latino-americana. Metabólitos como valina e isobutirato foram discriminantes para o grupo RDNP, juntamente com a via da arginina e prolina. Um dado inédito de nosso trabalho demonstrou que o metabolismo de síntese e degradação de corpos cetônicos associado ao metabólito acetoacetato e a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foram discriminantes para o grupo RDP. É importante ressaltar que relatamos pela primeira vez que o metabolismo da histidina, estava presente e discriminante no grupo de amputados.

REFERENCIAS

1. WHO. Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>> Acesso em: 07 de agosto de 2022.
2. WHO. Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization. 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/publications-detail/classification-of-diabetes-mellitus>> Acesso em: 07 de Janeiro de 2022.
3. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2019-2020, editora Clannad, 2020. Disponível em: < <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>. > Acesso em: 24 jul. 2023.
4. AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY Retina/Vitreous Panel. Preferred Practice Pattern® Guidelines. Diabetic Retinopathy. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology, 2017. Disponível em: < www.aao.org/ppp.> Acesso em: 11 mar. 2023.
5. TOUZANI, F. *et al.* Intravitreal injection of anti-VEGF antibody induces glomerular endothelial cells injury. **Case Reports in Nephrology**, v. 2019, 2019.
6. PORTA, Massimo; STRIGLIA, Elio. Intravitreal anti-VEGF agents and cardiovascular risk. **Internal and emergency medicine**, v. 15, p. 199-210, 2020..
7. YUN, Jun Ho *et al.* Metabolomics profiles associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0241365, 2020.
8. FILLA, Laura A.; EDWARDS, James L. Metabolomics in diabetic complications. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 4, p. 1090-1105, 2016.
9. HOU, Xiao-Wen; WANG, Ying; PAN, Chen-Wei. Metabolomics in diabetic retinopathy: a systematic review. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 62, n. 10, p. 4-4, 2021.
10. PARDINI, Renato *et al.* Validation of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ version 6): pilot study in Brazilian young adults. **Rev Bras Cien Mov**, v. 9, n. 3, p. 45-51, 2001.
11. BARROSO, Weimar Kunz Sebba *et al.* Brazilian guidelines of hypertension– 2020. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.
12. WILKINSON, Charles P. *et al.* Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**, v. 110, n. 9, p. 1677-1682, 2003.

13. WHO. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. Report of a WHO Consultation. Geneva, **1995**.
14. PEREIRA, Rosângela Alves; SICHERI, Rosely; MARINS, Vânia MR. Razão cintura/quadril como preditor de hipertensão arterial. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 333-344, 1999.
15. FERNANDES SILVA, Lilian *et al.* Metabolites as risk factors for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes: a 12-year follow-up study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 109, n. 1, p. 100-106, 2023.
16. WANG, Haiyan *et al.* Metabolomic profile of diabetic retinopathy: a GC-TOFMS-based approach using vitreous and aqueous humor. **Acta Diabetologica**, v. 57, p. 41-51, 2020.
17. JANG, Cholsoon *et al.* A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. **Nature medicine**, v. 22, n. 4, p. 421-426, 2016.
18. PETERS, Katherine S. *et al.* Plasma arginine and citrulline are elevated in diabetic retinopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 235, p. 154-162, 2022.
19. WANG, Zongyi *et al.* Serum untargeted metabolomics reveal potential biomarkers of progression of diabetic retinopathy in Asians. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 871291, 2022.
20. MØLLER, Niels. Ketone body, 3-hydroxybutyrate: minor metabolite-major medical manifestations. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 9, p. 2884-2892, 2020.
21. RHEE, Sang Youl *et al.* Plasma glutamine and glutamic acid are potential biomarkers for predicting diabetic retinopathy. **Metabolomics**, v. 14, p. 1-10, 2018.
22. ZHU, Xiao-Rong *et al.* Plasma metabolomic profiling of proliferative diabetic retinopathy. **Nutrition & metabolism**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2019.
23. DARMAUN, Dominique; TORRES-SANTIAGO, Lournaris; MAURAS, Nelly. Glutamine and type 1 diabetes mellitus. 2019.
24. DU, Xiaohui *et al.* Metabolomics of various samples advancing biomarker discovery and pathogenesis elucidation for diabetic retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1037164, 2022.
25. BLOOMGARDEN, Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes*. 2018; 10 (5): 350–2.

26. HOSSEINKHANI, Shaghayegh *et al.* Targeted metabolomics analysis of amino acids and acylcarnitines as risk markers for diabetes by LC–MS/MS technique. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8418, 2022.
27. MUILWIJK, Mirthe *et al.* Contributions of amino acid, acylcarnitine and sphingolipid profiles to type 2 diabetes risk among South-Asian Surinamese and Dutch adults. **BMJ open diabetes research & care**, v. 8, n. 1, 2020.
28. GUNTHER, Samuel H. *et al.* Serum acylcarnitines and amino acids and risk of type 2 diabetes in a multiethnic Asian population. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 8, n. 1, 2020.
29. BOS, Maxime M. *et al.* Metabolomics analyses in non-diabetic middle-aged individuals reveal metabolites impacting early glucose disturbances and insulin sensitivity. **Metabolomics**, v. 16, p. 1-10, 2020.
30. LI, Xin *et al.* Plasma targeted metabolomics analysis for amino acids and acylcarnitines in patients with prediabetes, type 2 diabetes mellitus, and diabetic vascular complications. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 45, n. 2, p. 195-208, 2021.
31. LICHTER-KONECKI, Uta; HIPKE, Christine M.; KONECKI, David S. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 67, n. 4, p. 308-316, 1999.
32. LUO, Hui-Huan *et al.* Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **BMJ Open Diabetes Research & Care**, v. 8, n. 1, 2020.
33. ZHOU, Qian *et al.* Phenylalanine impairs insulin signaling and inhibits glucose uptake through modification of IR β . **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4291, 2022.
34. JIN, Huiyi *et al.* Metabolic characterization of diabetic retinopathy: An ¹H-NMR-based metabolomic approach using human aqueous humor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 414-421, 2019.
35. AZAB, Sandi M. *et al.* Serum metabolic signatures of chronic limb-threatening ischemia in patients with peripheral artery disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1877, 2020.
36. WELSH, Paul *et al.* Circulating amino acids and the risk of macrovascular, microvascular and mortality outcomes in individuals with type 2 diabetes: results from the ADVANCE trial. **Diabetologia**, v. 61, p. 1581-1591, 2018..
37. BABIZHAYEV, Mark A.; GUIOTTO, Andrea; KASUS-JACOBI, Anne. N-Acetylcarnosine and histidyl-hydrazide are potent agents for multitargeted

ophthalmic therapy of senile cataracts and diabetic ocular complications. **Journal of drug targeting**, v. 17, n. 1, p. 36-63, 2009.

38. DINICOLANTONIO, James J.; MCCARTY, Mark F.; OKEEFE, James H. Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome. **Open heart**, v. 5, n. 2, 2018.

APÊNDICE D- ARTIGO 2

Artigo publicado na Scientific Reports (Fator de impacto: 3,8; Qualis A1, segundo a CAPES PERIODILOCOS)

Publicado online em 15 de Novembro de 2024; doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79686-4>

Análise de metabólitos associados com genótipos *ADIPOQ* em Indivíduos com *Diabetes Mellitus* Tipo 2

Tainá Gomes Diniz: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: tainagdiniz@gmail.com
ORCID: 0000-0002-2211-1858.

Caroline Severo de Assis: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: carolsevero5@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0525-1418.

Bruno Rafael Virginio De Sousa: ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil. Email: brunorafaelnt@gmail.com
ORCID: 0000-0003-2026-5025

Kamila Sabino Batista: ^bInstituto Nacional do Semiárido - INSA/MCTI, Av. Francisco Lopes de Almeida, S/N - Bairro Serrotão - CEP: 58429-970 - Campina Grande (PB).
Email: kamila.sabino@outlook.com.
ORCID: 0000-0001-5766-8595

Alexandre Sérgio Silva: ^eDepartamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil. E-mail: alexandresergiosilva@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-3576-9023

Isabella Wanderley de Queiroga Evangelista: ^fCentro de Referência em Oftalmologia, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB) Brasil. Email: queirogaisabella@gmail.com
ORCID: 0000-0003-1127-718X

Marina Gonçalves Monteiro Viturino: ^gUnidade de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Email: mariinagm@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-3112-3030

Yuri Manguiera do Nascimento: ^hInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil. Email: yurimanguiera@lft.ufpb.br
ORCID: 0000-0002-9732-6191

Evandro Ferreira da Silva: ^IInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil. Email: evandro@ltf.ufpb.br
ORCID: 0000-0002-8072-6658

Josean Fachine Tavares: ^JInstituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brasil. Email: josean@ltf.ufpb.br
ORCID: 0000-0003-0293-2605

Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro: ^KNutricionista e coordenadora de curso nas faculdades Três Marias e EESAP, João Pessoa, PB, Brasil. Email: mussara.monteiro@hotmail.com ORCID: 0000-0001-7138-2876

Carla Patricia Novaes dos Santos Fechin: ^LFisioterapeuta e professora do Centro Universitário de João Pessoa, João Pessoa, PB, Brasil. Email: carlafachine@hotmail.com ORCID: 0000-0002-2736-9006

Darlene Camati Persuhn: Endereço para correspondência: Dra. Darlene Camati Persuhn
Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa-PB
Brasil
CEP 58051-900
Contato: darlenecp@hotmail.com

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um importante problema de saúde pública e sabe-se que a identificação de marcadores moleculares envolvidos no controle glicêmico podem impactar o controle da doença. Embora o rs266729. O polimorfismo localizado no promotor do gene da adiponectina (ADP) demonstrou ser um candidato ao envolvimento no controle glicêmico, os grupos genotípicos nunca foram caracterizados em termos de aspectos metabólicos. Objetivo: Analisar os metabólitos presentes no genótipo rs266729 grupos. 127 indivíduos diabéticos foram comparados de acordo com os grupos genótipos rs266729 CC e GC + GG (RFLP-PCR). Os metabólitos do plasma sanguíneo foram classificados por ressonância magnética nuclear (RMN), e as vias metabólicas de cada grupo utilizando a ferramenta MetaboAnalyst. Terapia com insulina ($p = 0,049$) foi mais frequente no grupo GC + GG rs266729. Lactato, alanina, glutamina, aspartato, lipídios, lisina, isoleucina, citrulina, colesterol e fucose impactaram o grupo CC e

aspartato, beta-glicose, glutamato, piruvato, prolina e 2-oxoglutarato impactaram o grupo CG + GG. A via da glicose-alanina, transporte malato-aspartato e ciclo da ureia impactaram o grupo CC (D-glicose, ácido glutâmico, L-alanina, ácido oxoglutarico e ácido pirúvico). A relação glutamina/glutamato provavelmente está relacionada com as causas do rs266729 influenciando o risco de diabetes.

Palavras-chave: Adiponectina, RMN, Metabolômica, rs266729, Diabetes Mellitus tipo 2

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um problema de saúde importante e crescente para todos os países, independentemente do seu nível de desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020), o DM é uma doença crônica, caracterizada por alterações metabólicas distúrbios que levam à hiperglicemia e que resultam de falha na secreção ou ação da insulina ou da junção das duas falhas pela célula β no pâncreas. O Diabetes Mellitus tipo 2 (TDM2) é o mais comumente forma diagnosticada da doença, responsável por cerca de 90% dos casos de DM, e está associada a alterações modificáveis (corporais). Índice de massa (IMC), alimentação inadequada, tabagismo e sedentarismo) e não modificáveis (idade e genética) fatores de risco. Apesar do investimento em medidas de controlo da doença, o TDM2 continua significativamente associado a um elevado taxa de mortalidade (Counsins *et al.*, 2022).

A identificação de marcadores moleculares contribui para a prevenção, monitoramento e tratamento da doença, através da integração de dados multidimensionais, relativos às diferenças individuais (Chung *et al.*, 2020). Neste contexto, único do diagnóstico até os estágios mais avançados da patologia (Schiborn, Schulze, 2022).

A adiponectina (ADP) é uma molécula de baixo peso molecular composta por 244 aminoácidos, secretada pelos adipócitos. O gene ADIPOQ é composto por três éxons e dois íntrons e é amplamente expresso em tecido adiposo (Aljafary, Al-Shuaimi, 2022), rins (Rutkowski *et al.*, 2013), fígado (Berg *et al.*, 2001), pâncreas (Ye *et al.*, 2014), vasos sanguíneos (Okamoto *et al.*, 2002), ossos (Oshima *et al.*, 2005) e células do sistema imunológico (Takemura, Walsh, Ouchui, 2007). O ADP desempenha papel fundamental na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios, favorecendo a oxidação de ácidos graxos e a utilização de carboidratos para redução dos níveis de glicemia e lipídios,

diminuindo assim a resistência periférica à insulina no diabetes (Pajvani *et al.*, 2004; Hanley *et al.*, 2011).

Baixos níveis séricos de ADP podem representar pior controle glicêmico em pacientes com TDM2 (Alfaqih *et al.*, 2022). Um dos polimorfismos do ADP mais comumente investigados em relação ao diabetes é o rs266729, caracterizado por uma substituição C/G no sítio -11.377. Está localizado na região promotora do gene ADP, que parece influenciar a expressão, afetando a sequência de ligação dos fatores de transcrição, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, as implicações clínicas (Zhang *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2022). Portanto, a adiponectina é uma adipocina que favorece a resposta insulínica e o rs266729, ao impactar a expressão da molécula, pode facilitar a hiperglicemia. Na verdade, estudos documentaram a associação do alelo G rs266729 com TDM2 (Sun, *et al.*, 2017; Wu, Wang, 2019; Truong *et al.*, 2022). Os resultados da análise da associação desse locus com o TDM2 em diferentes contextos de índice de massa corporal (IMC) sugerem que o risco do raro alelo G só aparece em grupos obesos, reforçando a hipótese do mecanismo que favorece a resistência à insulina (Cauchi *et al.*, 2008). Além disso, estudos demonstraram a associação do genótipo G rs266729 com doenças cardiovasculares (Smetnev *et al.*, 2019).

Portanto, embora a literatura associe consistentemente o rs266729 ao risco de TDM2, falta informação sobre os metabólitos potencialmente circulantes nos portadores desse alelo de risco, o que poderia justificar essa associação. Os metabólitos são resultados de interações com exposições ambientais e, por reunirem produtos de processos de transcrição e tradução genética, acredita-se que estejam intimamente relacionados ao fenótipo, especialmente para doenças multifatoriais (Yun *et al.*, 2020).

No presente estudo, comparamos metabólitos entre genótipos do polimorfismo ADP rs266729 para avaliar a correlação entre genética e metabolômica. Uma grande vantagem da metabolômica é a capacidade de descobrir metabólitos novos e potencialmente relevantes que poderiam ser a base de abordagens terapêuticas ou indicadores diagnósticos (Filla, Edwards, 2016). Em relação aos estudos metabolômicos envolvendo diabetes e polimorfismo rs266729, o campo científico permanece inexplorado. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que aborda o padrão genotípico metabolômico do rs266729, comparando o grupo de alto risco para TDM2 (CG/GG) com o grupo de

baixo risco (CC), fornecendo informações que podem ajudar a esclarecer a associação de esses genótipos com resultados clínicos.

MATERIAL E METODOS

Tipo de estudo, população e aspectos éticos

Este é um estudo epidemiológico, transversal, que avaliou aspectos metabólicos de pacientes com DM2.

A amostra incluiu 360 pacientes, recrutados nos ambulatórios de endocrinologia e oftalmologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW/UFPB), localizado no nordeste do Brasil, no período de novembro de 2018 a julho de 2022. Os critérios de inclusão foram ter diagnóstico de DM2 por há pelo menos 5 anos e estar em acompanhamento ambulatorial. Os critérios de exclusão incluíram amostra de DNA insuficiente ou análise genotípica inconclusiva. Os participantes foram alocados em dois grupos de genótipos rs266729: CC (n = 216) e GC + GG (n = 144). Análises metabólicas foram realizadas em uma subamostra de 127 pacientes. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, sob parecer nº. 3.053.068 (12/03/2018). Todos os procedimentos do estudo seguiram as normas éticas da instituição e atenderam à Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os voluntários receberam explicações sobre os procedimentos que seriam realizados, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Coletas de amostras biológicas

Os indivíduos permaneceram em jejum por 12 horas antes da coleta de sangue por punção venosa. Posteriormente, foi realizada análise bioquímica das amostras coletadas em laboratório de análises clínicas parceiro, para dosagem de hemoglobina glicada (Hb1Ac), glicemia, colesterol total e suas frações, triglicerídeos e creatinina. A concentração de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi determinada pela fórmula de Friedewald, onde: $[LDL] = [colesterol\ total] - [lipoproteína\ de\ alta\ densidade\ (HDL)] - [triglicerídeos/5]$.

Isolamento de DNA

A extração de DNA foi realizada em amostras de sangue total obtidas por punção venosa com kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen ®), conforme instruções do fabricante. O genótipo rs266729 foi determinado por PCR-RFLP. Pares apropriados de primers e respectivas temperaturas de anelamento foram utilizados para obtenção dos amplicons contendo a região polimórfica de cada gene: rs266729 ADIPOQ (F: CATCAGAATGTGTGGCTTGC e R: AGAAGCAGCCTGGAGAACTG) (PRIOR *et al.*, 2009). O fragmento de 163 pb obtido de rs266729 foi digerido com HhaI e os padrões dos fragmentos indicaram a presença do alelo C quando apareceram 121 e 42 pb. A presença do fragmento não digerido indicou a presença do alelo G (fig. 1).

Análise do perfil metabolômico por RMN de 1H

Amostras de plasma sanguíneo obtidas após 12 horas de jejum e armazenadas a -80 °C até o processamento foram utilizadas para análise dos metabólitos de cada grupo. Alíquotas de 200 µL de plasma foram adicionadas a 300 µL de tampão fosfato (0,2 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4), homogeneizados sob agitação por 30 s, seguido de centrifugação a 14.000 × g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 5 mm após adição de 50 µL de água deuterada com sal sódico de ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d₄ (TSP) (0,05% p/p). Os espectros foram obtidos por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Ascend 400 (Bruker), operando a 400 MHz por 1 h, localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (MCAL) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A seguinte sequência de pulsos foi usada para obter os espectros 1H cpmgpr1d; número de varreduras: 128, ganho do receptor: 58,8, tempo de aquisição: 4,08 s, tamanho espectral: 64 k e temperatura: 30 °C, realizados em triplicata. Os espectros obtidos foram tratados usando correção de linha de base e correção de fase, com base em TSP (0,0 ppm). O recurso de seleção de pico foi usado para indicar as mudanças químicas presentes nos espectros, line board: 0,3, e os espectros foram alinhados, normalizados pela área total, e o intervalo de 0,03 ppm foi usado para realizar o binning espectral. Os espectros de binning foram usados para análises multivariadas, com subsequente identificação do binning mais importante usando o banco de dados de ressonância magnética nuclear biológica (Diniz *et al.*, 2024).

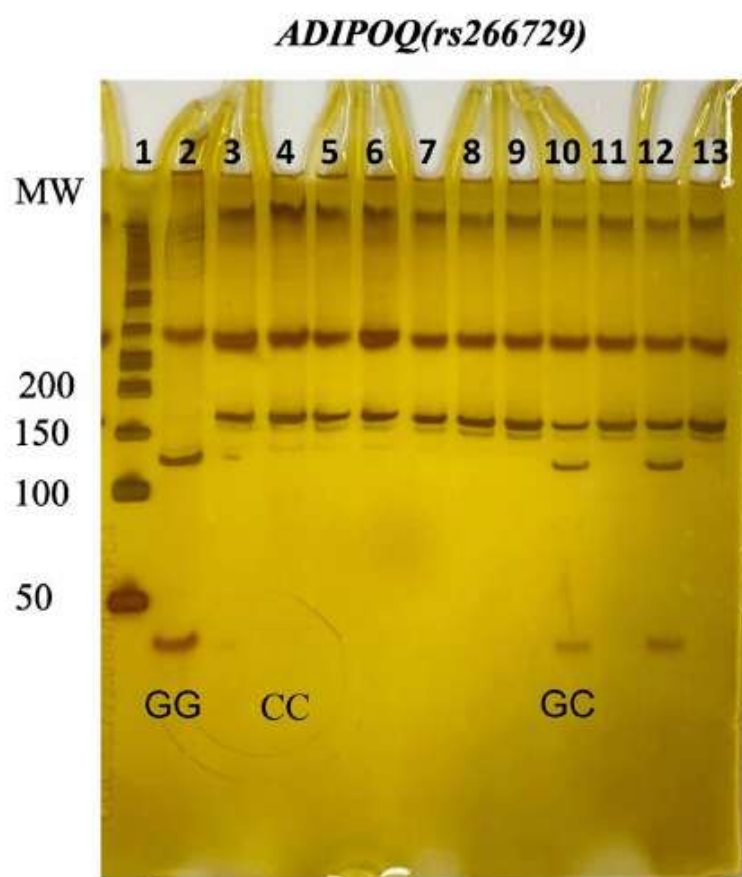


Fig. 1. Genotipagem representativa. Faixa 1: Marcador de massa molecular; Faixa 2: genótipo GG (digestão completa, fragmentos de 121 e 41 pares de bases), Faixas 3–9, 11 e 13: genótipo CC (sem digestão, banda de 163 pares de bases); Faixas 10 e 12: genótipo heterozigoto CG (digestão parcial, fragmentos de 163, 142 e 41 pares de bases presentes).

Análise estatística

As análises dos dados clínicos e bioquímicos foram realizadas usando o software SPSS, versão 26. As variáveis com distribuição normal são expressas como média $\pm$ desvio padrão, e as variáveis sem distribuição normal são apresentadas como valores medianos (mínimo e máximo). As variáveis categóricas são apresentadas como números totais e porcentagens. As diferenças entre as variáveis independentes com distribuição normal e contínua foram avaliadas usando o teste t para amostras independentes, e as variáveis sem distribuição normal foram comparadas usando o teste U de Mann-Whitney. Para as variáveis categóricas, foi usado o qui-quadrado de Pearson, expresso em odds e IC de 95%. Os equilíbrios de Hardy-Weinberg foram calculados para avaliar as frequências genotípicas e alélicas esperadas e observadas, testadas pelo qui-quadrado, com valores

expressos como valor de odds e IC de 95%. A Análise de Variância (ANOVA) foi aplicada em situações com mais de duas categorias, e as variáveis que não seguiram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc pairwise, representadas pela mediana (IC95%). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

O método de escalonamento automático foi usado para lidar com o binning e avaliado usando análise de componentes principais multivariada não supervisionada (PCA) para caracterizar tendências em grupos e valores discordantes no conjunto de dados. O binning foi então submetido à análise discriminante multivariada supervisionada de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para melhorar a separação entre grupos e obter valores de Importância Variável na Projeção (VIP), a fim de caracterizar potenciais biomarcadores discriminatórios entre grupos. Binnings com valores VIP maiores que um ($VIP > 1$) foram reconhecidos e submetidos à análise de via metabólica no programa MetaboAnalyst v.5.0 (Xia Lab, Universidade McGill, Montreal, Canadá) usando o banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Um impacto de via maior que 0,2 ($> 0,2$) e significância estatística de 5% ($p < 0,05$) foram usados para escolher as vias metabólicas mais afetadas entre os grupos de estudo.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as comparações de características entre os grupos genotípicos estudados. As comparações de dados clínicos e metabólicos entre os genótipos rs266729 não resultaram em diferenças nos parâmetros idade, sexo, tempo de DM, glicemia, colesterol total e frações, triglicerídeos e creatinina. A necessidade de terapia com insulina foi observada com mais frequência no genótipo CG + GG do rs266729 do que no genótipo CC.

Para análise dos metabólitos em relação aos polimorfismos do gene ADIPOQ (rs266729), os binnings foram previamente avaliados no PCA e depois no PLS-DA, que identificou os binnings mais significativos na projeção (valores de $VIP > 1,0$). Estes foram atribuídos a 16 metabólitos que discriminaram os grupos em relação aos polimorfismos do gene ADIPOQ (Fig. 2): aspartato, beta-glicose, lactato, alanina, glutamina, lipídios, lisina, isoleucina, glutamato, piruvato, prolina, citrulina, colesterol, fucose e 2-oxoglutarato. Cada

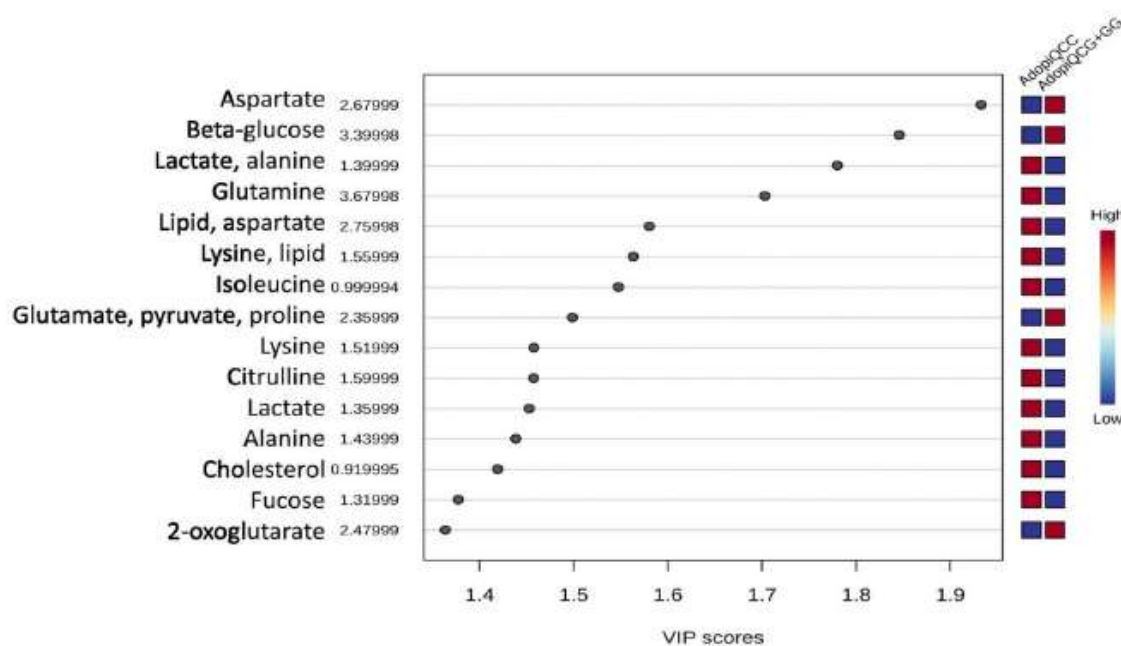
compartimento foi representado por seu valor máximo de deslocamento químico, que foi então relacionado a um metabólito.

Tabela 1. Parâmetros clínicos, bioquímicos e metabólicos de acordo com os genótipos rs266729 (ADIPOQ).

DESCRIÇÃO	rs266729 (ADIPOQ)		
	CC (n= 216)	CG+GG (n=144)	p-value OR (CI 95%)
Idade (ano)	61.3 ± 9.9	60.8 ± 9	0.663
Sexo (F%)	140 (64.8%)	91 (63.2%)	0.823 1.1 (0.7 – 1.7)
DM2 duração (anos)	13.7 ± 7.5	14.3 ± 7.5	0.463
História de DM2 na família (%)	164 (75.9%)	104 (72.2%)	0.188 1.4 (0.9 – 2.4)
Insulinoterapia (%)	117 (54.2%)	93 (64.5 %)	0.049* 0.6 (0.4 – 1)
HbA1c (%)	7.5 (5.1 - 12.3)	7.95 (4.7 – 12.5)	0.171
Glicose (mg/dL)	134.5 (35 – 329)	134 (48 – 332)	0.389
Colesterol total (mg/dL)	165.5 (74 – 308)	170 (74 – 290)	0.979
HDL-c (mg/dL)	42 (23 – 83)	43 (8 – 86)	0.847
LDL-c (mg/dL)	92.5 (17.6- 190.8)	87.6 (31.2 -202.8)	0.695
Triglicerídeos (mg/dL)	122 (22 – 705)	122.5 (35 – 748)	0.800
Creatinina (mg/dL)	0.8 (0.4 – 2.1)	0.8 (0.4 – 1.5)	0.082

* p < 0,05 = diferença estatisticamente significativa. Para (rs266729—ADIPOQ): variáveis categóricas analisadas pelo teste qui-quadrado, valores expressos como 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. Variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram analisadas pelo teste U de Mann–Whitney e representadas pela mediana (IC95%). Variáveis quantitativas analisadas pela ANOVA (quando 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 teste post-hoc pareado, representado pela mediana (IC95%) nos grupos e identificação representada pelo valor de p, teste estatístico (qui-quadrado) e graus de liberdade. Colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c); colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c).

Fig. 2. Pontuação VIP para metabólitos relacionados à classificação relativa de metabólitos nos grupos rs266729 CC e rs266729 GC + GG.



Após identificar os metabólitos discriminantes entre os grupos por meio dos valores de VIP, avaliamos as vias metabólicas afetadas por esses metabólitos (impacto da via > 0,2; $p < 0,05$) e, com base nessas análises, conseguimos identificar as vias mais afetadas (Fig. 3).

Fig. 2. Vias metabólicas da comparação do grupo rs266729 CC versus o grupo rs266729 GC + GG. Legenda: A intensidade da cor (amarelo para vermelho) reflete o aumento da significância estatística e o diâmetro do círculo varia com o impacto da via metabólica.

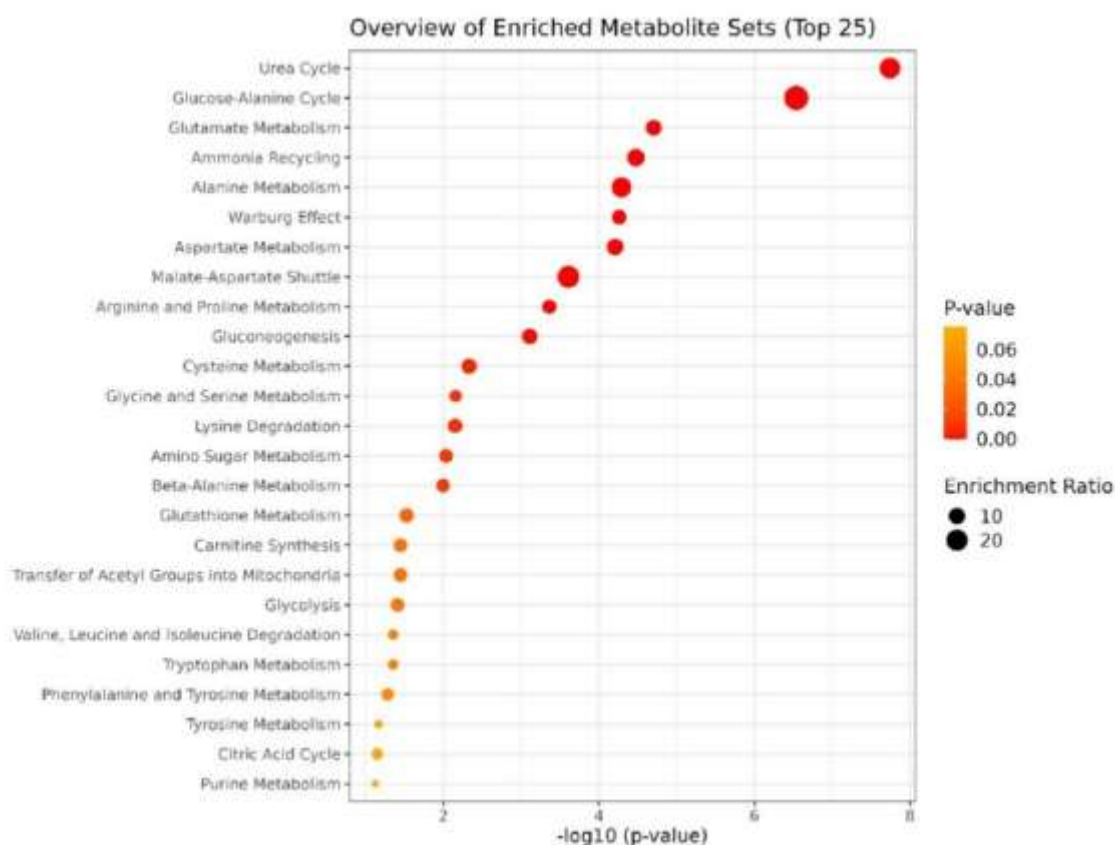


O metabolismo que mais discriminou os grupos foi o ciclo glicose-alanina ($p = 0,00$), e os metabólitos que mais impactaram esse ciclo foram D-Glicose; Ácido glutâmico; L-Alanina; Ácido oxoglutárico; e Ácido pirúvico (Fig. 4).

O transporte malato-aspartato ($p = 0,00$) foi a segunda via que mais discriminou o grupo CC do grupo GC + GG no rs266729, sendo D-glicose; Ácido glutâmico; L-Alanina; Ácido oxoglutárico, ácido pirúvico, os metabólitos que mais impactaram essa via (Fig. 4).

A terceira via, que também discriminou os grupos, foi o ciclo da ureia ($p = 0,00$), com os metabólitos D-Glicose; Ácido glutâmico; L-Alanina; Ácido oxoglutárico; Metabólitos do ácido pirúvico demonstrando os maiores impactos (Fig. 4).

Fig. 3. Vias metabólicas da comparação do grupo rs266729 CC versus o grupo rs266729 GC + GG em um gráfico de pontos. Legenda: A intensidade da cor (amarelo para vermelho) reflete o aumento da significância estatística e o diâmetro do círculo varia com o impacto da via metabólica.



DISCUSSÃO

Os achados mostraram que o grupo genotípico GC + GG do rs266729 foi associado à terapia com insulina. Considerando esse achado, o alelo G do rs266729 foi associado à menor expressão de adiponectina e à terapia com insulina, representando um risco para doença vascular periférica (Joosten *et al.*, 2013). Chen *et al.*(2023) mostraram que baixas concentrações séricas de ADP podem influenciar pior controle glicêmico em pacientes com TDM2. Meta-análises encontraram associação do alelo G do rs266729 com TDM2(Sun *et al.*, 2017; Wu, Wang, 2019). A associação entre baixas concentrações de ADP e TDM2 foi demonstrada em Populações mediterrânea (Coltell *et al.*, 2021), hispânica, afro-americana (Hanley *et al.*, 2011) e chinesa (Wang *et al.*, 2018). A

herdabilidade desempenha um papel significativo nas porcentagens das concentrações plasmáticas de ADP, destacando a importância de investigar polimorfismos genéticos que podem influenciar essa variação (Williams, 2020). Este conjunto de dados reúne evidências da associação de ADP e rs266729, com impacto no controle glicêmico e no risco de TDM2, o que torna interessante analisá-los à luz da metabolômica.

Considerando os metabólitos discriminatórios encontrados no grupo rs266729 CG + GG, o glutamato tem relevância marcante. Concentrações elevadas de glutamato foram associados negativamente à sensibilidade à insulina e à espessura íntima da carótida com aterosclerose em pacientes com aterosclerose subclínica (Lehn-Stefan *et al.*, 2021). Além do glutamato no grupo rs266729 CG + GG, a glutamina é discriminante no grupo do genótipo rs266729 CC. Há evidências que sugerem que uma proporção reduzida de glutamina/glutamato aumenta o risco metabólico de pacientes com ou sem diagnóstico de diabetes, aumentando a probabilidade de complicações microvasculares (Porcus *et al.*, 2021; Rhee *et al.*, 2018).

Em uma amostra de indivíduos saudáveis testados com uma dieta de baixo índice glicêmico composta de grãos integrais versus uma dieta de alto índice glicêmico, os metabólitos glutamina e citrulina, que foram discriminantes no grupo do genótipo rs266729 CC, foram associados ao perfil metabolômico (Navarro *et al.*, 2019). A glutamina é conhecida por desempenhar um papel no aumento da sensibilidade à insulina, melhorando os estados hiperglicêmicos e exercendo um efeito na glicose plasmática quando usada em abordagens de suplementação dietética (Hasani *et al.*, 2021).

O aminoácido de cadeia ramificada (BCAA) isoleucina foi discriminante no grupo CC rs266729. Isso foi inesperado, considerando que este é o grupo que demonstra o melhor potencial para controle glicêmico. No entanto, alguns detalhes devem ser considerados neste resultado: 1) ambos os grupos, CC e GC + GG, são compostos apenas por pacientes diabéticos, 2) embora a presença de isoleucina tenha sido destacada no grupo CC e nenhum outro BCAA tenha sido destacado no grupo GC + GG, a associação de isoleucina com risco de diabetes foi encontrada como significativamente heterogênea entre os estudos de metabolômica sobre diabetes incluídos na meta-análise (Guasch-Ferré *et al.*, 2016, Vanweert *et al.*, 2022).

Em um estudo que incluiu análise multivariada do perfil metabolômico, incluindo concentrações de ADP e potenciais SNPs relacionados à concentração deste marcador

como variável discriminante, foi identificado que, em geral, um ADP circulante mais alto foi associado a um perfil metabólico sistêmico mais saudável. Especificamente em relação aos metabólitos circulantes, concentrações mais elevadas de ADP foram associados a menores concentrações de aminoácidos livres de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) e alanina, bem como a uma maior concentração de glutamina (Borges *et al.*, 2017).

É importante lembrar que aqui não estamos comparando amostras de pacientes diabéticos, indivíduos não diabéticos, ou seja, pacientes com diferentes condições clínicas. Todos os indivíduos incluídos no estudo atual têm TDM2 e os grupos são separados de acordo com o genótipo rs266729. Se considerarmos que o CC rs266729 protege contra diabetes, precisamos também analisar quais portadores desse genótipo também desenvolvem a patologia. Dadas essas considerações, não deve ser surpresa que também encontramos metabólitos que são considerados discriminadores desfavoráveis no grupo CC: isoleucina (BCAA), alanina e lactato.

Por outro lado, no grupo CC, a glutamina também é discriminante, o que contrasta com o glutamato, que parece discriminar no grupo GC + GG. Dados de meta-análises apontam que a glutamina está associada a um risco reduzido de TDM2, pois é inversamente proporcional ao aparecimento dessa doença (Guasch- Ferré *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020). O estudo de caso-controle conduzido por Guasch-Ferré, *et al.* (2020), avaliaram a associação da glicólise/metabólitos relacionados à gliconeogênese em uma intervenção de 1 ano com a dieta mediterrânea em pacientes com TDM2 e identificaram os metabólitos lactato e alanina associados à resistência à insulina. Seguindo a mesma linha, o metabólito alanina foi identificado como relacionado ao risco de TDM2 em um estudo caso-controle de indivíduos chineses e com impacto negativo no controle glicêmico em indivíduos com TDM1 quando em concentrações reduzidas (Lin *et al.*, 2020; Dutta *et al.*, 2016).

A fucose é a subunidade fundamental do polissacarídeo fucoidano e é um monossacarídeo (6-desoxi-L-galactose) comum a muitos glicanos e glicolipídios ligados a N e O. Em glicanos fucosilados, a fucose pode existir como uma modificação terminal ou servir como um ponto de ligação para a adição de outros açúcares (Dutta *et al.*, 2016). Em um estudo de caso-controle, os autores avaliaram metabólitos com características de serem biomarcadores para TDM2 e concluíram que a fucose, juntamente com o triptofano, foram

aumentados em amostras de pacientes diagnosticados com diabetes (Al-Aama *et al.*, 2019). No entanto, poucos estudos avaliaram a fucose como um metabólito protetor ou para aumentar o risco de progressão em microcomplicações de TDM2. No estudo atual, a fucose foi discriminada no genótipo CC e pode estar ligada a uma estrutura protetora.

No presente estudo observamos que o grupo GC + GG do SNP rs266729 foi associado à terapia com insulina, o alelo G em ambos os SNPs representa pior controle glicêmico. Além disso, a literatura mostra que casos avançados de DM apresentam maior disfunção nas células β do pâncreas, e o indivíduo pode ser dependente de insulina exógena para controlar seus parâmetros glicêmicos. A combinação de informações sobre polimorfismos e metabolômica, especialmente para β -glicose, ainda é escassa na literatura. Chu *et al.* (2022) analisaram amostras de 18 pacientes com edema macular diabético e 18 pacientes sem edema, utilizando espectrometria de massas, e observaram que a β -glicose estava aumentada no grupo que apresentou edema macular. Este também foi o grupo com presença de complicações crônicas.

Ao considerar as vias metabólicas, o ciclo da ureia discriminou o grupo GC + GG. A formação da ureia ocorre principalmente no ciclo da ureia no fígado, a arginina é convertida em ornitina ou citrulina, auxiliando a arginase na produção de moléculas de ureia ou óxido nítrico (Li *et al.*, 2019; Burrage *et al.*, 2019). Alterações no metabolismo de aminoácidos no ciclo da ureia podem ser correlacionadas com a resistência à insulina. Durante esse ciclo, várias enzimas responsáveis pela remoção de nitrogênio dos aminoácidos são reguladas pelos hormônios glucagon e insulina. Essas enzimas também desempenham um papel na síntese de óxido nítrico (Li *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2008). Investigações conduzidas por Pietzner *et al.* (2017) e Carracedo *et al.* (2011) indicaram que aminoácidos ou metabólitos ligados ao ciclo da ureia estavam associados a indicadores inflamatórios e estresse oxidativo. Na abordagem metabolômica, o grupo GC + GG foi discriminado pelo ciclo da ureia. Corroborando esses dados, o estudo caso-controle de Lu *et al.* (2016), avaliou o metaboloma de pacientes com TDM2 por 6 anos, e observou que a ureia juntamente com outros 5 metabólitos (prolina, glicerol, ácido aminomalônico, lisofosfatidilinositol e ácido 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanopropiônico), apresentam potencial para predizer diabetes tipo 2 em pacientes de risco.

Cao *et al.* (2019) teve como objetivo testar as associações entre TDM2 e metabólitos no ciclo da ureia, incluindo arginina, citrulina e ornitina, em uma amostra de

pacientes chineses com TDM2. A amostra incluiu 401 pacientes internados em um hospital na China com o início de TDM2 em 2 anos e 1.522 indivíduos saudáveis que compareceram ao exame físico anual. Os resultados mostraram que a arginina foi positivamente associada ao TDM2, no entanto, a associação entre citrulina e TDM2 não foi significativa. A ornitina, por outro lado, foi negativamente associada à patologia. No estudo atual, os metabólitos arginina e citrulina impactaram a via da ureia. A arginina discriminou o grupo GC + GG e a citrulina o grupo CC.

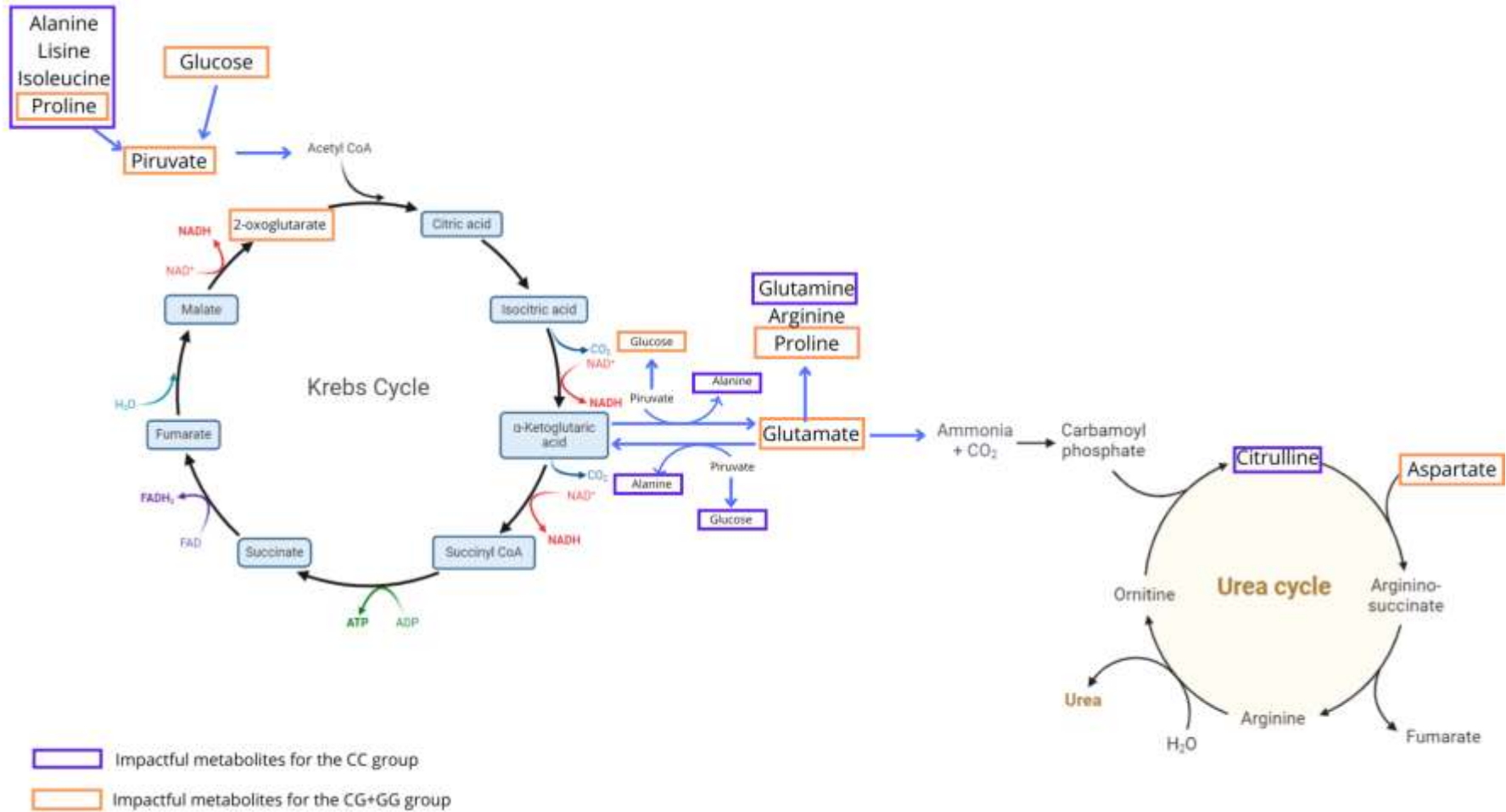
A Figura 5 apresenta os metabólitos capazes de discriminar os grupos genotípicos estudados, ilustrando o possível papel da relação glutamato/glutamina. Isso destaca o papel metabolicamente favorável das concentrações circulantes de glutamina, que pode fornecer energia para o ciclo de Krebs por meio da ativação da via GDH (glutamato desidrogenase), que promove a produção de alfa-cetoglutarato a partir do glutamato, independentemente da via glicolítica, e atua negativamente na expressão de genes promotores de inflamação (Petrus *et al.*, 2020). Por outro lado, as concentrações de glutamato, um aminoácido que pode ser considerado um intermediário no metabolismo dos BCAAs, tem sido associado a desfechos metabolicamente desfavoráveis, como obesidade e síndrome metabólica (Maltais-Payette *et al.*, 2019).

A metodologia utilizada apresenta uma limitação, pois não conseguimos determinar se os metabólitos discriminantes são destacados devido ao excesso ou concentrações menores em relação ao total das amostras. Isso sugere que não podemos afirmar se os portadores do genótipo CC rs266729 têm menor glutamato/glutamina do que os portadores do alelo G, mas os resultados aqui obtidos sugerem fortemente essa possibilidade. As seguintes considerações corroboram essa hipótese: 1) o fato de a glutamina discriminar o grupo CC enquanto o glutamato discrimina o CG + GG, sem necessariamente significar que há concentrações mais elevadas nesses genótipos; 2) a associação entre a presença do alelo G e pior controle glicêmico evidenciado pela terapia com insulina. Além disso, é importante ter em mente que no estudo atual todas as amostras são de pacientes com TDM2 e a comparação é baseada na formação de grupos genotípicos rs266729.

Ao identificar os metabólitos que impactam os diferentes genótipos, conseguimos perceber a influência nas vias envolvidas no catabolismo dos BCAAs e no direcionamento

do nitrogênio para o ciclo da ureia, com a mediação metabólica da relação glutamato/glutamina.

Fig. 5. Metabólitos que impactam cada via metabólica, de acordo com os genótipos rs266729.



Os resultados aqui apresentados dão suporte a uma importante linha de investigação que pode levar a mecanismos de identificação de pacientes ainda não afetados pelo TDM2, a fim de instigar o tratamento preventivo, com estratégias que previnam ou retardem o início da doença. O próximo passo seria adotar estratégias de estudo metabólico com análises quantitativas para confirmar a influência dos metabólitos aqui identificados.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a relação glutamina/glutamato provavelmente está relacionada à influência do rs266729 no risco de diabetes. No entanto, estudos adicionais que possam quantificar esses metabólitos nos grupos rs266729 são necessários para dar suporte a essa descoberta.

REFERENCIAS

1. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diagnóstico e Tratamento do Diabetes Tipo 2; 2020. Relatório global sobre diabetes. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2020.
2. PRIMO, E.; SCHMIDT, M. I.; ONG, K. L.; Oliveira, R.; OLIVEIRA, A.; ABUSHOUK, A. I. *et al.* Carga de diabetes e hiperglicemia em adultos nas Américas, 1990–2019: uma análise sistemática para o Estudo Global de Carga de Doenças 2019. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 10, n. 9, p. 655-667, 2022.
3. CHUNG, W. K.; ERION, K.; FLOREZ, J. C.; HATTERSLEY, A. T.; HIVERT, M. F.; LEE, C. G. *et al.* Medicina de precisão no diabetes: um relatório de consenso da American Diabetes Association (ADA) e da European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Cuidados com o diabetes**, v. 43, n. 7, p. 1617-1635, 2020.
4. SCHIBORN, C.; SCHULZE, M. B. Prognósticos de precisão para o desenvolvimento de complicações no diabetes. **Diabetologia**, v. 65, n. 11, p. 1867-1882, 2022.
5. ALJAFARY, M. A.; AL-SUHAIMI, E. A. Sistema adiponectina (hormônio de resgate): o elo perdido entre doenças metabólicas e cardiovasculares. **Farmacêutica**, v. 14, n. 7, p. 1430, 2022.
6. RUTKOWSKI, J. M.; WANG, Z. V.; PARQUE, A. S. D.; ZHANG, J.; ZHANG, D.; HU, M. C. *et al.* A adiponectina promove a recuperação funcional após a ablação de podócitos. **Jornal da Sociedade Americana de Nefrologia**, v. 24, n. 2, p. 268-282, 2013.
7. BERG, A. H.; PENTES, T. P.; DU, X.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P. E. A proteína secretada por adipócitos Acrp30 aumenta a ação da insulina hepática. **Medicina da natureza**, v. 7, n. 8, p. 947-953, 2001.
8. YE, R.; HOLANDA, W. L.; GORDILLO, R.; WANG, M.; WANG, Q. A.; SHAO, M. *et al.* A adiponectina é essencial para a homeostase lipídica e sobrevivência sob

- deficiência de insulina e promove a regeneração de células β . **Elife**, v. 3, p. e03851, 2014.
9. OKAMOTO, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; NISHIDA, M.; ARITA, Y.; KUMADA, M. *et al.* A adiponectina reduz a aterosclerose em camundongos com deficiência de apolipoproteína E. **Circulação**, v. 106, n. 22, p. 2767-2770, 2002.
 10. OSHIMA, K.; NAMPEI, A.; OLIVEIRA, M.; IWAKI, M.; FUKUHARA, A.; HASHIMOTO, J. *et al.* A adiponectina aumenta a massa óssea suprimindo os osteoclastos e ativando os osteoblastos. **Comunicações de Pesquisa Bioquímica e Biofísica**, v. 331, n. 2, p. 520-526, 2005.
 11. TAKEMURA, Y.; WALSH, K.; OUCHI, N. Adiponectina e respostas inflamatórias cardiovasculares. **Relatórios atuais de aterosclerose**, v. 9, n. 3, p. 238-243, 2007.
 12. PAJVANI, U. B.; OLIVEIRA, M.; PENTES, T. P.; OLIVEIRA, M. W.; DOEBBER, T.; BERGER, J. P. *et al.* A distribuição complexa, não a quantidade absoluta de adiponectina, correlaciona-se com a melhora mediada pela tiazolidinediona na sensibilidade à insulina. **Jornal de Química Biológica**, v. 279, n. 13, p. 12152-12162, 2004.
 13. HANLEY, A. J.; WAGENKNECHT, L. E.; NORRIS, J. M.; BERGMAN, R.; SILVA, A.; CHEN, Y. I. *et al.* Adiponectina e a incidência de diabetes tipo 2 em hispânicos e afro-americanos: o IRAS Family Study. **Diabetes Care**, v. 34, n. 10, p. 2231-2236, 2011.
 14. ALFAQIH, M. A. *et al.* O polimorfismo de nucleotídeo único no gene ADIPOQ modifica os níveis de adiponectina e o controle glicêmico em pacientes com diabetes mellitus tipo dois. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.
 15. ZHANG, D. *et al.* Um polimorfismo de nucleotídeo único altera a sequência do local de ligação SP1 na região promotora da adiponectina e está associado à nefropatia diabética entre pacientes diabéticos tipo 1 no Estudo de Genética dos Rins em Diabetes. **Jornal de Diabetes e suas Complicações**, v. 23, n. 4, p. 265-272, 2009.
 16. WANG, G.; WANG, Y.; Efeito da variante da adiponectina no perfil lipídico e nos níveis plasmáticos de adiponectina: uma revisão sistemática multicêntrica e meta-análise. **Terapêutica Cardiovascular**, v. 2022, p. 4395266, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/4395266>.
 17. SUN, P. *et al.* O polimorfismo de rs266729 no gene da adiponectina e diabetes mellitus tipo 2: uma meta-análise. **Medicina**, v. 96, n. 47, 2017.
 18. DE LUIS, D. A. *et al.* Relação de uma variante no gene da adiponectina (rs266729) com síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2 em indivíduos adultos obesos. **Revista Europeia de Ciências Médicas e Farmacológicas**, v. 24, n. 20, 2020.
 19. WU, L.; WANG, C. C. Variantes genéticas em regiões promotoras associadas ao diabetes mellitus tipo 2: uma meta-análise em larga escala e análise de subgrupos. **Jornal de Bioquímica Celular**, v. 120, n. 8, p. 13012–13025, 2019.
 20. TRUONG, S. *et al.* Associação de polimorfismos de nucleotídeo único ADIPOQ com os dois fenótipos clínicos diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica em uma população vietnamita Kinh. **Diabetes, Síndrome Metabólica e Obesidade: Alvos e Terapia**, p. 307–319, 2022.
 21. CAUCHI, S. *et al.* A suscetibilidade genética ao diabetes tipo 2 pode ser modulada pelo estado de obesidade: implicações para estudos de associação. **BMC Medical Genetics**, v. 9, p. 1–9, 2008.

22. SMETNEV, S. *et al.* Associações de SNPs do gene ADIPOQ com níveis séricos de adiponectina, angina instável e doença arterial coronariana. **Biomoléculas**, v. 9, n. 10, p. 537, 2019.
23. YUN, J. H. *et al.* Perfis metabólicos associados à retinopatia diabética em pacientes com diabetes tipo 2. **PLoS One**, v. 15, n. 10, e0241365, 2020.
24. FILLA, L. A.; EDWARDS, J. L. Metabólica em complicações diabéticas. **BioSystems**, v. 12, n. 4, p. 1090–1105, 2016.
25. PRIOR, S. L. *et al.* Associação entre a variante do gene rs266729 do promotor da adiponectina e o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus. **Jornal Europeu do Coração**, v. 30, n. 10, p. 1263–1269, 2009.
26. DINIZ, T. G. *et al.* Análise metabólica dos estágios de retinopatia e amputação no diabetes tipo 2. **Nutrição Clínica ESPEN**, v. 61, p. 158–167, 2024.
27. JOOSTEN, M. M. *et al.* Adiponectina total e risco de doença arterial periférica sintomática dos membros inferiores em homens. **Arteriosclerose, Trombose e Biologia Vascular**, v. 33, n. 5, p. 1092–1097, 2013.
28. CHEN, H. H. *et al.* Doença renal crônica: interação de polimorfismos do gene da adiponectina e diabetes. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 24, n. 9, p. 8128, 2023.
29. COLTELL, O. *et al.* Adiponectina circulante e sua associação com características metabólicas e diabetes tipo 2: interações gene-dieta com foco em variantes genéticas selecionadas e no nível de todo o genoma em indivíduos mediterrâneos de alto risco cardiovascular. **Nutrientes**, v. 13, n. 2, p. 541, 2021.
30. WANG, Y. *et al.* Níveis plasmáticos de adiponectina e risco de diabetes tipo 2: um estudo de caso-controle aninhado em uma população chinesa e uma meta-análise atualizada. **Relatórios Científicos**, v. 8, n. 1, p. 406, 2018.
31. WILLIAMS, P. T. A expressividade quantílica-dependente das concentrações plasmáticas de adiponectina pode explicar sua herdabilidade específica do sexo, interações gene-ambiente e resposta específica do genótipo à lipemia pós-prandial. **PeerJ**, v. 8, e10099, 2020.
32. LEHN-STEFAN, A. *et al.* glutamato circulante elevado está associado à aterosclerose subclínica, independentemente dos marcadores de risco estabelecidos: um estudo transversal. **O Jornal de Endocrinologia Clínica e Metabolismo**, v. 106, n. 2, p. e982–e989, 2021.
33. PORCU, E. *et al.* Triangulando evidências de estudos de randomização longitudinal e mendeliana de biomarcadores metabólicos para diabetes tipo 2. **Relatórios Científicos**, v. 11, n. 1, p. 6197, 2021.
34. RHEE, S. Y. *et al.* A glutamina plasmática e o ácido glutâmico são potenciais biomarcadores para prever a retinopatia diabética. **Metabólica**, v. 14, p. 1–10, 2018.
35. NAVARRO, S. L. *et al.* Os perfis metabólicos plasmáticos sugerem efeitos benéficos de um padrão alimentar de baixa carga glicêmica sobre a inflamação e o metabolismo energético. **O Jornal Americano de Nutrição Clínica**, v. 110, n. 4, p. 984–992, 2019.
36. HASANI, M. *et al.* Efeito da suplementação de glutamina sobre fatores de risco cardiometabólicos e marcadores inflamatórios: uma revisão sistemática e meta-análise. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 21, p. 1–21, 2021.
37. GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Metabólica em pré-diabetes e diabetes: uma revisão sistemática e meta-análise. **Diabetes Care**, v. 39, n. 5, p. 833–846, 2016.

38. VANWEERT, F.; SCHRAUWEN, P.; PHIELIX, E. Papel do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada na patogênese da obesidade e distúrbios metabólicos relacionados ao diabetes tipo 2. **Nutrição e Diabetes**, v. 12, n. 1, p. 35, 2022.
39. BORGES, M. C. *et al.* Perfil metabólico dos níveis de adiponectina em adultos: análise de randomização mendeliana. **Circulação: Genética Cardiovascular**, v. 10, n. 6, e001837, 2017.
40. SUN, Y. *et al.* Assinaturas metabolômicas no diabetes tipo 2: uma revisão sistemática e análise integrativa. **O Jornal de Endocrinologia Clínica e Metabolismo**, v. 105, n. 4, p. 1000–1008, 2020.
41. GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Metabólitos relacionados à glicólise / gliconeogênese e ao ciclo do ácido tricarboxílico, dieta mediterrânea e diabetes tipo 2. **O Jornal Americano de Nutrição Clínica**, v. 111, n. 4, p. 835–844, 2020.
42. LIN, W. *et al.* Análises metabolômicas e de rede de correlação de biomarcadores centrais no diabetes tipo 2. **Aminoácidos**, v. 52, p. 1307–1317, 2020.
43. DUTTA, T. *et al.* Impacto do controle glicêmico ruim e bom a longo prazo nas alterações metabolômicas em pessoas diabéticas tipo 1. **O Jornal de Endocrinologia Clínica e Metabolismo**, v. 101, n. 3, p. 1023–1033, 2016.
44. MOLONEY, D. J.; HALTIWANGER, R. S. A via de glicosilação de fucose ligada a O: identificação e caracterização de uma uridina difosfoglicose: fucose- β 1, atividade da 3-glicosiltransferase de células de ovário de hamster chinês. **Glicobiologia**, v. 9, n. 7, p. 679–687, 1999.
45. AL-AAMA, J. Y. *et al.* Detecção de metabólitos secundários como biomarcadores para o diagnóstico precoce e prevenção do diabetes tipo 2. **Diabetes, Síndrome Metabólica e Obesidade: Alvos e Terapia**, p. 2675–2684, 2019.
46. CHU, K. O. *et al.* Análise metabolômica não direcionada do humor aquoso no edema macular diabético. **Visão Molecular**, v. 28, pág. 230, 2022.
47. LI, L. O. *et al.* Resistência precoce à insulina hepática em camundongos: uma análise metabolômica. **Endocrinologia Molecular**, v. 24, n. 3, p. 657–666, 2010.
48. BURRAGE, L. C. *et al.* O perfil metabolômico não direcionado revela múltiplas perturbações de vias e novos biomarcadores clínicos em distúrbios do ciclo da ureia. **Genética em Medicina**, v. 21, n. 9, p. 1977–1986, 2019.
49. ROMERO, M. J. *et al.* A disfunção vascular coronariana induzida por diabetes envolve aumento da atividade da arginase. **Pesquisa de Circulação**, v. 102, n. 1, p. 95–102, 2008.
50. PIETZNER, M. *et al.* Perfil metabólico abrangente da inflamação crônica de baixo grau entre indivíduos geralmente saudáveis. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.
51. CARRACEDO, J. *et al.* A lipoproteína carbamilada de baixa densidade induz estresse oxidativo e senescência acelerada em células progenitoras endoteliais humanas. **O Jornal FASEB**, v. 25, n. 4, p. 1314–1322, 2011.
52. LU, Y. *et al.* Assinaturas metabólicas e risco de diabetes tipo 2 em uma população chinesa: um estudo metabolômico não direcionado usando LC-MS e GC-MS. **Diabetologia**, v. 59, p. 2349–2359, 2016.
53. CAO, Y. F. *et al.* Níveis plasmáticos de aminoácidos relacionados ao ciclo da ureia e risco de diabetes mellitus tipo 2 em adultos chineses. **Fronteiras em Endocrinologia**, v. 10, p. 50, 2019.
54. PETRUS, P. *et al.* A glutamina liga a obesidade à inflamação no tecido adiposo branco humano. **Metabolismo Celular**, v. 31, n. 2, p. 375–390, 2020.

55. MALTAIS-PAYETTE, I. *et al.* Nível de glutamato circulante como um potencial biomarcador para obesidade abdominal e risco metabólico. **Nutrição, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares**, v. 29, n. 12, p. 1353–1360, 2019.

ANEXOS

