



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL**



**Adiponectina:**

**Relação com a distribuição de gordura corporal e  
influência sobre o risco de doenças cardiovasculares**

**TESE DE DOUTORADO**

**Maria Carolina Borges**

**Pelotas**

**2016**

**MARIA CAROLINA BORGES**

**Adiponectina:**

**Relação com a distribuição de gordura corporal e influência sobre o risco  
de doenças cardiovasculares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Epidemiologia

**Orientador: Prof. Alúcio JD Barros**

**Pelotas**

**2016**

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B732a Borges, Maria Carolina

Adiponectina: relação com a distribuição de gordura corporal e influência sobre o risco de doenças cardiovasculares / Maria Carolina Borges ; Aluísio Jardim Dornellas de Barros, orientador. — Pelotas, 2016.

270 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Epidemiologia. 2. Obesidade. 3. Doenças cardiovasculares. 4. Randomização mendeliana. 5. Adiponectina. I. Barros, Aluísio Jardim Dornellas de, orient. II. Título.

CDD : 614.4

**MARIA CAROLINA BORGES**

**Adiponectina:**

**Relação com a distribuição de gordura corporal e influência sobre o risco  
de doenças cardiovasculares**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Aluísio JD Barros (presidente)**

Universidade Federal de Pelotas

**Prof. Dr. Alexandre Pereira (examinador)**

Universidade de São Paulo

**Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero (examinador)**

Universidade de São Paulo

**Prof. Dra. Luciana Tovo Rodrigues (examinadora)**

Universidade Federal de Pelotas

*À minha família.*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Aluísio de Barros pela condução sábia da orientação, pela confiança e pela grande oportunidade. Agradeço de coração por iluminar o caminho.

Aos colaboradores formais e informais, Aroon Hingorani, Debbie Lawlor, César Oliveira, Juan Pablo Casas, Bernardo L Horta e Ken Ong, pelas inestimáveis contribuições ao trabalho e pelas oportunidades que me proporcionaram.

Ao meu grande companheiro, Thiago de Sá, com que divido cada pedacinho da jornada.

À minha mãe, Walderez, e ao meu irmão, João, pelo amor incondicional apesar da minha ausência.

À querida família do coração, Flávia, Cristina e Itamar, pelo amor e pela companhia.

Aos amigos Romina, Maria Clara, Ana Luiza, Bárbara, Leidy, Juliana, Mitzi, Priscila, Christian, Gabriela, Fábio, Paola, Paula, Giovanny e Suzana, que encontrei em Pelotas e que espero reencontrar ao longo de toda a minha vida.

Aos amigos de longa data, Natália, Leonardo, Renata, Verônica, Bruna, Luciana, Leandro, Juliana, Marina, Bia, Mariana, pelo apoio.

Aos amigos e colegas Vicky, Nish, Catherine, Penny, Felix, Ghaz, Floriaan, Victoria, Nathalie, Kenia, Manuela, Maki e John White, que me receberam de braços abertos em Londres.

À Deise e à Isabel pela dedicação incansável na dosagem de adiponectina.

Aos professores do Centro de Pesquisas Epidemiológicas por se dedicarem à minha formação e a de meus colegas.

A todos os colegas de doutorado, com quem dividi momentos muito significativos nos últimos anos.

À equipe da coorte de 1982, em especial à Natália e Janaína, pelo suporte na utilização dos dados do estudo.

À equipe da coorte de 2015, em especial à Romina, Marília, Ludmila, Carol, Mariana e Dona Iara, pelo trabalho coletivo.

Aos participantes das coortes e de todas as pesquisas científicas, sem os quais nada disso seria possível.

Aos funcionários do CPE, em particular à Fernandinha, Ana, Dani, Pablo, Angélica, Juliana, Natália, Lenir, Sílvia, Tiago, Mateus, Irani e Luis Fernando, pela dedicação e pelo trabalho.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro e institucional no país (CNPq: 144749/2014-9 e 163291/2015-2) e no exterior (Programa Ciências sem Fronteiras: 201498/2014-6).

## Resumo

**BORGES, Maria Carolina. Adiponectina: relação com a distribuição de gordura corporal e influência sobre o risco de doenças cardiovasculares.** 2016. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

A adiponectina, proteína produzida por adipócitos maduros, tem sua concentração paradoxalmente reduzida em indivíduos obesos. Estudos em animais indicam que essa proteína aumenta a sensibilidade à insulina e inibe o processo inflamatório e aterosclerótico. Contudo, o efeito cardioprotetor da adiponectina ainda não foi demonstrado de forma clara em seres humanos. Investigar os fatores que modulam a concentração de adiponectina e o papel dessa proteína na etiologia das doenças cardiovasculares em seres humanos é de grande interesse para a melhor compreensão da relação da obesidade com morbidades crônicas e para fins terapêuticos. Esta tese teve como objetivo avaliar a associação da distribuição de gordura corporal com a concentração sanguínea de adiponectina e o efeito da proteína sobre fatores de risco e sobre a incidência de doenças cardiovasculares em adultos. Três artigos compõem a tese. No primeiro artigo, investigou-se a relação entre distribuição de gordura corporal e adiponectinemia. Para isso, foram utilizados dados da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982 e meta-dados de dois consórcios genéticos internacionais (*GIANT* e *ADIPOGen*). Os resultados indicam que a redução da concentração de adiponectina em indivíduos obesos ocorre essencialmente pela expansão do tecido adiposo central e não pelo acúmulo de gordura gluteofemoral. No segundo artigo, explorou-se o efeito da concentração circulante de adiponectina sobre o perfil metabólico de mais de 10.000 indivíduos usando a técnica de aleatorização mendeliana. Esse estudo incluiu dados de participantes da coorte de Pelotas de 1982 e de outros quatro estudos conduzidos no Reino Unido (*British Women Heart and Health Study*, *Whitehall-II Study*, *The Caerphilly Prospective Study* e *The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening nested case-control study*). Os resultados desse artigo sugerem que a adiponectina não promove diretamente um perfil metabólico cardioprotetor e que resultados de estudos observacionais convencionais provavelmente estão sujeitos ao efeito de confundimento por fatores como obesidade e resistência à insulina. No terceiro artigo, avaliamos o envolvimento da adiponectina na etiologia de doenças cardiovasculares, especificamente de doença arterial coronariana, usando a técnica de aleatorização mendeliana com meta-dados de seis consórcios genéticos (*CARDIoGRAM*, *CARDIoGRAMplusC4D*, *ADIPOGen*, *GIANT*, *MAGIC* e *GLGC*) contendo informação de dezenas de milhares de indivíduos. Os resultados desse artigo não indicam que maiores concentrações de adiponectina tenham o potencial de reduzir o risco de doenças cardiovasculares na população. Em resumo, os achados desta tese apontam que a produção de adiponectina pelo tecido adiposo é modulada de forma diferente dependendo da localização desse tecido e que a concentração sanguínea de adiponectina não parece ter efeito protetor contra doenças cardiovasculares em seres humanos.



Palavras-chave: Adiponectina; Gordura abdominal; Gordura subcutânea; Obesidade; Doenças cardiovasculares; Randomização mendeliana; Epidemiologia.

## Abstract

BORGES, Maria Carolina. **Adiponectin: relation with body fat distribution and influence on cardiovascular disease risk**. 2016. Thesis (Doctoral Thesis). Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas (UFPel).

Adiponectin, a protein produced by mature adipocytes, has its concentration paradoxically reduced among obese individuals. Animal studies indicate that this protein has insulin-sensitizing, anti-inflammatory, and anti-atherogenic properties. However, the cardioprotective effect of adiponectin has not been clearly demonstrated in humans. To investigate the factors that modulate adiponectin concentration and the role of this protein in the etiology of cardiovascular diseases in humans is of great interest for a better understanding of the relationship between obesity and chronic diseases and for therapeutic purposes. This thesis aimed to evaluate the association of body fat distribution with blood adiponectin concentration and the effect of this protein on risk factors and on the incidence of cardiovascular disease in adults. The thesis includes three papers. In the first paper, we investigated the relationship between body fat distribution and adiponectinemia. For this, data from the 1982 Pelotas Birth Cohort and meta-data from two international genetic consortia (GIANT and ADIPOGen) were used. Our results indicate that adiponectin concentration decreases in obese individuals due to the expansion of central adipose tissue and not due to gluteofemoral fat accumulation. In the second paper, we explored the effect of circulating adiponectin concentration on the metabolic profile of over 10,000 individuals using the Mendelian randomization technique. This study included data from participants of 1982 Pelotas Birth Cohort, as well as participants from four other studies conducted in the UK (British Women Heart and Health Study, Whitehall II Study, The Caerphilly Prospective Study and The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening nested case-control study). The results suggest that adiponectin does not directly promote a cardioprotective metabolic profile and that findings from conventional observational studies are likely to be explained by confounding due to factors such as obesity and insulin resistance. In the third paper, we evaluated the involvement of adiponectin in the etiology of cardiovascular disease, specifically coronary artery disease, using the Mendelian randomization technique with meta-data from six genetic consortia (CARDIoGRAM, CARDIoGRAMplusC4D, ADIPOGen, GIANT, MAGIC and GLGC) containing information from tens of thousands individuals. The results do not indicate that higher concentrations of adiponectin have the potential to reduce the risk of cardiovascular disease. In summary, findings from this thesis suggest that adiponectin production by fat tissue is modulated differently depending on tissue location and that blood adiponectin concentration does not appear to have a protective effect against cardiovascular disease in humans.

Keywords: Adiponectin; Adipokines; Abdominal fat; Subcutaneous fat; Obesity; Cardiovascular disease; Mendelian randomization; Epidemiology.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>SEÇÃO I - PROJETO DE PESQUISA .....</b>	<b>13</b>
RESUMO .....	15
ARTIGOS PLANEJADOS .....	16
DEFINIÇÃO DE TERMOS E ABREVIATURAS.....	17
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. MARCO TEÓRICO .....	21
2.1. Adiponectina: características, expressão gênica e biossíntese .....	21
2.2. Determinantes da concentração sanguínea de adiponectina .....	27
2.3. Mecanismos de ação da adiponectina: evidências de estudos <i>in vitro</i> e em animais .....	29
2.4 Adiponectina, alterações metabólicas e doenças cardiovasculares: evidências de estudos epidemiológicos .....	31
2.5. Aleatorização mendeliana: definição, potencialidades e limitações.....	33
2.6. Adiponectina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2: evidências dos estudos genéticos.....	37
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	42
3.1. Adiponectina e doenças cardiovasculares: evidências dos estudos genéticos..	42
4. JUSTIFICATIVA .....	50
5. OBJETIVOS.....	52
5.1 Objetivos Específicos.....	52
6. HIPÓTESES .....	53
7. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
7.1. Metodologia dos estudos 1 e 2.....	54
7.1.1. Fonte dos dados.....	54
7.1.2. Metodologia da coorte de Pelotas de 1982.....	54
7.1.3. Logística do acompanhamento de 2012.....	56

7.1.4. Instrumentos.....	57
7.1.5. Aspectos éticos.....	58
7.1.6. Plano de análise do estudo 1 .....	59
7.1.7. Plano de análise do estudo 2 .....	63
7.2. Metodologia do estudo 3 .....	67
7.2.1. Critérios de elegibilidade.....	67
7.2.2. Fontes de informação .....	67
7.2.3. Estratégia de busca .....	68
7.2.4. Seleção dos estudos.....	69
7.2.5. Coleta de dados.....	69
7.2.6. Plano de análise .....	70
8. CRONOGRAMA.....	72
9. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS .....	72
10. FINANCIAMENTO .....	72
REFERÊNCIAS .....	74
<b>SEÇÃO II - MODIFICAÇÕES NO PROJETO .....</b>	<b>104</b>
<b>SEÇÃO III - TRABALHO DE CAMPO .....</b>	<b>108</b>
<b>SEÇÃO IV - DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ADIPONECTINA</b> .....	<b>110</b>
<b>SEÇÃO V - ARTIGO 1: Obesity-induced hypoadiponectinemia: the opposite</b> <b>influences of central and peripheral fat compartments .....</b>	<b>113</b>
<b>SEÇÃO VI - ARTIGO 2: Metabolic signature of adiponectin levels in adults:</b> <b>observational and Mendelian randomization analysis .....</b>	<b>165</b>
<b>SEÇÃO VII - ARTIGO 3: The role of adiponectin in coronary heart disease: a</b> <b>Mendelian randomization study .....</b>	<b>196</b>
<b>SEÇÃO VIII - COMUNICADO À IMPRENSA.....</b>	<b>242</b>
APÊNDICE A – RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO DO ACOMPANHAMENTO PRÉ-NATAL DA COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2015.....	245
APÊNDICE B – PROTOCOLO DE DOSAGEM DA ADIPONECTINA.....	265

## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi elaborada segundo os moldes regimentais adotados pelo Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGE) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Oito seções compõem este volume: (i) o projeto de pesquisa defendido em setembro de 2014; (ii) uma seção sobre modificações realizadas no projeto após o exame de qualificação; (iii) a descrição da experiência de trabalho de campo contemplando as ações de planejamento e execução da coleta de dados; (iv) o protocolo de dosagem e de controle de qualidade da medida da concentração sanguínea de adiponectina, principal biomarcador de interesse do projeto; (v-vii) a sequência dos três artigos produzidos ao longo do período de doutoramento; (viii) além de um comunicado à imprensa sintetizando os principais achados do estudo.

Com relação aos três artigos apresentados, o primeiro, intitulado “*Obesity-induced hypoadiponectinemia: the opposite influences of central and peripheral fat compartments*”, está em revisão no periódico *International Journal of Epidemiology* (**seção v**). O segundo artigo (“*Metabolic signature of adiponectin levels in adults: observational and Mendelian randomization analysis*”) será submetido ao *Journal of the American College of Cardiology* (**seção vi**). O terceiro manuscrito, intitulado “*The Role of Adiponectin in Coronary Heart Disease Risk: A Mendelian Randomization Study*”, foi publicado pelo periódico *Circulation Research* (**seção vii**). Os artigos foram formatados de acordo com as normas de cada revista.

***SEÇÃO I - PROJETO DE  
PESQUISA***

---



**Universidade Federal de Pelotas**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Medicina Social**



**Adiponectina:**

**Associação com a distribuição de gordura corporal e influência sobre o  
risco cardiovascular**

**Maria Carolina Borges**

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito para qualificação de doutorado.

**Orientador: Prof. Dr. Aluísio J. D. Barros**

**Pelotas**

**2014**

## RESUMO

A adiponectina, proteína produzida por adipócitos maduros, tem sua concentração paradoxalmente reduzida em indivíduos obesos. Investigar os fatores que modulam a concentração de adiponectina e o papel dessa proteína na etiologia das doenças cardiovasculares é de grande interesse para a melhor compreensão da relação da obesidade com morbidades crônicas e para fins terapêuticos. O presente projeto tem como objetivo avaliar a associação da distribuição de gordura corporal com a concentração sanguínea de adiponectina e o efeito da proteína sobre fatores de risco e sobre a incidência de doenças cardiovasculares em adultos. Serão utilizados dados da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982 (acompanhamento dos 30 anos). Em um primeiro momento, será avaliada a associação independente de diferentes depósitos de gordura corporal (abdominal visceral, abdominal subcutâneo e gluteofemoral), bem como do padrão de distribuição de gordura, com a concentração sanguínea de adiponectina. Em seguida, variantes genéticas no gene que codifica para a adiponectina (*ADIPOQ*) serão utilizadas como *proxy* da concentração sanguínea da proteína (abordagem conhecida como aleatorização mendeliana) com o objetivo de distinguir se a adiponectina exerce algum efeito sobre fatores de risco cardiovascular ou se é apenas um marcador de risco. A relação entre exposição (adiponectina) e desfecho (fatores de risco cardiovascular) será avaliada pela análise de variáveis instrumentais. Por fim, revisão sistemática com metanálise será realizada para avaliar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *ADIPOQ* e a incidência de doenças cardiovasculares.



## ARTIGOS PLANEJADOS

**Artigo 1:** Relação da concentração sanguínea de adiponectina com diferentes depósitos adiposos (abdominal visceral, abdominal subcutâneo e gluteofemoral) e com o padrão de distribuição de gordura corporal em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982.

**Artigo 2:** Efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) (perfil lipídico, pressão arterial, hemoglobina glicada e proteína C reativa) em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982.

**Artigo 3:** Efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre a incidência e sobre a mortalidade por DCV em adultos (revisão sistemática com metanálise).

## DEFINIÇÃO DE TERMOS E ABREVIATURAS

ACP: análise de componentes principais

Acrp-30: *adipocyte complement-related protein of 30kDa*

*ADIPOQ*: gene que codifica para adiponectina

AdipoR: receptor de adiponectina

AMPK: *AMP activated protein kinase* ou proteína quinase ativada por AMP

*Apm1*: *adipose most abundant gene transcript*

AR: artrite reumatoide

AS: depósito abdominal subcutâneo

AV: depósito abdominal visceral

AVC: acidente vascular cerebral

AVCi: acidente vascular cerebral isquêmico

*C/EBP*: *CAAT/enhancer binding protein*

CML: célula muscular lisa

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CV: cardiovascular

DAC: doença arterial coronariana

DAG: *directed acyclic graph* ou gráfico acíclico direcionado

DAP: doença arterial periférica

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

DCV: doenças cardiovasculares

DL: desequilíbrio de ligação

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DRC: doença renal crônica

DXA: absorciometria de dupla emissão de raios X

*GBP28*: *gelatin-binding protein of 28kDa*

GWAS: *Genomewide Association Studies*

HbA1c: hemoglobina glicada

HMW: *high molecular weight adiponectin* ou adiponectina de alto peso molecular

IAM: infarto agudo do miocárdio

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

FoxO1: *forkhead box protein O1*

LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade

NDDG: *National Diabetes Data Group*

NF- $\kappa$ B: fator nuclear- $\kappa$ B

OMS: Organização Mundial da Saúde

PA: pressão arterial

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PRONEX: Programa Nacional de Núcleos de Excelência

QFA: questionário de frequência alimentar

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

SGF: depósito adiposo subcutâneo gluteofemoral

SM: síndrome metabólica

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

SREBP: *sterol regulatory binding protein*

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

UTR: *untranslated region*

VI: variável instrumental

VOP: velocidade da onda de pulso

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é amplamente reconhecida como fator de risco para diversas morbidades crônicas, como doenças cardiovasculares (DCV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), alguns tipos de câncer, asma, apneia do sono, doenças osteoarticulares, dentre outras (WHO, 2011). No período de 1980 a 2013, a prevalência mundial de excesso de peso, definido como índice de massa corporal (IMC) superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, aumentou em oito pontos percentuais, atingindo 37% dos homens e 38% das mulheres (NG *et al.*, 2014).

Apesar de o IMC ser fortemente associado com o risco de desenvolver DCV, diferentes compartimentos de gordura corporal contribuem de forma diferente para o risco de adoecer. Nesse contexto, há evidências de que o acúmulo de gordura visceral está associado à resistência à insulina, síndrome metabólica (SM) e desfechos cardiovasculares, o que não é observado para o tecido adiposo subcutâneo (TCHERNOF e DESPRES, 2013).

O tecido adiposo branco é tradicionalmente reconhecido por oferecer proteção mecânica aos órgãos, atuar como isolante térmico e representar o maior reservatório de energia do organismo. Contudo, a partir dos anos 90, surgiram estudos demonstrando que esse tecido tem a capacidade de secretar uma ampla diversidade de proteínas com importantes efeitos biológicos, denominadas adipocinas. Essas evidências representaram uma grande mudança de paradigma, em que o tecido adiposo passou a ser visto como um órgão dinâmico envolvido em numerosos processos metabólicos e fisiológicos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1994; VAN GAAL, 2010).

A exemplo disso, no ano de 1993, observou-se que roedores obesos, como camundongos *ob/ob*<sup>1</sup>, *db/db*<sup>2</sup> e e ratos *fa/fa*<sup>3</sup>, apresentavam aumento da expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  no tecido adiposo e que esse fato estava relacionado à redução da captação periférica de glicose (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Em seguida, Zhang et al (1994) identificaram o hormônio leptina, produto do gene *ob* do camundongo obeso (*ob/ob*), reconhecido por sua importância na regulação da ingestão alimentar e do gasto

---

<sup>1</sup> A mutação *ob* (do Inglês “obese”) prejudica a expressão do gene que codifica a proteína leptina.

<sup>2</sup> A mutação *db* (do Inglês “diabetes”) resulta em deficiência da atividade do receptor de leptina.

<sup>3</sup> A mutação *fa* (do Inglês “fatty”) resulta em redução da afinidade do receptor de leptina à proteína.

energético (ZHANG *et al.*, 1994; VAN GAAL, 2010). Essas descobertas pioneiras fomentaram estudos posteriores, em que diversos outros produtos secretados pelo tecido adiposo branco foram descritos, como adiponectina, interleucina (IL)-6, prostaglandinas, lipase de lipoproteínas, angiotensinogênio (VAN GAAL, 2010).

A adiponectina, foco principal do presente projeto, é majoritariamente secretada por adipócitos maduros. No entanto, ao contrário do que se observa para os demais produtos secretados pelo tecido adiposo, a concentração de adiponectina diminui em indivíduos obesos (KOERNER *et al.*, 2005). Diversas alterações que ocorrem no microambiente dos adipócitos na obesidade são responsáveis por inibir a expressão e/ou secreção de adiponectina, como o aumento da expressão de IL-6 (FASSHAUER *et al.*, 2003), TNF- $\alpha$  (FASSHAUER *et al.*, 2002; FASSHAUER *et al.*, 2003), a micro-hipóxia (HOSOGAI *et al.*, 2007) e o estresse do retículo endoplasmático (ZHOU *et al.*, 2010).

Essa redução da produção de adiponectina pode ser um dos fatores que explica o desenvolvimento de morbidades associadas à obesidade, uma vez que essa proteína está envolvida em diversos processos biológicos de importância crítica para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como DM2 e DCV. Nesse sentido, há um amplo corpo de evidências de estudos *in vitro* e em animais sobre a atuação da adiponectina na sensibilidade à insulina (COMBS *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2007), na resposta inflamatória (OUCHI *et al.*, 1999; OUCHI *et al.*, 2001) e na aterogênese (OUCHI *et al.*, 2001; OKAMOTO *et al.*, 2002).

## 2. MARCO TEÓRICO

O marco teórico foi construído de modo a traçar um panorama do conhecimento atual sobre a adiponectina, desde os estudos moleculares às evidências epidemiológicas. Por meio de revisões não sistemáticas da literatura, são discutidos quatro tópicos principais: caracterização da adiponectina e de sua expressão gênica, determinantes da adiponectinemia, mecanismos de ação da proteína e evidências epidemiológicas sobre a associação entre adiponectina e risco cardiovascular. Por fim, é apresentado um tópico sobre aleatorização mendeliana com a finalidade de contextualizar essa técnica e pontuar sua importância para elucidar a relação causal da concentração sanguínea de adiponectina com o risco cardiovascular em seres humanos.

### 2.1. Adiponectina: características, expressão gênica e biossíntese

A descoberta da adiponectina ocorreu há cerca de duas décadas por quatro grupos independentes, sendo também denominada como Acrp-30 (*adipocyte complement-related protein of 30kDa*) (SCHERER *et al.*, 1995), ADIPOQ (HU *et al.*, 1996), Apm1 (*Adipose Most Abundant Gene Transcript 1*) (MAEDA *et al.*, 1996) e GBP28 (*gelatin-binding protein of 28kDa*) (NAKANO *et al.*, 1996).

A adiponectina é composta por 244 aminoácidos (30 kDa) e dividida em três domínios: domínio colágeno amino-terminal, uma região variável e um domínio globular carboxi-terminal, o qual apresenta similaridades com o fator C1q do sistema complemento e com o TNF- $\alpha$  (SCHERER *et al.*, 1995; HU *et al.*, 1996). A adiponectina pode apresentar-se como proteína íntegra ou como fragmento contendo apenas o domínio globular, cuja importância fisiológica ainda é questionável, tendo em vista que a vasta maioria da adiponectina circulante é composta por complexos da proteína íntegra (TURER e SCHERER, 2012a).

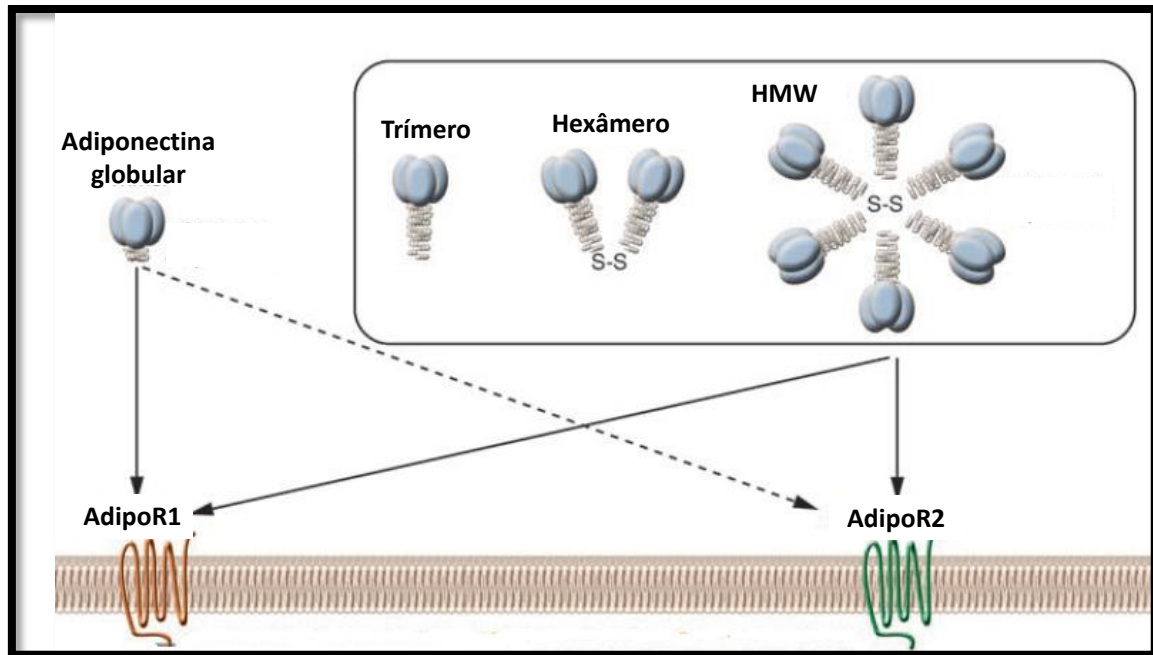
Os trímeros formam a unidade básica da proteína, que se associam para formar hexâmeros (adiponectina de baixo peso molecular) e multímeros

(adiponectina de alto peso molecular) (**Figura 1**). Há evidências de que a atividade biológica da adiponectina varia de acordo com seu peso molecular, tendo a adiponectina de alto peso molecular maior efeito biológico (PAJVANI *et al.*, 2004).

Os adipócitos maduros são o principal sítio de produção de adiponectina, apesar de já ter sido descrito que cardiomiócitos (PINEIRO *et al.*, 2005) e miócitos (DELAIGLE *et al.*, 2004) humanos também são capazes de expressar a proteína. A concentração de adiponectina no plasma varia de 0,5 a 30 µg/mL e representa 0,01% da concentração total de proteínas plasmáticas. Vale também ressaltar que a adiponectina apresenta propriedades interessantes enquanto biomarcador em estudos epidemiológicos, uma vez que sofre pouca influência do ritmo circadiano ou do estado pós-prandial (MERL *et al.*, 2005; SHEA *et al.*, 2005; YE e SCHERER, 2013).

A ação da adiponectina nas células é mediada, principalmente, pelos receptores de adiponectina 1 e 2, AdipoR1 e AdipoR2, respectivamente. O AdipoR1 e o AdipoR2 contêm sete domínios transmembrana e têm sua estrutura bastante conservada entre as espécies. Apesar de ambos serem expressos de forma ubíqua, o AdipoR1 é abundantemente expresso no músculo esquelético, enquanto o AdipoR2 é predominantemente expresso no fígado (YAMAUCHI *et al.*, 2003). A ligação da adiponectina com o AdipoR1 ativa principalmente a via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK - *AMP activated protein kinase*), ao passo que a ligação com o AdipoR2 parece estar mais relacionada à ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- $\alpha$  (YAMAUCHI *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2011).

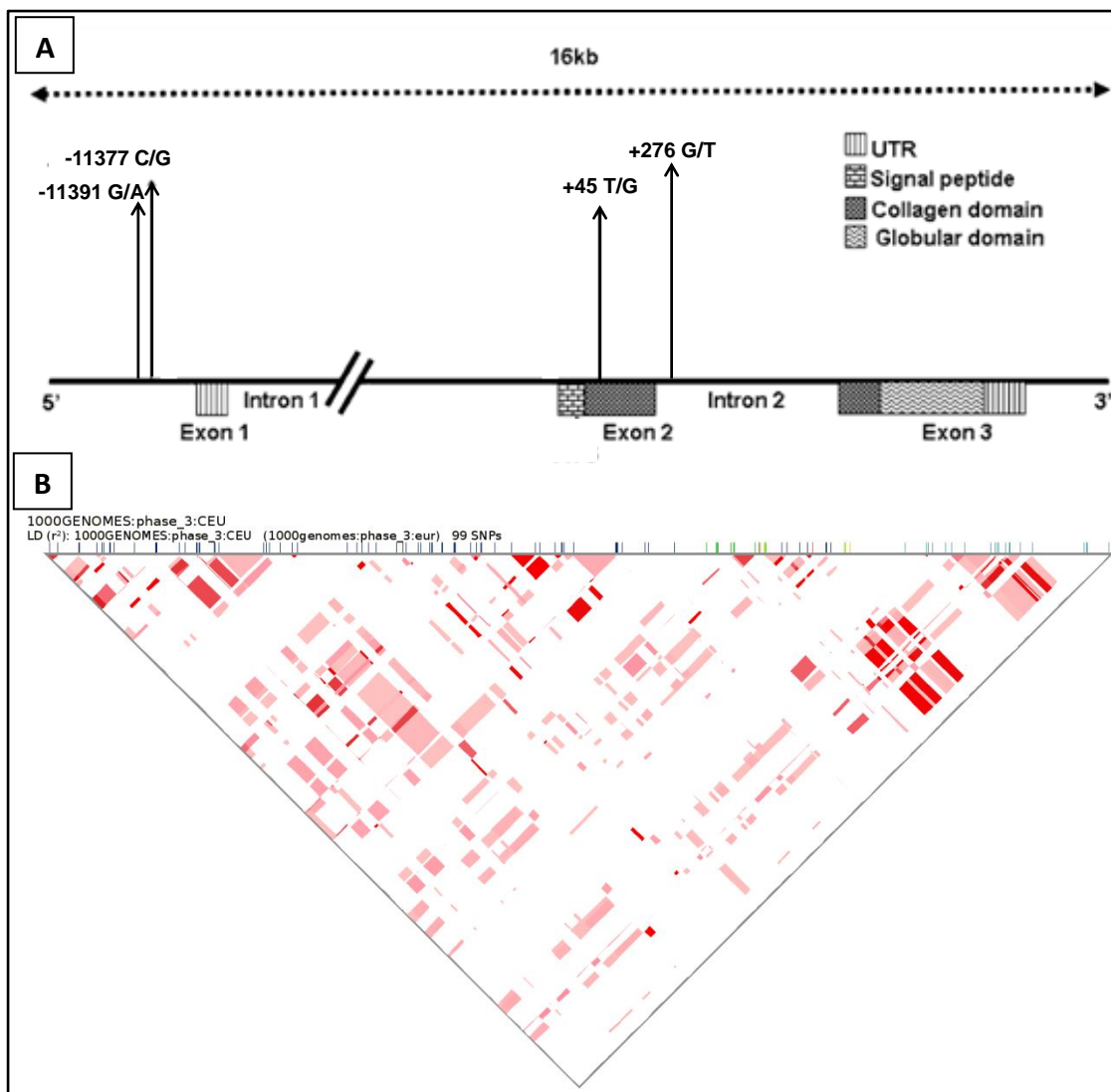
A expressão de AdipoR1 e AdipoR2 no músculo e no fígado está negativamente associada ao estado pós-prandial, à resistência à insulina e à obesidade (TSUCHIDA *et al.*, 2004). Desse modo, a obesidade não leva apenas à redução da concentração circulante de adiponectina, mas também à diminuição da expressão de seus receptores, o que, por sua vez, poderia resultar em maior resistência à insulina, levando a um círculo vicioso.



**Figura 1.** Estrutura da adiponectina e de seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2). HMW: *high molecular weight adiponectin* (adiponectina de alto peso molecular). Adaptado: KADOWAKI *et al.*, 2006.

A adiponectina é codificada pelo gene *ADIPOQ*, localizado no cromossomo 3q27, composto por três éxons e 15,8 kb de extensão (**Figura 2A**). A região promotora de -676 a +41 é suficiente para a atividade transcricional basal, em que dois elementos regulatórios diferentes *sterol regulatory binding protein* (SREBP, de -431 a -423) e *CAAT/enhancer binding protein* (C/EBP, de -230 a -224) residem. A expressão de adiponectina pode ser aumentada em resposta a diferentes fatores de transcrição, como PPAR- $\gamma$  (GU, 2009) e *forkhead box protein O1* (FoxO1) (QIAO e SHAO, 2006). Além disso, a biossíntese da adiponectina está sujeita a complexos mecanismos de controle pós-transcrição, como por intermédio da ação de microRNAs (ISHIDA *et al.*, 2014; BELARBI *et al.*, 2015), e pós-tradução, como pela hidroxilação e glicosilação de resíduos de aminoácidos, essenciais à estabilidade das formas mais complexas da proteína (WANG *et al.*, 2008).





**Figura 2.** (A) Estrutura do gene que codifica a adiponectina (*ADIPOQ*) com a localização de alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e (B) padrão de desequilíbrio de ligação dos SNPs localizados no gene *ADIPOQ* UTR: *untranslated region*. Na figura 2B, a intensidade da cor representa o grau de correlação entre os pares de SNPs conforme medido pelo R<sup>2</sup>. Fontes: adaptado de Vimalaswaran *et al.*, 2008 (A) e Ensembl Project (B).

Estima-se que a herdabilidade da concentração de adiponectina no sangue seja entre 30% a 70% (COMUZZIE *et al.*, 2001; MENZAGHI *et al.*, 2004; MILJKOVIC-GACIC *et al.*, 2007; PATEL, S. R. *et al.*, 2008). Em indivíduos de ancestralidade europeia, o principal *locus* responsável por essa variação é o próprio gene *ADIPOQ*, a que se atribui cerca de 4 a 8% da variabilidade da concentração de adiponectina (HEID *et al.*, 2006; HIVERT *et*

*al.*, 2008; HEID *et al.*, 2010). Há mais de 100 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *ADIPOQ* (frequência > 1%), sendo a maior parte localizada em íntrons. O padrão de desequilíbrio de ligação entre as variantes genéticas do locus *ADIPOQ* para a população europeia segundo dados dos 1000 Genomas (fase 3) está ilustrado na figura 2B.

A influência de SNPs do gene *ADIPOQ* sobre a concentração circulante de adiponectina tem se mostrado consistente nos estudos de associação genômica (GWAS - *Genomewide Association Studies*) (LING *et al.*, 2009; RICHARDS *et al.*, 2009; HEID *et al.*, 2010; JEE *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2011; DASTANI *et al.*, 2012; MORISAKI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014). Todavia, vale ressaltar que enquanto, em populações europeias, os SNPs no gene *ADIPOQ* são os principais responsáveis pela variação na adiponectinemia (LING *et al.*, 2009; RICHARDS *et al.*, 2009; HEID *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2011; DASTANI *et al.*, 2012), em populações asiáticas, são os SNPs no gene *CDH13* os mais fortemente associados (JEE *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; MORISAKI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014). O gene *CDH13* codifica para a proteína T-caderina, que pode atuar como receptor de adiponectina (HUG *et al.*, 2004).

Nos estudos de gene candidato, os principais SNPs avaliados no gene *ADIPOQ* são: -11391 G > A (rs17300539), -11377 C > G (rs266729), +45 T > G (rs2241766) e +276 G > T (rs1501299) (Enns *et al.*, 2011). SNPs na região promotora do gene *ADIPOQ*, particularmente próximos de regiões ricas em CpG (ocorrência de processos de metilação e desmetilação), como entre -1500 a -1350 pb, têm o potencial de afetar a expressão da adiponectina. Os polimorfismos -11391 G > A e -11377 C > G estão associados com variações na concentração sanguínea de adiponectina (VASSEUR, 2006; BREITFELD *et al.*, 2012), possivelmente, por interferirem na expressão do gene *ADIPOQ*. Corroborando tal fato, um estudo demonstrou que a substituição do alelo mais frequente pelo alelo menos frequente dos referidos SNPs teve impacto significativo sobre a ativação da transcrição do gene em linhagens de pré-adipócitos de camundongos (3T3-L1). Somado a isso, quando tal substituição foi feita simultaneamente para três SNPs (rs17300539, rs266729 e rs16861194) houve completa inibição da ligação de fatores de transcrição à região promotora (LAUMEN *et al.*, 2009).

Os polimorfismos +45T>G e +276G>T, localizados no éxon 2 do gene *ADIPOQ*, são uma mutação silenciosa, uma vez que não alteram a sequência de aminoácidos da proteína adiponectina. Desse modo, sua influência sobre a concentração circulante de adiponectina pode ser indireta (ex: desequilíbrio de ligação (DL)<sup>4</sup> com outro polimorfismo) ou por uma interferência em mecanismos de *splicing* alternativo, resultando, por exemplo, em menor estabilidade do mRNA (CARTEGNI *et al.*, 2002).

---

<sup>4</sup> Desequilíbrio de ligação (DL) refere-se à ocorrência de associação não aleatória entre alelos de diferentes *loci* em uma população e representa um desvio de uma situação hipotética em que diferentes loci apresentem completa independência (equilíbrio de ligação, EL).

## 2.2. Determinantes da concentração sanguínea de adiponectina

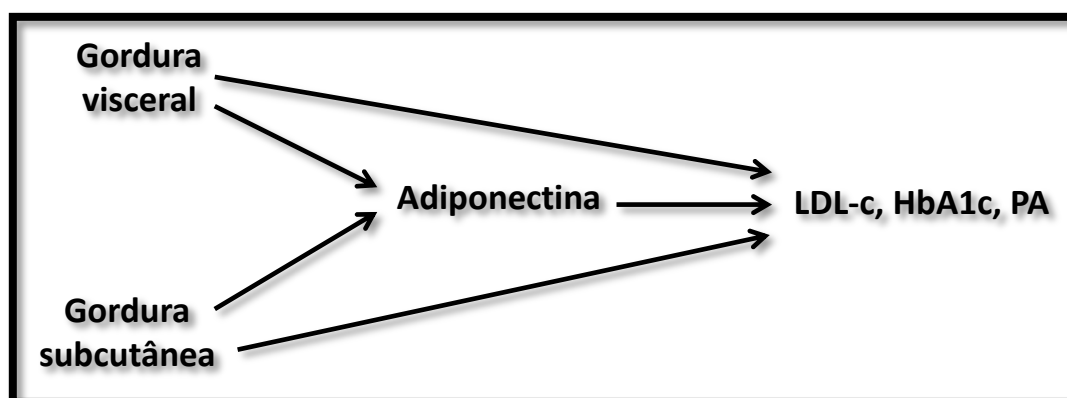
A adiponectinemia apresenta dimorfismo sexual, tendo as mulheres maior concentração sanguínea de adiponectina total (CNOP *et al.*, 2003; BOYNE *et al.*, 2010; BIDULESCU *et al.*, 2013) e maior proporção de adiponectina de alto peso molecular (SAITO *et al.*, 2012) em comparação aos homens. Tal fato tem sido atribuído à ação inibitória de hormônios andrógenos sobre a produção de adiponectina (YARROW *et al.*, 2012), bem como às diferenças na composição corporal e na distribuição de gordura entre os sexos. Há também uma associação positiva da adiponectinemia com a idade (BOYNE *et al.*, 2010) e com a ancestralidade europeia, em comparação a asiáticos (VALSAMAKIS *et al.*, 2003; FERRIS *et al.*, 2005) e americanos afro-descendentes (FERRIS *et al.*, 2005; ARANETA e BARRETT-CONNOR, 2007). O tabagismo, por outro lado, está associado a menores concentrações circulantes de adiponectina (EFSTATHIOU *et al.*, 2009).

A obesidade destaca-se por ser um forte e consistente determinante da concentração sanguínea de adiponectina. Contudo, apesar de o tecido adiposo ser o principal órgão produtor da proteína, a obesidade leva à redução da adiponectinemia (CNOP *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2003; BACHA *et al.*, 2004; ZOICO *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005; MAZZALI *et al.*, 2006; MILJKOVIC-GACIC *et al.*, 2007; PLAISANCE *et al.*, 2009; BOYNE *et al.*, 2010; TURER *et al.*, 2011; BIDULESCU *et al.*, 2013), efeito que pode ser revertido ou atenuado mediante perda de peso (ABBENHARDT *et al.*, 2013; ACHARYA *et al.*, 2013). Cabe ainda ressaltar que a relação entre obesidade e concentração de adiponectina depende do padrão de distribuição da gordura corporal.

A produção de adiponectina pelo tecido adiposo visceral (omental) decresce com o acúmulo de gordura (YOU *et al.*, 2005; DROLET *et al.*, 2009), ao passo que a produção pelo tecido subcutâneo parece permanecer inalterada (DROLET *et al.*, 2009). Aliado a isso, diversos estudos transversais sugerem que a circunferência da cintura e o acúmulo de gordura no tronco, ambos *proxies* da massa do depósito adiposo visceral, estão negativamente associados com a concentração plasmática de adiponectina (RYAN *et al.*, 2003; BACHA *et al.*, 2004; ZOICO *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005; MILJKOVIC-GACIC *et al.*, 2007; PLAISANCE *et al.*, 2009; TURER *et al.*, 2011),

relação que não é evidente para os depósitos subcutâneos após ajuste pela massa de gordura visceral (KWON *et al.*, 2005; TURER *et al.*, 2011).

Por outro lado, é importante destacar que há limitações em parte desses estudos no que se refere à falta de ajuste por confundidores importantes, como sexo, idade e gordura corporal total. Ainda, muitos estudos tiveram como objetivo construir modelos preditivos e, portanto, não houve preocupação com o modelo teórico causal da relação entre distribuição de gordura corporal e adiponectinemia. Como exemplo disso, há estudos que ajustaram para marcadores inflamatórios, potenciais mediadores, e estudos que ajustaram para pressão arterial, hemoglobina glicada e LDL-colesterol, o que pode introduzir viés de colisão nos resultados (REGISTER *et al.*, 2013), como ilustrado na **Figura 3**.



**Figura 3.** Gráfico acíclico direcionado (DAG: *Directed Acyclic Graph*) ilustrando a relação entre os depósitos de gordura corporal e a concentração de adiponectina. LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HbA1c: hemoglobina glicada; PA: pressão arterial.

Morbidades também podem induzir alterações na concentração sanguínea de adiponectina. Indivíduos com morbidades associadas à obesidade, tais como DM2, doença coronariana e acidente vascular cerebral (AVC), têm menores concentrações de adiponectina em relação a controles não doentes pareados por IMC (OUCHI *et al.*, 1999; HOTTA *et al.*, 2000; PERA *et al.*, 2013). Acredita-se que a inflamação crônica, presente na obesidade e nas morbidades a ela associadas, iniba a síntese de adiponectina,

o que, por sua vez, contribui para o agravamento do quadro inflamatório e, por conseguinte, da progressão do processo patológico (FANTUZZI, 2008).

Por outro lado, observa-se aumento da produção de adiponectina frente a diferentes condições inflamatórias clássicas, como artrite reumatoide (OTERO *et al.*, 2006), lúpus eritematoso sistêmico (SADA *et al.*, 2006), doença inflamatória intestinal (YAMAMOTO *et al.*, 2005) e diabetes mellitus tipo 1 (PERSEGHIN *et al.*, 2003). Tal fato sugere que a redução da concentração de adiponectina relacionada à obesidade pode ter origem em outras alterações que ocorrem no tecido adiposo, como o estresse do retículo endoplasmático, a hipóxia, a necrose dos adipócitos e o balanço energético positivo (FANTUZZI, 2008).

### **2.3. Mecanismos de ação da adiponectina: evidências de estudos *in vitro* e em animais**

Há um grande corpo de evidências de estudos *in vitro* e em animais indicando efeito protetor da adiponectina sobre a saúde cardiovascular, em especial sobre a resistência periférica à insulina, inflamação sistêmica, esteatose hepática, função das células beta-pancreáticas e aterogênese (**Figura 4**). Os mecanismos pelos quais a adiponectina exerce tais efeitos pleiotrópicos não estão completamente esclarecidos, mas algumas proteínas parecem fundamentais, como a AMPK, PPAR- $\alpha$ , ceramidase e fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

No que se refere à sua ação sobre a sensibilidade periférica à insulina, diversos estudos demonstram que a adiponectina age na supressão da gliconeogênese hepática, por meio da redução da expressão gênica das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase e glicose-6-fosfatase, e no aumento da captação de glicose e da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético. Um dos principais eventos mediadores desses efeitos é a fosforilação e subsequente ativação da AMPK, enzima central para a homeostase energética da célula (BERG *et al.*, 2001; COMBS *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2001; MAEDA *et al.*, 2002; YAMAUCHI *et al.*, 2002).

Cabe destacar que, além de seus efeitos sobre a sensibilidade periférica à insulina, a adiponectina parece atuar na secreção de insulina (WINZELL *et*

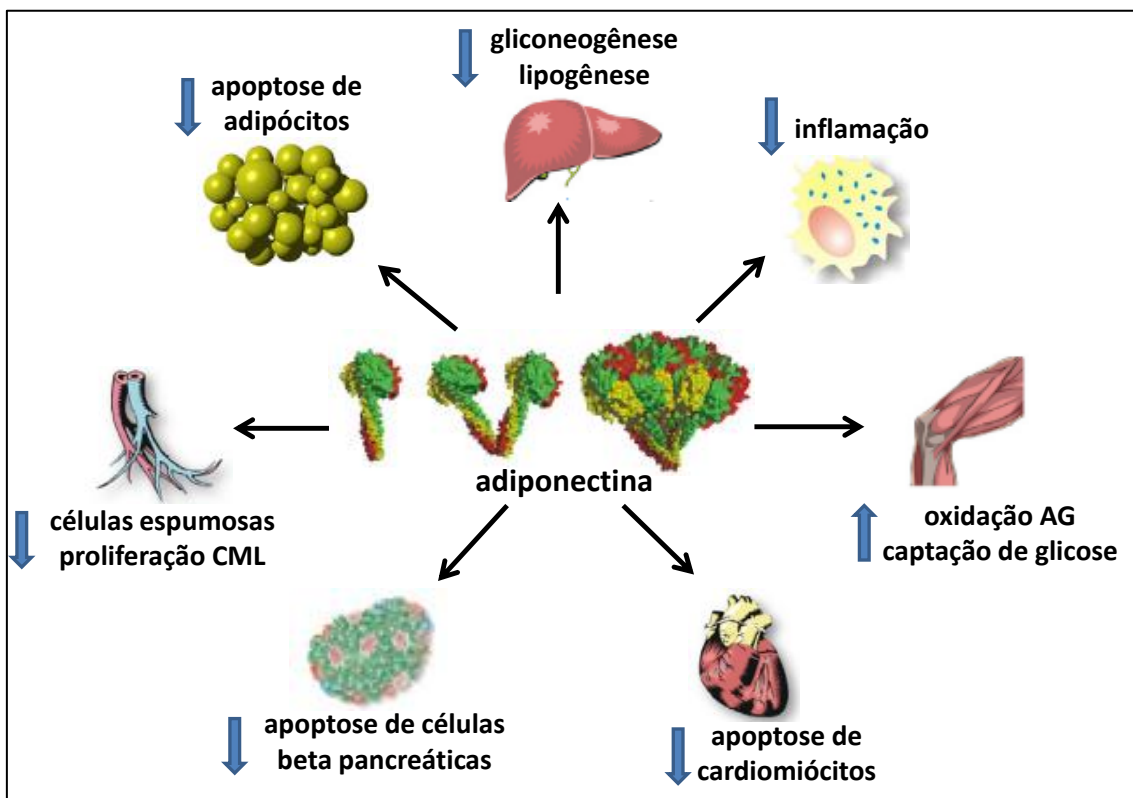
*al.*, 2004) e na prevenção da apoptose de células beta pancreáticas, o que parece estar relacionado à ativação das quinases ativadas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) ou à proteína quinase B (PKB/Akt) (WIJESEKARA *et al.*, 2010; HOLLAND *et al.*, 2011). Outro possível mecanismo antiapoptótico da adiponectina é o aumento da atividade da ceramidase, levando à redução da concentração intracelular de ceramida e consequente aumento da concentração do metabólito antiapoptótico esfingosina-1-fosfato (HOLLAND *et al.*, 2011). Este mesmo mecanismo pode estar relacionado à inibição da apoptose em outros tipos celulares, como cardiomiócitos (HOLLAND *et al.*, 2011).

Ainda, observa-se que a adiponectina atua em diversos processos hepáticos relacionados à esteatose hepática e à hipertrigliceridemia, como, por exemplo, na promoção da oxidação de ácidos graxos pelo aumento da atividade da enzima carnitina palmitoil transferase I, na inibição da síntese de ácidos graxos pela redução da atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, e na atenuação da produção de mediadores pró-inflamatórios (XU *et al.*, 2003; KIM, J.-Y. *et al.*, 2007). Os efeitos da adiponectina sobre o metabolismo lipídico hepático parecem ser em parte mediados pela ativação das proteínas AMPK e PPAR- $\alpha$ .

No tocante aos efeitos da adiponectina sobre a aterogênese, destacam-se a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no endotélio vascular, como o TNF- $\alpha$  e a IL-8 (OUCHI *et al.*, 1999; OUCHI *et al.*, 2000; KOBASHI *et al.*, 2005); a supressão da proliferação de células musculares lisas, induzida por fatores de crescimento (ARITA *et al.*, 2002), e a inibição da formação de células espumosas na camada íntima das artérias (OUCHI *et al.*, 2001). Parte dos efeitos da adiponectina sobre as células endoteliais parece ser mediada pela inibição da expressão de TNF- $\alpha$  e da atividade do fator nuclear NF- $\kappa$ B (OUCHI *et al.*, 2000).

A inflamação sistêmica, condição intimamente envolvida na aterogênese e na resistência à insulina, também pode sofrer influência da adiponectina. Os macrófagos são células do sistema imune que se distribuem de forma ubíqua no organismo e que exercem função central na resposta inflamatória. Nesse contexto, a adiponectina influencia na supressão do crescimento e da proliferação de progenitores de macrófagos na medula óssea (YOKOTA *et al.*,

2000), na inibição da atividade fagocitária (YOKOTA *et al.*, 2000), na redução da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (YOKOTA *et al.*, 2000; WULSTER-RADCLIFFE *et al.*, 2004) e no aumento de mediadores anti-inflamatórios (IL-10) em macrófagos (KUMADA *et al.*, 2004; OHASHI *et al.*, 2010). Um dos grandes eventos mediadores do efeito anti-inflamatório da adiponectina é a inibição da translocação do NF- $\kappa$ B (AJUWON e SPURLOCK, 2005).



**Figura 4.** Ações da adiponectina em tecidos-alvo. CML: célula muscular lisa. Adaptado: YE e SCHERER, 2013.

#### 2.4 Adiponectina, alterações metabólicas e doenças cardiovasculares: evidências de estudos epidemiológicos

Em consonância com os estudos realizados em animais e em culturas celulares, os estudos epidemiológicos transversais reportam que a concentração sanguínea de adiponectina está negativamente associada com diversos fatores de risco para DCV (resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial) e com a ocorrência de DM2 e de doença arterial



coronariana (DAC) (WEYER *et al.*, 2001; MATSUBARA *et al.*, 2002; KUMADA *et al.*, 2003; IWASHIMA *et al.*, 2004).

Evidências advindas de estudos epidemiológicos longitudinais reforçam que a hipoadiponectinemia prediz o desenvolvimento de fatores de risco para DCV, em particular da resistência à insulina, da dislipidemia e da hipertensão arterial (YAMAMOTO *et al.*, 2004; CHOW *et al.*, 2007; WILDMAN *et al.*, 2008). Além disso, a concentração sanguínea de adiponectina tem relação dose-resposta com o risco de diabetes mellitus tipo 2 (RR = 0,72 para cada incremento de 1-log  $\mu\text{g/mL}$  na concentração de adiponectina). Tal associação é consistente em populações de diferentes ancestralidades (LI *et al.*, 2009).

Por outro lado, as evidências provenientes de estudos longitudinais não são claras no tocante à relação entre adiponectina e risco de DCV, havendo estudos reportando associação negativa (ZHANG, B.-C. *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013), positiva (HAO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013) e nula (HAO *et al.*, 2013; KANHAI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013). Revisões sistemáticas sobre o tema apontam considerável heterogeneidade entre os estudos (ZHANG, B.-C. *et al.*, 2012; HAO *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013), o que pode ter relação com o ajuste para potenciais mediadores (glicose, HDL-colesterol e proteína C reativa), possível modificação de efeito pelo sexo e causalidade reversa em função de doença subclínica pré-existente (HAO *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) não se distribuem de forma independente uns dos outros, tendendo a coexistir nos mesmos indivíduos (SMITH *et al.*, 2007). Nesse contexto, a concentração sanguínea de adiponectina está associada a diversos outros potenciais mediadores biológicos de DCNT (ex: citocinas pró-inflamatórias, resistina, leptina etc), assim como a comportamentos de risco para essas doenças (BIDULESCU *et al.*, 2013). Sendo assim, as evidências oriundas dos estudos observacionais estão sujeitas a confundimento residual e à causalidade reversa e, portanto, não permitem esclarecer se a adiponectina está envolvida na etiologia das DCV ou se é apenas um marcador de risco (DAVEY SMITH *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2007).

Ensaio clínico aleatorizado são considerados padrão-ouro para avaliar causalidade. Contudo, há limitações inerentes a esse tipo de estudo para elucidar o papel da adiponectina no risco de DCV, em especial no que se

refere aos aspectos éticos, à adesão ao tratamento, à capacidade de generalização dos achados e ao tempo de exposição, uma vez que o desenvolvimento de DCV pode ser fruto da exposição por décadas a determinado fator de risco. Cabe destacar que algumas drogas atualmente utilizadas têm a capacidade de aumentar a concentração circulante de adiponectina, como estatinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina e tiazolidinedionas (PHILLIPS e KUNG, 2010). Todavia, uma vez que a ação dessas drogas sobre a expressão de adiponectina não é específica, não é possível inferir o papel da adiponectina na etiologia das DCV a partir dos resultados de ensaios clínicos que testaram essas drogas.

## **2.5. Aleatorização mendeliana: definição, potencialidades e limitações**

Tradicionalmente, a Epidemiologia Genética busca o entendimento do papel do genoma na determinação de diferentes fenótipos, em especial no risco de desenvolver doenças (DAVEY SMITH *et al.*, 2005). Em contraposição à abordagem convencional da Epidemiologia Genética, os estudos de aleatorização mendeliana são caracterizados pelo uso de variantes genéticas como *proxy* de exposições, com o objetivo de fortalecer a inferência causal sobre a relação entre fatores de risco modificáveis e desfechos. Em outras palavras, havendo uma relação de causa e efeito entre uma exposição e um desfecho, espera-se que polimorfismos que produzam variações nos níveis dessa exposição estejam associados ao risco de ter o desfecho (SMITH e EBRAHIM, 2003).

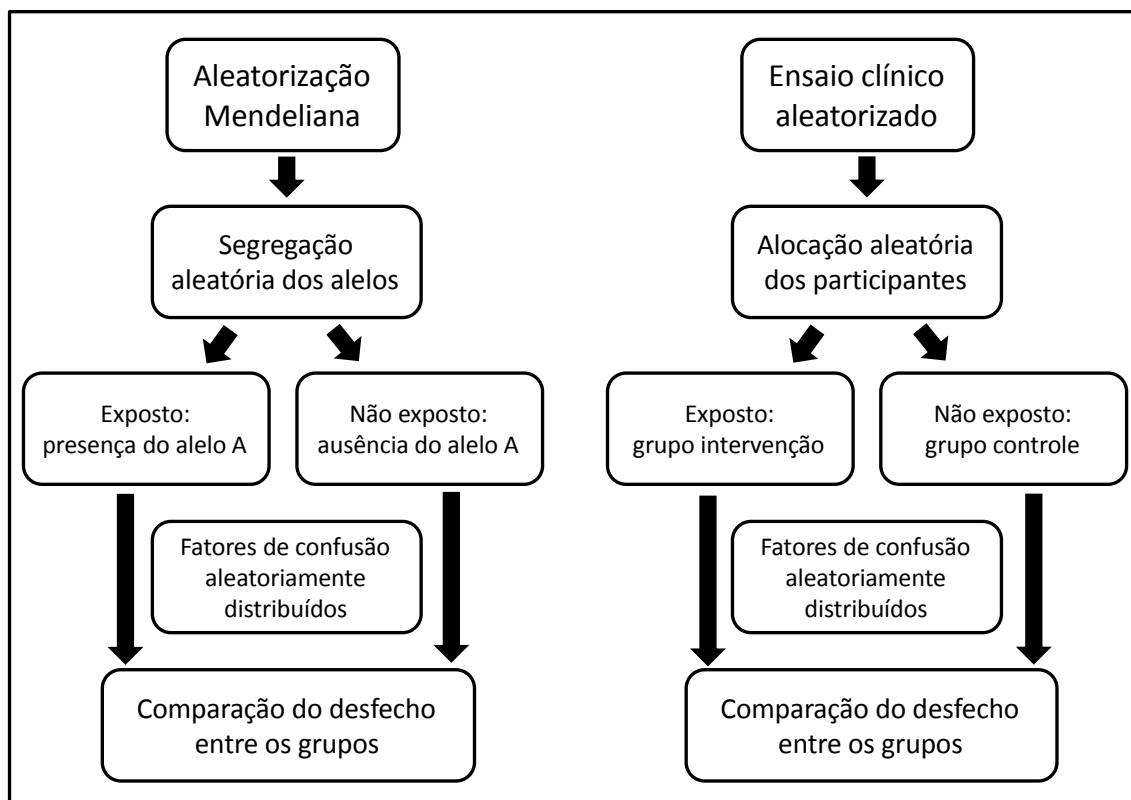
A denominação aleatorização mendeliana advém especialmente da Segunda Lei de Mendel ou Lei da Segregação Independente, que implica que a herança de uma característica é independente de outra ou aleatória em relação à outra (MENDEL, 1866). Portanto, a distribuição populacional dos polimorfismos não costuma estar associada com os fatores socioeconômicos e comportamentais, que frequentemente confundem as estimativas dos estudos epidemiológicos observacionais. Sendo assim, em situações em que há confundimento entre exposição e desfecho e que, portanto, a associação entre eles não reflete uma relação de causa e efeito, é possível estimar o efeito causal dessa mesma exposição sobre o desfecho por meio da técnica da

aleatorização mendeliana. Além disso, uma vez que o genoma de um indivíduo é determinado ao nascimento, a relação do polimorfismo com o desfecho de interesse não está sujeita à causalidade reversa (EBRAHIM e SMITH, 2008).

O termo aleatorização mendeliana foi introduzido no contexto de estudos sobre a eficácia do transplante alogênico de medula óssea no tratamento da leucemia mieloide aguda. Nesse cenário, a realização de ensaios clínicos aleatorizados não é factível e a comparação direta de transplantados e não transplantados está sujeita a viés de seleção. Desse modo, Gray e Wheatley propuseram comparar a sobrevivência de crianças com leucemia que tinham ou não um irmão geneticamente compatível (avaliado a partir do antígeno de histocompatibilidade leucocitária - HLA), independente se tinham ou não recebido o transplante. Essa estratégia é análoga à análise por intenção de tratar feita em ensaios clínicos aleatorizados (GRAY e WHEATLEY, 1991; WHEATLEY e GRAY, 2004).

Nesse contexto, alguns autores têm denominado os estudos de aleatorização mendeliana como “ensaios clínicos da natureza” (THANASSOULIS e O'DONNELL, 2009). As similaridades entre estudos de aleatorização mendeliana e ensaios clínicos randomizados residem na distribuição aleatória dos fatores de confusão, na ausência de causalidade reversa e no tipo de análise (análise por intenção de tratar) (**Figura 5**).

Contudo, há duas diferenças fundamentais da aleatorização mendeliana em relação ao ensaio clínico aleatorizado que merecem destaque: (I) a variação nos níveis de exposição não é atingida por meio de uma intervenção (ex: droga), mas sim pela utilização de polimorfismos genéticos que afetam essa exposição; (II) a aleatorização é proveniente da alocação aleatória dos alelos dos pais para os filhos que ocorre durante a formação dos gametas e a concepção (THANASSOULIS e O'DONNELL, 2009).



**Figura 5.** Comparação entre o desenho da aleatorização mendeliana e do ensaio clínico aleatorizado. Adaptado: (EBRAHIM e SMITH, 2008).

A aleatorização mendeliana consiste em uma aplicação do método de variáveis instrumentais (VIs), comumente usado por estudos econométricos desde o início do século XX (WRIGHT, 1928; GOLDBERGER, 1972; THOMAS e CONTI, 2004). Dessa forma, deve atender a três pressupostos fundamentais: (1) a VI está associada à exposição de interesse; (2) a VI é independente dos fatores de confusão entre exposição e desfecho e (3) todo o efeito da VI sobre o desfecho é mediado pela exposição (GREENLAND, 2000) (**Figura 6A**).

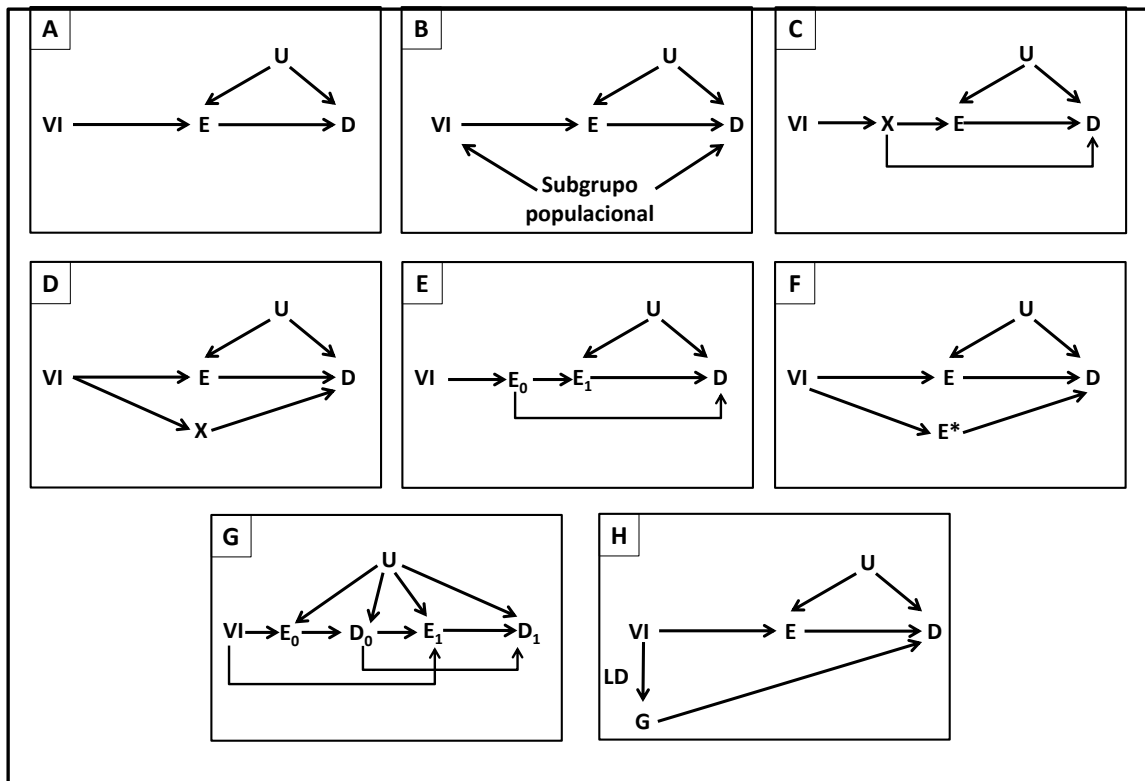
Em relação ao primeiro pressuposto, um desafio recorrente é encontrar VIs fortemente associadas à exposição de interesse, pois, frequentemente, um único polimorfismo explica uma fração muito modesta de determinado fenótipo. A princípio, acreditava-se que o uso de VIs fracas levaria apenas à maior imprecisão nas estimativas. Todavia, estudos econométricos mostram que instrumentos muito fracos podem também levar a estimativas enviesadas (BOUND *et al.*, 1995; STOCK *et al.*, 2002). Tal fato é de particular importância se algum dos outros pressupostos for ferido; nessa situação, o uso de VIs fracas exacerbará muito o viés introduzido (VANDERWEELE *et al.*, 2014).

Nesse contexto, tem-se proposto o uso de escores compostos por múltiplas variantes genéticas, denominados escores genéticos de risco (BURGESS e THOMPSON, 2013), com a finalidade de superar as limitações decorrentes do uso de polimorfismos isolados como VI. A adoção de escores genéticos de risco em estudos de aleatorização mendeliana tem crescido exponencialmente, em especial nas situações em que a exposição de interesse tem influência poligênica (SHAH *et al.*, 2013; YAGHOOTKAR *et al.*, 2013).

O segundo pressuposto, que trata da independência da VI em relação a fatores de confusão entre exposição e desfecho, pode ser ferido em situações em que existam subgrupos dentro da população de estudo que tenham diferentes frequências dos alelos de interesse e que concomitantemente tenham diferente risco de ter o desfecho. Esse fenômeno, conhecido como estratificação populacional, pode levar a associações espúrias entre o genótipo e o desfecho na população de estudo (**Figura 6B**) (CARDON e PALMER, 2003).

Por fim, o terceiro e último pressuposto pode ser violado em alguns casos envolvendo, por exemplo, pleiotropia horizontal ou variantes genéticas em forte DL. São exemplos de situações em que pode ocorrer violação desse pressuposto: (I) a variante genética está relacionada a um fenótipo intermediário, o qual afeta o desfecho também por mecanismo independente da exposição (**Figura 6C**); (II) a variante genética afeta dois componentes de um mesmo fenótipo e a exposição consiste de apenas um desses componentes (**Figura 6D**); (III) a exposição influencia o desfecho em diferentes momentos e a medida da exposição refere-se apenas a um dos momentos (**Figura 6E**); (IV) existe interação entre a presença do polimorfismo e a exposição de interesse; (V) o dado da exposição apresenta erro de medida, o que será problemático no caso de exposições dicotômicas ou com erro de medida diferencial (**Figura 6F**); (VI) em alguns casos de causalidade reversa, como quando a exposição no tempo 1 ( $E_1$ ) sofre influência do desfecho em algum momento anterior ( $D_0$ ); neste caso, a variante genética estará associada ao desfecho ( $D_1$ ) de forma independente da exposição  $E_1$  (**Figura 6G**) (LAWLOR *et al.*, 2008; VANDERWEELE *et al.*, 2014). O terceiro pressuposto pode também ser violado quando a VI está muito correlacionada com outro locus polimórfico que afeta o desfecho de interesse, ou seja, quando as

variantes estão em forte DL e a outra variante influencia o desfecho de forma independente da variante de interesse (**Figura 6H**) (BOYD *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Gráfico acíclico direcionado (DAG: *Directed Acyclic Graph*) ilustrando os pressupostos da análise com variáveis instrumentais (A) e suas possíveis violações (B-H). VI: variável instrumental; E: exposição; E<sub>0</sub>: exposição no momento *baseline*; E<sub>1</sub>: exposição no momento da coleta dos dados; E\*: exposição aferida com erro; D: desfecho; D<sub>0</sub>: desfecho no momento *baseline*; D<sub>1</sub>: desfecho no momento da coleta dos dados; U: fatores de confusão não medidos; X: outro fenôtipo que não a exposição; DL: desequilíbrio de ligação; G: variante genética em DL com a VI. Adaptado: (VANDERWEELE *et al.*, 2014).

## 2.6. Adiponectina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2: evidências dos estudos genéticos

O uso de variantes genéticas associadas à concentração circulante de adiponectina oferece uma oportunidade interessante para elucidar a possível

contribuição da adiponectina no desenvolvimento de DCV, uma vez que esse tipo de estudo pode contornar muitas das limitações vinculadas aos estudos epidemiológicos observacionais tradicionais (confundimento residual e causalidade reversa) e aos ensaios clínicos aleatorizados (tempo de exposição e validade externa).

O locus 3q27, onde se encontra o gene *ADIPOQ*, está associado com fenótipos de risco cardiovascular, como a síndrome metabólica e o DM2 (VIONNET *et al.*, 2000; FRANCKE *et al.*, 2001). Aliado a isso, diferentes estudos indicam que polimorfismos associados à concentração de adiponectina estão também relacionados à síndrome metabólica, DAC e DM2 (HIVERT *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2011; DASTANI *et al.*, 2012; ZHANG, H. *et al.*, 2012; DASTANI *et al.*, 2013; GAO, M. *et al.*, 2013; RAMYA *et al.*, 2013). Esses achados sugerem que há sobreposição entre os polimorfismos que influenciam os dois fenótipos. Todavia, parte desses estudos não pode ser considerada como evidência de relação de causa-efeito entre adiponectina e doenças metabólicas, uma vez que foram também considerados polimorfismos em outros genes que não o *ADIPOQ* e que, portanto, podem exercer efeitos pleiotrópicos sobre o desfecho (DASTANI *et al.*, 2012; DASTANI *et al.*, 2013) (**Figura 6C**).

Nesse contexto, tendo em vista os princípios da aleatorização mendeliana, os estudos que restringiram a análise a polimorfismos do gene *ADIPOQ* e que, portanto, estão menos sujeitos à pleiotropia, são de particular interesse para avaliar a relação causal entre adiponectina e risco cardiovascular. Esses estudos concentram-se na avaliação dos quatro polimorfismos citados anteriormente: -11377 C > G, -1391 G > A, +45 T > G e +276 G > T.

Nesse sentido, há evidências de que o polimorfismo -11377 C > G está positivamente associado a fatores de risco cardiovascular, como pressão arterial sistólica (AVERY *et al.*, 2011), espessura das camadas íntima-média da aorta (PATEL, S. *et al.*, 2008; BEVAN *et al.*, 2011), concentração sanguínea de triacilgliceróis (KARMELIĆ *et al.*, 2012), resistência à insulina (MENTE *et al.*, 2013), obesidade central (KARMELIĆ *et al.*, 2012) e síndrome metabólica (KARMELIĆ *et al.*, 2012; SURIYAPROM *et al.*, 2014). Da mesma forma, a maior parte dos estudos indica que o polimorfismo -1391 G > A está

diretamente associado à SM (KARMELIĆ *et al.*, 2012), à resistência à insulina (FUMERON *et al.*, 2004; GOYENECHEA *et al.*, 2009; GAO, H. *et al.*, 2013), ao aumento da concentração sanguínea de triacilgliceróis (KARMELIĆ *et al.*, 2012) e ao IMC (BOUMAIZA *et al.*, 2011b).

Os estudos que avaliaram o SNP +45 T > G têm ressaltado, sobretudo, sua associação com intolerância à glicose (MENZAGHI *et al.*, 2002; FUMERON *et al.*, 2004; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005; TSO *et al.*, 2006; RUCHAT *et al.*, 2008; MACKAWY, 2013), mas há também relatos da possível associação com acúmulo de gordura visceral (KATSUDA *et al.*, 2007), formação de placas ateroscleróticas (KATSUDA *et al.*, 2007; KIM, S.H. *et al.*, 2008), pressão arterial (MENZAGHI *et al.*, 2002) e SM (LEE *et al.*, 2012). Em relação ao SNP +276 G > T, observou-se associação com diferentes dimensões do perfil lipídico (MENZAGHI *et al.*, 2002; BERTHIER *et al.*, 2005), pressão arterial (MENZAGHI *et al.*, 2002; MOUSAVINASAB *et al.*, 2006), gordura corporal (FREDRIKSSON *et al.*, 2006) e SM (YANG *et al.*, 2007; VASSEUR *et al.*, 2010; LEU *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012). Em um estudo com indivíduos caucasianos saudáveis, diversas outras variantes no gene *ADIPOQ*, apesar de associadas à concentração de adiponectina, não se relacionaram a componentes da SM, como IMC, perfil lipídico (HDL-c e TAG), pressão arterial e sensibilidade à insulina (HOMA-IR e HbA1c) (HEID *et al.*, 2006; MACKEVICS *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que há número expressivo de estudos que contradizem esses achados e que reportam associação nula, ou até mesmo inversa, de fenótipos relacionados à SM com os SNPs -11377 C > G (SHIN *et al.*, 2006; WARODOMWICHIT *et al.*, 2009; SURIYAPROM *et al.*, 2010), -1391 G > A (PATEL, S. *et al.*, 2008; WARODOMWICHIT *et al.*, 2009; BOUMAIZA *et al.*, 2011b), +45 T > G (MACKEVICS *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2006; LOOS *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2009; LEU *et al.*, 2011; XI *et al.*, 2012; SURIYAPROM *et al.*, 2014) e +276 G > T (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005; MACKEVICS *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006; BOUMAIZA *et al.*, 2011b; XI *et al.*, 2012).

Em relação aos estudos com metanálise, não foi observada associação significativa dos SNPs -11377 C > G, +45 T > G e +276 G > T com pressão arterial ou perfil lipídico (ZHAO e ZHAO, 2011). Por outro lado, na população chinesa, a ocorrência de SM associou-se com a presença de polimorfismos nos



SNPs -11377 C > G (RO: 0,80; IC95%: 0,68-0,92), +45 T > G (RO: 1,14; IC95%: 1,05-1,24) e +276 G > T (RO: 1,42; IC95%: 1,16-1,75), considerando o modelo de herança dominante (GAO, M. *et al.*, 2013).

No tocante à incidência de DM2, estudos com metanálise indicam que a presença do SNP -11377C>G aumenta o risco em asiáticos (CHU *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013) e europeus (GONG *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2011; CHU *et al.*, 2013). O -11391G>A também parece estar associado com o risco de desenvolver DM2, ao menos na população europeia (GONG *et al.*, 2010; CHU *et al.*, 2013). Contudo, a restrita disponibilidade de estudos que avaliaram a relação do -11391G>A com DM2 limita a precisão das estimativas a partir de metanálises (GONG *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2011). Os polimorfismos +45T>G e +276G>T não parecem ter influência significativa sobre a ocorrência de DM2 (HAN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011).

Uma das grandes limitações desses estudos é o uso de SNPs isolados, que explicam uma fração ínfima da variabilidade da adiponectina ou até mesmo que não estavam associados à sua concentração sanguínea (HIVERT *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2011; ZHANG, B.-C. *et al.*, 2012; GAO, M. *et al.*, 2013; RAMYA *et al.*, 2013). Com o intuito de contornar tal limitação, alguns estudos utilizaram múltiplos alelos, na forma de haplótipos ou escores, que explicavam uma fração maior da variabilidade da adiponectina.

Por meio de um escore genético composto por quatro SNPs (rs17366653, rs17300539, rs3774261, e rs3821799) ao redor do gene *ADIPOQ*, que explicavam cerca de 4% da variabilidade na concentração de adiponectina, não se observou efeito da adiponectina sobre IMC, perfil lipídico, resistência à insulina ou ocorrência de DM2. Por outro lado, um escore genético de SNPs relacionados à resistência à insulina foi capaz de prever a concentração de adiponectina, indicando que era a resistência à insulina a responsável por modular a produção de adiponectina e não o contrário (YAGHOOTKAR *et al.*, 2013).

De modo geral, as metanálises sobre o tema apontam substancial heterogeneidade entre os estudos ( $I^2 > 50\%$ ). As principais fontes de heterogeneidade relatada foram o uso de diferentes populações (SCHWARZ *et al.*, 2009; CHU *et al.*, 2013), o delineamento dos estudos (fonte do grupo controle: comunitário ou hospitalar) (CHU *et al.*, 2013), a distribuição dos

genótipos nos controles (equilíbrio de Hardy-Weinberg) (CHU *et al.*, 2013) e a presença de ajuste para covariáveis (HAN *et al.*, 2011).

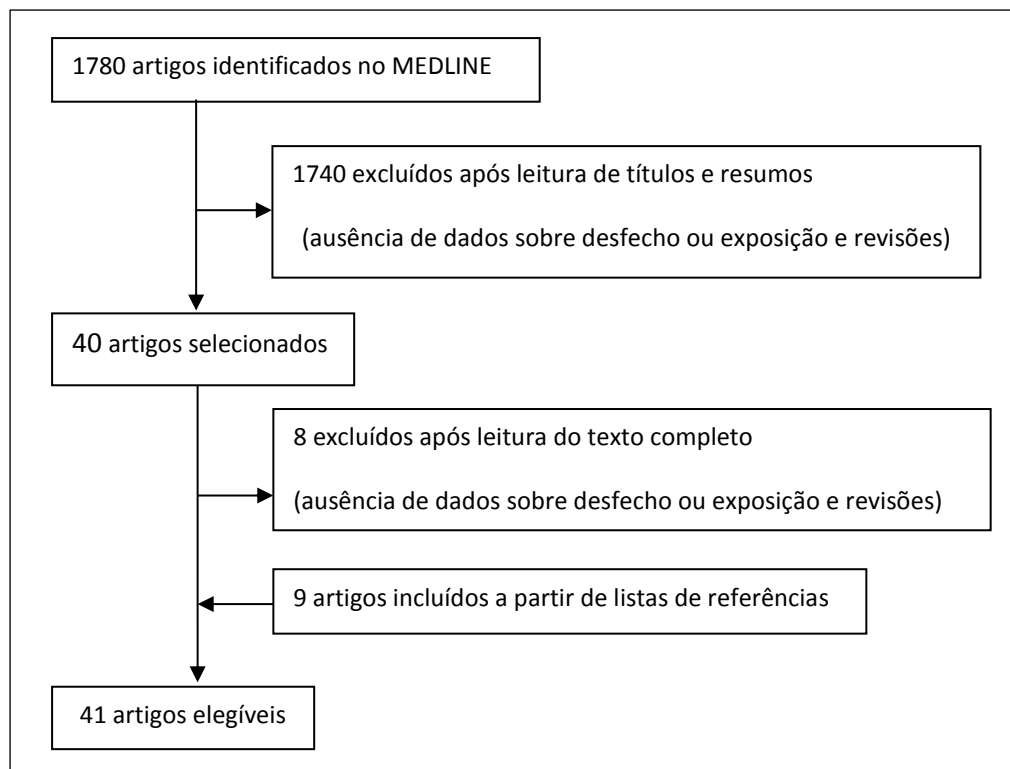
### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Adiponectina e doenças cardiovasculares: evidências dos estudos genéticos

A revisão de literatura teve como enfoque principal estudos que avaliaram a relação entre SNPs no locus *ADIPOQ* e incidência ou mortalidade por doenças cardiovasculares. Foi utilizada a base de dados do MEDLINE com a combinação dos seguintes termos: (adiponectin OR *ADIPOQ* OR *GBP-28* OR *apM1* OR *Acrp30*) AND (genome wide association OR GWA stud\* OR whole genome association analys\* OR genomewide OR genetic loc\* OR genotyp\* OR SNP OR polymorphism OR single nucleotide polymorphism OR genetic polymorphism OR haplotype OR gene OR variants OR allele)

Para ser elegível, o estudo teve de atender a três condições: (I) fornecer informações sobre os polimorfismos ou haplótipos no locus *ADIPOQ*, (II) ter dados sobre os desfechos de interesse e (III) avaliar indivíduos sem parentesco (sem estudos familiares). Não houve restrição por desenho de estudo, idioma ou data de publicação.

1780 artigos foram identificados por meio da busca. Após leitura dos títulos e resumos, foram selecionados 40 artigos, dos quais se examinou o texto completo, o que resultou em 32 artigos elegíveis. As referências das revisões sistemáticas sobre o tema foram examinadas e outros 9 artigos elegíveis, encontrados. No total, foram selecionados 41 artigos (**Figura 7**).



**Figura 7.** Busca sistemática e procedimento de seleção dos artigos avaliados sobre SNPs no gene *ADIPOQ* e doenças cardiovasculares.

Os 41 estudos selecionados a partir da busca sistemática encontram-se sintetizados na tabela 1. Estudos com mais de um tipo de desfecho (HEGENER *et al.*, 2006) ou realizados em mais de um local (LACQUEMANT *et al.*, 2004; GABLE *et al.*, 2007) foram apresentados separadamente, resultando em 44 unidades de análise. Em relação ao local, foram encontrados 21 estudos asiáticos, 15 europeus, cinco norte-americanos, um latinoamericano e um africano, realizados entre 2004 e 2013. O delineamento caso-controle foi adotado em 90% dos casos. A maior parte dos estudos foi realizada em indivíduos sem comorbidades prévias ( $n = 29$ ), na faixa etária de 40 a 70 anos. Os desfechos considerados foram variados em relação ao tipo e à definição, sendo que a maior parte avaliou a associação dos SNPs com doença arterial coronariana ( $n = 24$ ), seguido de doenças cardiovasculares em geral ( $n = 7$ ), infarto agudo do miocárdio ( $n = 7$ ), acidente vascular cerebral ( $n = 5$ ) e doença arterial periférica ( $n = 1$ ). A maioria dos estudos não avaliou a concentração sanguínea de adiponectina.

Dentre os sete estudos que encontraram associação entre o SNP -11377C>G e os desfechos cardiovasculares, seis foram realizados em populações asiáticas e reportaram que o alelo menos frequente aumenta o risco de desenvolver o desfecho. No estudo que reportou efeito protetor do alelo menos frequente (G), não houve associação entre o SNP e a concentração de adiponectina (PRIOR *et al.*, 2011). Uma metanálise de 20 estudos apontou um aumento de 9% (IC 95%: 1%; 17%) do *odds* de doenças cardiovasculares em indivíduos portadores do alelo G em comparação ao alelo C (ZHANG, H. *et al.*, 2012). Foram identificados apenas cinco estudos que avaliaram a associação entre o SNP -11391G>A e apenas um reportou aumento do risco de infarto agudo do miocárdio em indivíduos AA em comparação a AG/GG (GABLE *et al.*, 2007).

Dos 29 estudos que avaliaram a associação entre o polimorfismo +45T>G e as doenças cardiovasculares, 16 não encontraram associação, 12 reportaram associação positiva e um observou associação negativa. A medida combinada de 24 estudos oriunda de metanálise indicou que há aumento do risco em portadores do alelo G (RO: 1,22; IC95%: 1,07; 1,39) (ZHANG, H. *et al.*, 2012). Dentre os estudos que avaliaram o SNP -276G>T, cinco reportaram efeito protetor do polimorfismo, ao passo que dois observaram risco aumentado. A medida combinada a partir de 27 estudos apontou para efeito protetor modesto do alelo T em comparação ao alelo G (RO: 0,90; IC95%: 0,83; 0,97).

Tabela 1. Descrição e principais achados dos estudos elegíveis

País (Autor, ano)	Desenho de estudo (n)	Comorbidade Idade média % homens	Técnica de genotipa- gem	Desfecho	Adipo- nectina	- 11377 C>G RO (IC 95%) (G vs. C)*	- 11391 G>A RO (IC 95%) (A vs. G)*	+ 45 T>G RO (IC 95%) (G vs. T)*	+ 276 G>T RO (IC 95%) (T vs. G)*
<b>Japão</b> (Ohashi <i>et al.</i> , 2004)	Caso- controle (383/368)	Não 63.0/62.3 70%/65%	<i>TaqMan- PCR</i>	DAC	↔			1,11 (0,89; 1,39)	
<b>Suíça</b> (Lacquemant <i>et al.</i> , 2004)	Caso- controle (107/181)	DM2 (OMS*) 57.7 62%	<i>PCR-direct sequencing</i>	DAC	—	1,09 (0,73; 1,63)		1;67 (1;02; 2;73)	0,96 (0,66; 1,40)
<b>França</b> (Lacquemant <i>et al.</i> , 2004)	Caso- controle (55/134)	DM2 (OMS*) 54 71%	<i>PCR-direct sequencing</i>	DAC	—	0,82 (0,50; 1,36)		1;65 (0;93; 2;94)	1,37 (0,84; 2,24)
<b>Itália</b> (Bacci <i>et al.</i> , 2004)	Caso- controle (142/234)	DM2 (OMS*) 64/60 64%/43%	<i>PCR and hybridiza- tion</i>	DAC	↔			0,91 (0;61; 1;36)	0,87 (0,63; 1,20)
<b>EUA</b> (Stenvinkel <i>et al.</i> , 2004)	Transversal (204)	DRC ? ?	<i>Pyrose- quencing</i>	DCV	↑ +276T ↔ -11377G ↔ -11391A	1,45 (0,90; 2,32)		2,06 (1,10; 3,83)	0,64 (0,39; 1,03)
<b>Itália</b> (Filippi <i>et al.</i> , 2005)	Caso- controle (508/466)	Não 60.3/50.9 77%/50%	<i>PCR and hybridiza- tion</i>	DAC	↔ +45G ↑ +276T			?	1,27 (1,05; 1,54)
<b>EUA</b> (Qi <i>et al.</i> , 2005)	Caso- controle (239/640)	DM2 (NDDG**) 59.6/55.0 100%/100%	<i>TaqMan- PCR</i>	DCV	↔ +45G ↑ +276T			0,82 (0,59; 1,16)	0,99 (0,79; 1,26)
<b>EUA</b> (Hegener <i>et al.</i> , 2006)	Caso- controle (341/341)	Não 60.2/60.1 100%/100%	<i>TaqMan- PCR</i>	IAM	—	0,92 (0,72; 1,18)		1,08 (0,80; 1,46)	1,04 (0,82; 1,32)
<b>EUA</b> (Hegener <i>et al.</i> , 2006)	Caso- controle (259/259)	Não 62.1/61.7 100%/100%	<i>TaqMan- PCR</i>	AVC	—	0,93 (0,71; 1,21)		0,74 (0,52; 1,06)	1,04 (0,79; 1,36)

**Tabela 1.** Descrição e principais achados dos estudos elegíveis (continuação)

<b>EUA</b> (Qi <i>et al.</i> , 2006)	Caso- controle (280/704)	DM2 (NDDG**) 47/44 0%/0%	<i>TaqMan- PCR</i>	DCV	↔	0,90 (0,72; 1,12)		1,11 (0,81; 1,52)	0,91 (0,72; 1,14)
<b>China</b> (Wang e Li, 2006)	Caso- controle (120/131)	Não 62,5/62,5 77%/77%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—	1,59 (1,12; 2,27)			
<b>Coreia do Sul</b> (Jung <i>et al.</i> , 2006)	Caso- controle (88/68)	Não 60,4/53,4 72%/50%	<i>TaqMan- PCR</i>	DAC	—			1,14 (0,70; 1,87)	1,07 (0,66; 1,74)
<b>Europa</b> (Pischon <i>et al.</i> , 2007)	Caso- controle (1079/2158)	Não ? 76%/76%	<i>TaqMan- PCR</i>	DCV	↔ +45G ↑ +276T			0,99 (0,85; 1,16)	0,92 (0,82; 1,04)
<b>Europa</b> (Gable <i>et al.</i> , 2007)	Caso- controle (269/2503)	Não 56,6/56,0 100%/100%	<i>PCR-RFLP</i>	DCV	—	1,15 (0,95; 1,40)	1,39 (0,33; 5,85) (AA vs. AG/GG)	0,92 (0,69; 1,23)	0,86 (0,70; 1,06)
<b>EUA</b> (Gable <i>et al.</i> , 2007)	Caso- controle (504/557)	Não ? 100%	<i>PCR-RFLP</i>	IAM	—	1,16 (0,96; 1,41)	3,28 (1,35; 8,00) (AA vs. AG/GG)	1,00 (0,80; 1,26)	0,90 (0,74; 1,09)
<b>China</b> (Lu <i>et al.</i> , 2007)	Caso- controle (131/135)	Não 58,4/60,7 69%/63%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—				0,50 (0,35; 0,72)
<b>Áustria</b> (Hoefle <i>et al.</i> , 2007)	Coorte (402)	Não ? ?	?	DAC	↓	1,55 (0,96; 2,53)			
<b>Japão</b> (Yoshida <i>et al.</i> , 2007)	Caso- controle (1113/1569)	Não 62/66 90%/78%	Outro	IAM	—	1,33 (1,09; 1,62)			
<b>China</b> (Liang <i>et al.</i> , 2008)	Caso- controle (100/100)	Não 45,7/60,8 66%/65%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—				0,63 (0,42; 0,93)
<b>Japão</b> (Yamada <i>et al.</i> , 2008)	Caso- controle (313/971)	SM 67,0/68,2 62%/49%	Outro	AVCi	—	1,32 (1,08; 1,62)			

**Tabela 1.** Descrição e principais achados dos estudos elegíveis (continuação)



<b>Japão</b> (Oguri <i>et al.</i> , 2009)	Caso- controle (773/1114)	SM 64,8/68,3 77%/51%	Outro	IAM	—			1,28 (1,10; 1,48)	
<b>China</b> (Chang <i>et al.</i> , 2009)	Caso- controle (600/718)	Não 63,8/51,1 78%/53%	PCR-RFLP	DAC	—			0,76 (0,64; 0,90)	
<b>França</b> (Foucan <i>et al.</i> , 2010)	Caso- controle (57/159)	DM2 68,0/63,0 51%/36%	TaqMan- PCR	DAC	?			3,10 (1,10; 8,72) (GG/GT vs. TT)	
<b>China</b> (Zhang <i>et al.</i> , 2009)	Caso- controle (205/130)	Não 65,0/63,0 63%/50%	PCR-RFLP	DAC	—	1,49 (1,05; 2,10)		0,87 (0,62; 1,22)	0,86 (0,62; 1,20)
<b>China</b> (Zhong <i>et al.</i> , 2010)	Caso- controle (198/237)	Não 60,6/54,5 54%/46%	TaqMan- PCR	DAC	—	1,24 (0,91; 1,69)			
<b>Itália</b> (De Caterina <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (1864/1864)	Não 39,5/39,6 89%/89%	TaqMan- PCR	IAM	—	0,98 (0,88; 1,09)			1,00 (0,90; 1,10)
<b>China</b> (Xu e Ling, 2010)	Caso- controle (1864/1864)	Não 66,3/66,3 54%/53%	PCR-RFLP	DAC	—			1,78 (1,09; 2,90)	
<b>China</b> (Leu, Chung, Chuang, <i>et al.</i> , 2011)	Coorte (80/3250)	Não 59,1/50,0 53%/45%	Outro	AVC	—				1,14 (0,81; 1,61)
<b>China</b> (Chen <i>et al.</i> , 2010)	Caso- controle (357/345)	Não 63,6/53,7 60%/61%	TaqMan- PCR	AVC	—	1,17 (0,91; 1,51)		1,55 (1,20; 1,99)	
<b>Itália</b> (Chiodini <i>et al.</i> , 2010)	Caso- controle (503/503)	Não 56,5/54,7 89%/96%	TaqMan- PCR	IAM	—	1,23 (0,99; 1,51)	2,52 (0,49; 13,0) AA vs. GA/GG	1,55 (1,20; 1,99)	0,81 (0,67; 0,98)
<b>Reino Unido</b> (Prior <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (85/298)	DM1 71,0/68,2 64%/51%	PCR-RFLP	DAC	↔	0,12 (0,02; 0,93) GG vs. GC/CC	4,60 (0,91; 23,2) AA vs. GA/GG		
<b>Espanha</b> (Rodriguez- Rodriguez <i>et al.</i> ,	Caso- controle (119/555)	AR ? 27%	TaqMan- PCR	DCV	↔	1,01 (0,73; 1,40)			0,79 (0,57; 1,09)






**Tabela 1.** Descrição e principais achados dos estudos elegíveis (continuação)

2011) <b>Espanha</b> (Al-Daghri <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (123/297)	DM2 (?) 69.4/60.7 60%/70%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—		1,77 (1,21; 2,59)	1,00 (0,73; 1,35)
<b>China</b> (Liu <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (302/338)	Não 65.7/64.4 64%/62%	<i>PCR-RFLP</i>	AVCi	—	1,38 (1,08; 1,76)	1,17 (0,91; 1,51)	1,11 (0,88; 1,41)
<b>Irã</b> (Sabouri <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (329/106)	Não 58,4/47,6 64%/56%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—		4,62 (1,98; 10,8)	
<b>Irã</b> (Esteghamati <i>et al.</i> , 2012)	Caso- controle (144/127)	Não 61,1/51,1 39%/56%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	?		1,68 (1,15; 2,46)	0,54 (0,36; 0,82)
<b>Tunísia</b> (Boumaiza <i>et al.</i> , 2011)	Caso- controle (212/104)	Não 60,6/59,4 70%/56%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	—		1,14 (0,73; 1,77)	0,75 (0,53; 1,07)
<b>Japão</b> (Katakami <i>et al.</i> , 2012)	Caso- controle (213/2424)	DM2 58,1/54,6 66%/61%	Outro	DCV	↔			0,72 (0,57; 0,91)
<b>Brasil</b> (Oliveira <i>et al.</i> , 2012)	Transversal (603)	CV risk 60 57%	Outro	DAC	↑ + 45G ↔ + 276T - 11391	1,02 (0,36; 3,16)	2,45 (1,05; 6,04)	1,89 (1,04; 3,45)
<b>China</b> (Gui <i>et al.</i> , 2012)	Caso- controle (438/443)	Não 60/60 73%/67%	<i>TaqMan- PCR</i>	DAC	↔			1,53 (1,21; 1,93)
<b>Qatar</b> (Rizk <i>et al.</i> , 2013)	Caso- controle (142/122)	Não 54/35 92%/87%	<i>TaqMan- PCR</i>	IAM	↑ + 45G ↔ + 276T		2,77 (1,03; 6,96) (GG vs. TT+GT)	1,54 (0,59; 2,25) (TT vs. GG+GT)
<b>Grécia</b> (Antonopoulos <i>et al.</i> , 2013)	Caso- controle (462/132)	Não 64,9/63,4 86%/83%	<i>PCR-RFLP</i>	DAC	↓		1,96 (0,39; 9,34) (GG vs. TT+GT)	0,61 (0,29; 1,28) (TT vs. GG+GT)
<b>Romênia</b> (Gherman <i>et al.</i> , 2013)	Caso- controle (226/120)	Não 63/62 82%/80%	<i>PCR-RFLP</i>	DAP	↑ + 45G ↔ + 276T		1,00 (0,59; 1,70)	1,05 (0,67; 1,66)

**Tabela 1.** Descrição e principais achados dos estudos elegíveis (continuação)

<b>China</b> (Tong <i>et al.</i> , 2013)	Caso- controle (560/550)	DM2 61/66 43%/55%	<i>TaqMan- PCR</i>	DAC	 + 276T  - 11377G	1,64 (1,35; 2,01)	0,83 (0,67; 1,03)
---	--------------------------------	-------------------------	------------------------	-----	--	-------------------	-------------------

DM2: diabetes mellitus tipo 2; OMS: Organização Mundial da Saúde; NDDG: *National Diabetes Data Group*; SM: síndrome metabólica; AR: artrite reumatoide; DRC: doença renal crônica; PCR: *Polymerase Chain Reaction*; RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; DAC: doença arterial coronariana; DC: doença coronariana; DCV: doença cardiovascular; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; AVCi: acidente vascular cerebral isquêmico; DAP: doença arterial periférica; risco CV: risco cardiovascular. As setas indicam o sentido da associação do alelo menos frequente dos SNPs avaliados com a concentração circulante de adiponectina (: aumento; : redução; : ausência de associação). Todos os SNPs foram avaliados segundo modelo de herança aditivo, exceto quando especificado outro modelo no corpo da tabela.

#### 4. JUSTIFICATIVA

As DCNT, principais responsáveis pela carga global de doenças, guardam forte relação com a obesidade. Apesar do importante avanço científico que ocorreu nos últimos 20 anos, há ainda muitas lacunas no conhecimento dos caminhos que relacionam obesidade e morbidade crônicas.

A redução da produção de adiponectina em resposta ao acúmulo de gordura corporal é atualmente considerada como um dos potenciais mediadores da relação entre obesidade e disfunções metabólicas. Nesse contexto, evidências provenientes de estudos epidemiológicos observacionais sugerem que a adiponectina tem efeito protetor sobre diversos fenótipos que aumentam o risco cardiovascular. Todavia, não é possível, com base nessas evidências, distinguir se a adiponectina de fato exerce efeitos cardioprotetores ou se é apenas um marcador de risco de DCV.

Com a finalidade de melhorar a inferência causal a partir de estudos observacionais, a abordagem conhecida como aleatorização mendeliana propõe o uso de polimorfismos genéticos como *proxy* de exposições modificáveis. O gene que codifica para adiponectina, *ADIPOQ*, é altamente polimórfico e diferentes SNPs nesse gene estão associados de maneira forte e consistente com as concentrações circulantes da proteína.

Desse modo, o uso de polimorfismos no *ADIPOQ* como *proxy* da concentração de adiponectina é estratégico para elucidar o papel da proteína na etiologia das DCV, o que tem importante implicação terapêutica e para a pesquisa. Os estudos disponíveis que avaliaram a associação de polimorfismos no gene *ADIPOQ* e desfechos cardiovasculares têm diversas limitações metodológicas: (I) baixo poder em razão do pequeno tamanho amostral ou do uso de polimorfismos isolados, que explicam uma fração modesta da variabilidade da adiponectinemia; (II) inclusão de outros loci, além do *ADIPOQ*, que podem ter relação pleiotrópica com o desfecho; (III) ausência de dados sobre a concentração sanguínea de adiponectina.

A coorte de nascimentos de Pelotas do ano de 1982 acompanhou, até o momento, os indivíduos do nascimento aos 30 anos e dispõe de dados de varredura genômica, além de informações detalhadas sobre composição

corporal, aspectos sociodemográficos e comportamentais ao longo da vida. Tal fonte de dados permitirá contornar as limitações das pesquisas previamente citadas. Além disso, o fato de a população de estudo ser miscigenada possibilitará explorar os efeitos de diferentes ancestralidades genômicas, fator frequentemente elencado como potencial explicação para a heterogeneidade entre os estudos genéticos. Ainda, pretende-se usar as informações disponíveis sobre diferentes depósitos de gordura para avaliar a associação independente de cada um com a concentração de adiponectina, uma vez que a redução da adiponectinemia parece não ser apenas função da adiposidade total, mas também da distribuição de gordura corporal.

## **5. OBJETIVOS**

O presente projeto tem como objetivos avaliar a associação da concentração sanguínea de adiponectina com diferentes padrões de distribuição de gordura corporal e seu efeito sobre fatores de risco e sobre a incidência de DCV em adultos.

### **5.1 Objetivos Específicos**

- Explorar a associação da concentração sanguínea de adiponectina com a distribuição de gordura corporal e com os diferentes depósitos adiposos (subcutâneo gluteofemoral, subcutâneo abdominal e visceral) em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982.
- Investigar o efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre fatores de risco para DCV (perfil lipídico, pressão arterial, hemoglobina glicada e proteína C reativa) em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982, utilizando aleatorização mendeliana.
- Avaliar o efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre a incidência de DCV em adultos por meio de revisão sistemática com metanálise, utilizando os princípios da aleatorização mendeliana.

## 6. HIPÓTESES

- A redução da concentração de adiponectina com o aumento da adiposidade está relacionada ao acúmulo de gordura abdominal visceral, mas não ao acúmulo de gordura abdominal subcutânea ou gluteofemoral.
- Maiores concentrações de adiponectina resultam em melhor perfil lipídico e em menores valores de pressão arterial, hemoglobina glicada e proteína C reativa.
- Indivíduos com maiores concentrações de adiponectina apresentam redução modesta do risco de desenvolver doença cardiovascular.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

A apresentação da metodologia dos três estudos planejados foi dividida em dois itens. No primeiro item (7.1), são descritos os dois estudos originais, que utilizam a mesma fonte de dados (Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1982), mas que são distintos no que tange às variáveis de estudo e ao plano de análise. O segundo item (7.2) foi dedicado à descrição do estudo 3 (revisão sistemática).

### 7.1. Metodologia dos estudos 1 e 2

*Estudo 1: Associação da concentração sanguínea de adiponectina com diferentes padrões de distribuição de gordura corporal*

*Estudo 2: Efeito da adiponectina sobre fatores de risco cardiovascular em adultos jovens - análise de aleatorização mendeliana*

#### 7.1.1. Fonte dos dados

Coorte de nascimentos iniciada no ano de 1982 na cidade de Pelotas.

#### 7.1.2. Metodologia da coorte de Pelotas de 1982

Na cidade de Pelotas, há atualmente três coortes de nascimentos (1982, 1993 e 2004), que contêm dados sobre saúde e condições de vida ao longo do tempo. A coorte de 1982 abrange todos os nascimentos hospitalares (99,2% do total de nascimentos) da área urbana do município, do dia primeiro de janeiro até o dia 31 de dezembro deste ano. Foram incluídas no estudo as crianças cujas mães residiam na área urbana de Pelotas e no bairro Jardim América, que fazia parte de Pelotas na época, mas que hoje pertence ao município de Capão de Leão.

O estudo começou como uma pesquisa sobre saúde perinatal, sendo que 5.914 crianças nascidas vivas compuseram a coorte. As mães foram entrevistadas logo após o parto por uma equipe treinada. Foram aplicados questionários padronizados que incluíram informações sobre fatores socioeconômicos, demográficos, ambientais e relacionados à saúde. Além disso, foram realizadas medidas antropométricas nas mães e nas crianças (VICTORA e BARROS, 2006b; HORTA *et al.*, 2015).

A Coorte de 1982 teve nove visitas de acompanhamento até o presente momento. As visitas foram realizadas nas idades de um, dois, quatro, 13, 15, 18, 19, 23 e 30 anos (**Tabela 2**). O percentual de acompanhamento na última visita (2012) foi de 68% da coorte original, respectivamente, também considerando os óbitos como localizados. Os dados do presente projeto serão oriundos, principalmente, do acompanhamento aos 30 anos (2012). A logística do acompanhamento de 2012, os instrumentos de coleta dos dados que serão usados neste estudo e os aspectos éticos são descritos a seguir (itens 7.1.3 a 7.1.5).

**Tabela 2** - Acompanhamentos realizados na Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1982.

Ano calendário	Idade (anos)	Público-alvo
1982	0	Todos os nascidos vivos nas maternidades de Pelotas em 1982
1983	1	Todos os participantes nascidos entre janeiro e abril de 1982
1984	2	Todos os participantes da coorte de 1982
1986	3,5	Todos os participantes da coorte de 1982
1995	13	20% dos participantes da coorte de 1982
1997	15	27% dos participantes da coorte de 1982
2000	18	Todos os participantes do sexo masculino da coorte de 1982
2001	19	27% dos participantes da coorte de 1982
2004	22	Todos os participantes da coorte de 1982
2012	30	Todos os participantes da coorte de 1982



### 7.1.3. Logística do acompanhamento de 2012

As estratégias de localização dos membros da coorte tiveram início nos quatro meses que antecederam o trabalho de campo. Com base nas informações de contato coletadas no acompanhamento anterior (2004-2005), tentou-se o contato telefônico com os indivíduos. Nos casos em que o contato telefônico não teve sucesso, fez-se visita ao domicílio ou, nos casos de pessoas que haviam se mudado, contato com parentes ou antigos vizinhos. Outras estratégias adotadas consistiram de buscas em sítios da *web* (*Google* e *Facebook*), colocação de cartazes em todas as linhas de ônibus e em diferentes pontos da cidade e utilização de meios de comunicação (rádio e televisão locais).

A equipe de coleta de dados foi selecionada pelos seguintes critérios: ter mais de 18 anos de idade, ensino médio completo e disponibilidade de 40h semanais. Os treinamentos de todos os instrumentos utilizados (questionários e equipamentos) ocorreram entre abril e maio de 2012, sob a responsabilidade dos pesquisadores e doutorandos envolvidos. No dia 29 de maio de 2012, foi realizado um estudo piloto para avaliar a adequação da logística do acompanhamento.

O trabalho de campo teve início no dia 4 de junho de 2012 e foi inteiramente conduzido na clínica situada nas dependências do prédio B do Centro de Pesquisas Epidemiológicas. Após confirmação da identidade e do cadastro, o participante recebia crachá contendo sua identificação (com código de barras) e a lista dos exames e entrevistas que deveriam ser realizados. Em seguida, fazia-se a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por uma entrevistadora treinada. Além da assinatura do TCLE, o indivíduo deveria marcar cada procedimento que concordasse em participar. Foi disponibilizada uma equipe de entrevistadoras para fazer as entrevistas e medidas no domicílio daqueles que não puderam comparecer na clínica.

Nas entrevistas, eram aplicados os instrumentos: questionário geral, questionário confidencial (auto-aplicado), Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e instrumentos de saúde mental – M.I.N.I. e QI - WAIS (aplicados em entrevistas com psicólogos). Os questionários foram desenvolvidos em um *software* específico para coleta de dados, o Pendragon com o auxílio de

*netbooks*. Todas as entrevistas eram armazenadas em um servidor específico, imediatamente após sua conclusão. A programação de *scripts* para pré-/pós-processamento foi feita utilizando-se o *software* estatístico Stata para tratamento de dados, identificação e correção de inconsistências.

Os seguintes exames eram realizados: pletismografia (BodPod), densitometria (DXA), avaliação das dimensões corporais (3D Photonic Scanner), espirometria, ultrassom de carótidas, ultrassom abdominal, coleta de sangue, antropometria (pregas cutâneas subescapular, tricipital e suprailíaca; circunferências da cintura e do quadril; perímetro braquial; altura e altura sentado), dinamometria, velocidade da onda de pulso (VOP) e pressão arterial. Todos os procedimentos foram submetidos a controle de qualidade. Em relação aos exames, os aparelhos foram calibrados regularmente conforme recomendação dos fabricantes.

#### 7.1.4. Instrumentos

Os instrumentos de coleta dos dados que serão utilizados no presente projeto são descritos a seguir. Todos os dados são provenientes do acompanhamento de 2012, com exceção dos dados de varredura genômica (acompanhamento de 2004).

Para a coleta das informações sobre nível socioeconômico (classe social e escolaridade) e comportamentos relacionados à saúde (tabagismo, consumo de álcool e atividade física de lazer), foram utilizados questionários padronizados. Os questionários estão disponíveis em: [www.epidemioufpel.org.br](http://www.epidemioufpel.org.br).

Medidas antropométricas foram coletadas por antropometristas treinados e padronizados (VICTORA e BARROS, 2006b; HORTA *et al.*, 2015). Como *proxy* da gordura gluteofemoral, será utilizada a estimativa de massa de gordura ginecoide obtida pela técnica de absorciometria de dupla emissão de raios X (DXA), a partir do Densitômetro Ósseo com Raio-X baseado em enCORE (modelo Lunar Prodigy – marca GE Healthcare®). Foram excluídos indivíduos com suspeita de gravidez, com peso superior a 120 kg e com implantes de metais.

Para as medidas de gordura abdominal, utilizou-se o aparelho de ultrassom da marca Toshiba, modelo *Xario*, com transdutor convexo eletrônico de 3,5MHz. As medidas foram realizadas no ponto de encontro da linha do processo xifoide e a circunferência da cintura. A espessura da gordura visceral corresponde à distância entre do peritônio à coluna lombar no plano sagital e a espessura da gordura abdominal subcutânea, à distância no plano transversal entre a pele e a linha alba. Não foi solicitado jejum aos participantes. A coleta de imagem seguiu protocolo desenvolvido na Universidade de Cambridge (*Medical Research Council*). Os erros intra-observador foram de 4,1% e 3,4% para as medidas de espessura visceral e subcutânea, respectivamente, e o erro inter-observadores foi de 3,1% para ambas as medidas.

A pressão arterial foi aferida em dois momentos por meio de esfigmomanômetro digital, modelo HEM-705CPINT (Omron Healthcare, Inc., Illinois, EUA). Dois tipos de manguito foram utilizados: um para indivíduos de peso normal e outro para indivíduos obesos.

As análises bioquímicas foram realizadas em plasma ou soro armazenado a -80°C. A proteína C reativa foi dosada por turbidimetria com metodologia ultra-sensível. As dosagens de colesterol total, HDL-c e LDL-c foram realizadas por método colorimétrico enzimático, usando o analisador químico BS 380 Mindray. A hemoglobina glicada foi analisada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) associada à cromatografia de troca iônica. A concentração sérica de adiponectina será determinada por meio da técnica ELISA com o kit Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN).

A varredura genômica dos indivíduos foi feita pela empresa Illumina (San Diego, California) usando o *Human Omni 2.5-8v1 array*. Foram genotipados 2,5 milhões de SNPs em 3736 indivíduos. Como mencionado anteriormente, foram utilizadas amostras de DNA do acompanhamento de 2004.

#### 7.1.5. Aspectos éticos

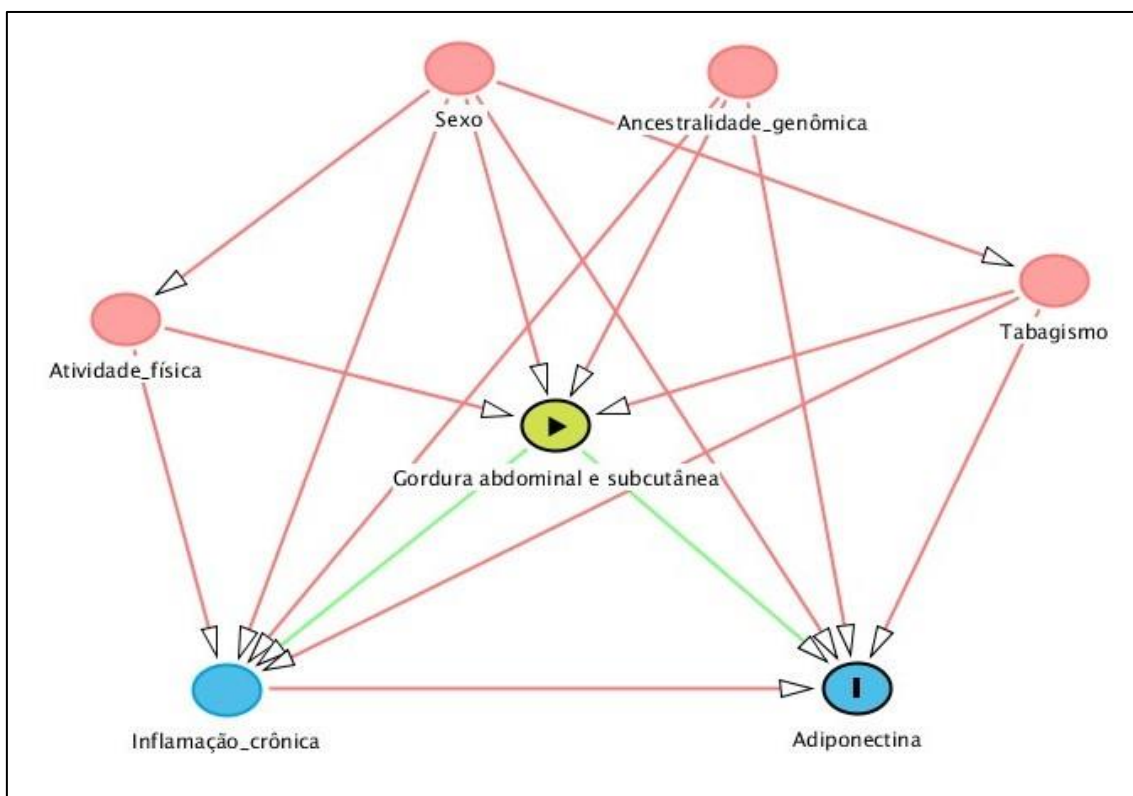
Os estudos perinatais e os diferentes acompanhamentos da Coorte de 1982 foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas. Nas etapas iniciais, foi obtido consentimento informado verbal. Nas demais visitas foram solicitados consentimentos informados escritos. A

autorização para os procedimentos de genotipagem foi obtida separadamente com assinatura de termo de consentimento.

#### 7.1.6. Plano de análise do estudo 1

##### *Relação entre adiponectina e distribuição de gordura corporal*

As relações causais entre as variáveis de estudo estão representadas pelo diagrama abaixo (**Figura 8**).



**Figura 8.** Gráfico acíclico direcionado (DAG) representando a relação dos depósitos de gordura abdominal e subcutâneo com a concentração sanguínea de adiponectina. As setas verdes representam caminhos causais entre exposição e desfecho. O diagrama foi construído com o auxílio do software Dagitty (disponível em <http://www.dagitty.net>).

*Desfecho:*

- Concentração sanguínea de adiponectina ( $\mu\text{g/mL}$ )

*Exposições:*

- Massa (em kg) do depósito adiposo subcutâneo gluteofemoral (SGF), medido pelo DXA, e espessura (em cm) do depósito abdominal subcutâneo (AS) e abdominal visceral (AV), medida pelo US
- Razão entre a massa dos diferentes depósitos: AS/SGF, AV/SGF e AV/AS
- Padrões de distribuição de gordura corporal, derivados da análise de componentes principais (ACP) das variáveis SGF, AS e AV

*Potenciais confundidores*

O ajuste para potenciais confundidores levará em conta o DAG da relação entre as exposições e o desfecho (**Figura 8**). Como se pode observar pelo diagrama, as variáveis ancestralidade genômica, sexo, tabagismo e atividade física, representadas pela cor rosa, são ancestrais da exposição e do desfecho. Já inflamação crônica é ancestral apenas do desfecho. De acordo com a teoria dos DAG, controlar para ancestralidade genômica, sexo, tabagismo e atividade física constitui o ajuste mínimo para obter o efeito causal total de cada depósito de gordura corporal sobre a concentração de adiponectina. Optou-se por omitir do DAG a variável idade, devido a pouca variabilidade na nossa população de estudo.

A variável ancestralidade genômica foi derivada a partir dos dados de varredura genômica. Do total de SNPs genotipados, foram utilizados aproximadamente 370 mil que estavam disponíveis tanto para a amostra da coorte de Pelotas, quanto para as amostras dos painéis de referência (*HapMap* e *Human Genome Diversity Project* - HGDP). Do HapMap, foram utilizados 266 indivíduos africanos (populações Yoruba e Luhya), 262 europeus (italianos e norte americanos descendentes de europeus), 77 mexicanos-americanos miscigenados e 83 afro-americanos. Além destes, foram incluídos 93 indivíduos nativo-americanos do HGDP. O programa ADMIXTURE foi utilizado para estimar a ancestralidade genômica (ALEXANDER, DAVID H. *et al.*, 2009). Os dados foram sintetizados por meio de ACP. Os componentes principais resultantes foram utilizados para estimar a proporção de ancestralidade

européia, africana e nativo-americana de cada indivíduo. Para a presente análise, os indivíduos serão divididos em quintis de ancestralidade africana. As demais ancestralidades não serão consideradas no modelo, pois a ancestralidade europeia está altamente correlacionada com a africana (coeficiente de correlação de Pearson = -0,97) e a ancestralidade nativo-americana está presente em proporções muito baixas na população de estudo.

A variável atividade física será considerada apenas no domínio do lazer utilizando dados do *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ). Os indivíduos serão classificados em inativos (< 10 minutos de atividade física/semana), insuficientemente ativos (10-149 minutos/semana) e ativos ( $\geq$  150 minutos/semana).

Os dados sobre tabagismo foram coletados por meio de questionários padronizados. Os indivíduos serão classificados a partir do número atual de cigarros fumados por dia: não fumante (0 cigarro/dia), fumante leve (1-20 cigarros/dia), fumante pesado (> 20 cigarros/dia).

#### *Potenciais modificadores de efeito e mediadores*

Serão considerados como possíveis modificadores de efeito o sexo e a proporção de ancestralidade africana (em quintis)

A concentração sanguínea de proteína C reativa será avaliada como potencial mediador, por ser um marcador de inflamação sistêmica.

#### *Plano de análise*

As variáveis independentes (SGF, AS, AV, AS/SGF, AV/SGF e AV/AS) e a variável dependente (concentração de adiponectina) terão sua distribuição avaliada por meio de histogramas e serão descritas segundo medidas de tendência central e de dispersão. Dependendo do tipo de distribuição de cada variável, considerar-se-á utilizar transformações que a aproximem da distribuição normal. Serão criados padrões de distribuição de gordura corporal a partir dos valores de SGF, AS e AV por meio de ACP. Os padrões que explicarem frações expressivas da variância serão selecionados a partir da análise dos *scree plots*.

Inicialmente, será feita análise de correlação de cada variável independente com a concentração sanguínea de adiponectina. Além disso,

com o objetivo de avaliar a presença de colinearidade entre as variáveis independentes, será analisada a correlação entre os depósitos adiposos (SGF, AS e AV). Modelos de regressão linear serão ajustados para avaliar a magnitude da associação independente de cada depósito adiposo (SGF, AS, AV) (modelo I), das razões entre os depósitos de gordura (AS/SGF, AV/SGF e AV/AS) (modelo II) e dos padrões de distribuição de gordura corporal (ACP) (modelo III) com a concentração sanguínea de adiponectina. Os modelos I e III serão ajustados por adiposidade total, além dos confundidores anteriormente listados.

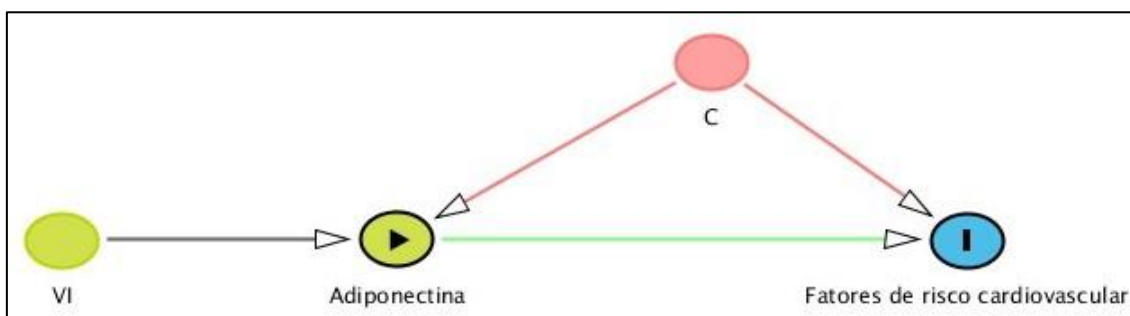
Sexo e ancestralidade africana serão investigados como potenciais modificadores de efeito da relação exposições-desfecho. Para isso, termos de interação (sexo\*exposição e ancestralidade africana\*exposição) serão incluídos nos modelos de regressão linear ajustados. Se não houver evidência de modificação de efeito ( $p > 0,10$ ), ambas as variáveis serão utilizadas apenas como variáveis de ajuste para controle de confusão.

A concentração de proteína C reativa será avaliada como possível mediador da relação entre distribuição de gordura corporal e adiponectina. Para a análise de mediação, serão estimados os efeitos naturais direto e indireto por meio da G-fórmula (RICHIARDI *et al.*, 2013). O efeito natural direto representa o efeito da exposição (depósitos/distribuição de gordura) sobre o desfecho (adiponectina) que não passa pelo mediador (proteína C reativa) e o efeito natural indireto representa o efeito que passa pelo mediador. A soma dos efeitos naturais direto e indireto corresponde ao efeito total e a divisão da estimativa do efeito natural indireto pelo total resulta na proporção do efeito atribuível ao mediador. Os mesmos confundidores citados anteriormente (ancestralidade genômica, sexo, tabagismo e atividade física) serão considerados na análise de mediação.

### 7.1.7. Plano de análise do estudo 2

#### Efeito da adiponectina sobre fatores de risco cardiovascular

As relações causais entre as variáveis de estudo estão representadas pelo diagrama abaixo (**Figura 9**).



**Figura 9.** Gráfico acíclico direcionado (DAG) representando a relação da concentração sanguínea de adiponectina com fatores de risco cardiovascular. As setas verdes representam caminhos causais entre exposição e desfecho. VI: variável instrumental; C: confundidores. O diagrama foi construído com o auxílio do software Dagitty (disponível em <http://www.dagitty.net>).

#### Desfechos:

- Hemoglobina glicada (%)
- Perfil lipídico: concentração sanguínea de HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilgliceróis (mmol/L)
- Pressão sistólica e diastólica (mmHg)
- Concentração sanguínea de proteína C reativa (mg /L)

#### Exposição:

- Concentração sanguínea de adiponectina ( $\mu\text{g/mL}$ )

#### Variável instrumental

A variável instrumental (IV) para a avaliação do efeito causal de níveis de adiponectina sobre os fatores de risco cardiovascular será composta por SNPs no gene *ADIPOQ*. As VI serão analisadas como SNPs individuais e como escores de risco genético.



Os SNPs serão selecionados com o intuito de obter o menor conjunto de polimorfismos que identifique a maior variabilidade genética possível. Diferentes populações de referência do HapMap e do HGDP (ancestralidade europeia e africana) serão utilizadas para identificar SNPs no *locus ADIPOQ* e em seus arredores (dentro de 50kbp *up* e *downstream*). A ferramenta *Haploview* será utilizada para avaliar o padrão de DL e para identificar os *tagging* SNPs que comporão o escore (BARRETT *et al.*, 2005). No caso de forte DL entre duas variantes genéticas ( $R^2 > 0,90$ ), uma delas será excluída. A presença de equilíbrio de Hardy-Weinberg dos SNPs será testada por meio do teste exato de Fisher comparando frequências genotípicas observadas e esperadas. SNPs que não estiverem em equilíbrio de Hardy-Weinberg também serão excluídos.

Em seguida, será avaliada a associação dos *tagging* SNPs com a concentração circulante de adiponectina por meio de regressão linear. SNPs que apresentarem valores de p maiores que  $1 \times 10^{-5}$  serão excluídos. Os SNPs selecionados serão utilizados para compor o escore de risco genético. Esse escore será ponderado pela magnitude do efeito (coeficiente de regressão) de cada SNP sobre a concentração circulante de adiponectina, considerando um modelo de herança aditivo (genótipos codificados como 0, 1 e 2). O escore construído será submetido a um processo de validação interna. Para isso, metade da amostra, selecionada aleatoriamente, será usada para derivar o escore, que servirá de variável instrumental para a outra metade. A segunda metade, por sua vez, será utilizada para derivar outro escore, que será usado como variável instrumental para a primeira metade da amostra. O resultado das duas análises será combinado usando efeito fixo pelo método do inverso da variância.

#### *Potenciais fatores de confusão*

No quadro abaixo, são definidos os potenciais confundidores da relação entre exposição (adiponectina) e desfechos (fatores de risco cardiovascular).

**Quadro 1** - Potenciais confundidores da relação entre adiponectina e fatores de risco cardiovascular

Variável conceitual	Variável operacional	Categorias/unidade de medida
<b>Classe social</b>	Classificação da ABEP <sup>1</sup>	Classe A Classe B Classe C Classe D + E
<b>Escolaridade</b>	Anos completos de estudo	0-4 anos 5-8 anos 9-11 anos 12 ou mais anos
<b>Sexo</b>	Sexo	Masculino Feminino
<b>Tabagismo</b>	Número de cigarros por dia	Não fumante (0 cigarro/dia) Fumante leve (1-20 cigarros/dia) Fumante pesado (> 20 cigarros/dia)
<b>Consumo de álcool</b>	Número de doses de bebida alcóolica por dia	0 dose/dia 1 dose/dia ≥ 2 doses/dia
<b>Atividade física no lazer</b>	Nível de atividade física <sup>2</sup>	Inativo (< 10 minutos/semana) Insuficientemente ativo (10-149 minutos/semana) Ativo (≥ 150 minutos/semana)

<sup>1</sup> Associação Brasileira de Estudos e Pesquisas

<sup>2</sup> Com base no *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ)

#### *Cálculo do poder do estudo*

A falta de poder é frequentemente uma limitação dos estudos de aleatorização mendeliana. Para estimar o poder do estudo, foram utilizados os parâmetros descritos abaixo nos itens 1 a 4. Os cálculos de poder foram feitos com base na equação proposta por Brion et al. (2013), com o auxílio do algoritmo disponível no link (<http://glimmer.rstudio.com/kn3in/mRnd/>):

1-  $\beta$ : coeficiente de regressão do suposto efeito da adiponectina sobre os desfechos (livre de confundimento, vieses e causalidade reversa), obtido pela análise de VI. Foram feitas três simulações, contemplando uma variação de 0,10, 0,20 e 0,30 desvio-padrão de cada desfecho considerando o aumento de 1 desvio-padrão da concentração de adiponectina;

2-  $\sigma_x^2$ : variância da variável de exposição padronizada (concentração sanguínea de adiponectina em desvios-padrão) ( $1^2 = 1$ );

3-  $\sigma_y^2$ : variância da variável desfecho padronizada ( $1^2 = 1$ );

4-  $R^2$ : variância da exposição explicada pela variável instrumental. Com base na literatura, considerou-se 5%.

5- Tamanho da amostra: 2500

Considerando os parâmetros acima listados, estima-se que o poder do estudo seja de 20%, 63% ou 94%, considerando  $\beta$  de 0,10, 0,20 e 0,30, respectivamente.

### *Análise dos dados*

#### Associação entre adiponectina e fatores de risco cardiovascular

Modelos de regressão linear serão usados para investigar a associação entre adiponectina e fatores de risco cardiovascular, de forma bruta e ajustada pelos fatores de confusão listados abaixo no Quadro 1. Cabe destacar que também será avaliado se os fatores de confusão estão associados à VI.

#### Efeito da adiponectina sobre fatores de risco cardiovascular usando as VI

Em primeiro lugar, será ajustado um modelo de regressão linear tendo como exposição a VI e como desfecho os fatores de risco cardiovascular. Após isso, o efeito da adiponectina sobre os desfechos de interesse será estimado utilizando o método da soma dos quadrados mínimos em dois estágios. Para isso, será ajustado um modelo de regressão linear tendo como exposição a VI e como desfecho a concentração sanguínea de adiponectina. Em seguida, outro modelo de regressão linear será ajustado para os desfechos de interesse (fatores de risco cardiovascular), utilizando como variável independente os valores preditos do primeiro modelo. As análises com as variáveis instrumentais serão realizadas com o comando `ivreg2` do pacote STATA 12.1. Todas as análises envolvendo os SNPs individuais ou o escore de risco genético serão ajustadas para os 10 principais componentes de ancestralidade, a fim de controlar para a possível estratificação da população.

#### Comparação da análise de variáveis instrumentais com análise convencional

Os resultados da análise de VI e do modelo de regressão linear padrão serão comparados por meio da estatística de Durbin-Wu-Hausman.

## 7.2. Metodologia do estudo 3

*Efeito da adiponectina sobre o risco de doença cardiovascular em adultos - revisão sistemática com metanálise utilizando a abordagem da aleatorização mendeliana*

Será realizada uma busca sistemática por estudos que avaliaram a relação entre SNPs no gene *ADIPOQ* (-11377 C > G, -1391 G > A, +45 T > G e +276 G > T), concentração sanguínea de adiponectina e risco de DCV. Por meio de metanálise, duas estimativas agregadas distintas serão geradas para a diferença entre dois genótipos (AA vs. aa): a diferença média na concentração de adiponectina ( $\Delta_{AA \text{ vs. } aa}$ ) e a razão de odds do desfecho ( $RO_{AA \text{ vs. } aa}$ ). Assumindo os pressupostos da aleatorização mendeliana e supondo uma relação linear entre concentração média de adiponectina e log da RO do desfecho, a  $RO_{AA \text{ vs. } aa}^{1/\Delta P}$  fornecerá uma estimativa do impacto da concentração sanguínea de adiponectina sobre os desfechos de interesse (THOMPSON *et al.*, 2005).

### 7.2.1. Critérios de elegibilidade

Para ser elegível, o estudo precisa atender a três condições: (I) fornecer informações sobre pelo menos um dos polimorfismos (-11377 C > G, -1391 G > A, +45 T > G e +276 G > T), (II) ter dados sobre os desfechos de interesse<sup>5</sup> e (III) avaliar indivíduos sem parentesco (sem estudos familiares).

### 7.2.2. Fontes de informação

Informações de estudos publicados e não publicados (literatura cinza) serão buscadas. Os estudos publicados serão identificados por meio de busca

---

<sup>5</sup> Eventos cardiovasculares fatais e não fatais, como o infarto agudo do miocárdio (IAM), revascularização do miocárdio, acidente vascular cerebral hemorrágico e isquêmico. Estudos em que a informação foi obtida por diagnóstico médico ou registros hospitalares serão considerados. A Classificação Internacional de Doenças versão 2010 (CID-10) proposta pela Organização Mundial da Saúde será utilizada para caracterizar eventos cardiovasculares fatais (códigos I21-I25, I61-I64 e I67-I69), de acordo com os registros de certidões de óbito.

em bases de dados, verificação de listas de referências de artigos, busca específica em revistas da área e pelo contato direto com autores e principais pesquisadores com experiência no assunto. Bases de dados eletrônicas que serão utilizados são: MEDLINE, EMBASE, e *Web of Science*. Além dessas pesquisas, as listas de referência de revisões existentes sobre o tema publicadas no HuGE Published Literature database serão verificadas (LITTLE e HIGGINS, 2006).

Como sugestão da banca de qualificação, avaliaremos a viabilidade de substituir a metanálise de estudos publicados por uma metanálise de dados não publicados de grandes consórcios de pesquisa que tenham dados de varredura genômica, adiponectina e doenças cardiovasculares. Essa medida tem o intuito principal de evitar o viés de publicação provavelmente presente nos estudos de gene-candidato. Os dados serão obtidos pelo contato direto com os investigadores desses consórcios genéticos. São exemplos de estudos elegíveis: Framingham Heart Study, GEMS (*Genetic Etiology of Metabolic Syndrome*), BLSA (*Baltimore Longitudinal Study of Aging*), EPIC (*European Prospective Investigation of Cancer*), BWHHS (*British Women's Heart and Health Study*), MONICA (*Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*), ULSAM (*Uppsala Longitudinal Study of Adult Men*), PRIME (*Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*).

### 7.2.3. Estratégia de busca

As buscas pelos estudos publicados serão restritas a estudos em seres humanos. Não haverá restrição por desenho de estudo ou por data de publicação. Quando possível, serão incorporados termos de indexação (ex: MeSH, Emtree). Combinações das palavras-chave detalhadas a seguir serão utilizadas nas bases de dados.

(adiponectin OR ADIPOQ OR *GBP-28* OR apM1 OR Acrp30 or ACDC)

AND

(genome wide association OR GWA stud\* OR whole genome association analys\* OR genomewide OR genetic loc\* OR genotyp\* OR SNP OR polymorphism OR single nucleotide polymorphism\* OR genetic polymorphism

OR haplotype OR genetic variant\* OR gene variation OR gene variant OR allele)

AND

(cardiovascular disease OR CVD OR coronary disease OR coronary heart disease OR coronary stenosis OR CHD OR myocardial infarction OR coronary artery disease OR ischemic heart disease OR IHD OR myocardial infarct OR myocardial infarction OR coronary artery bypass OR aortocoronary artery bypass OR myocardial revascularization OR angioplasty OR vascular disease OR myocardial ischemia OR myocardial ischaemia OR MI OR heart disease OR atherosclerosis OR aneurysm OR stroke OR apoplexy OR CVA OR cerebrovascular accident\* OR brain vascular accident)

#### *7.2.4. Seleção dos estudos*

A seleção dos estudos será realizada em duas etapas. Na etapa 1, um investigador lerá o título e, em caso de dúvida, o resumo. Na etapa 2, dois investigadores vão examinar o texto completo dos artigos selecionados. A concordância entre os avaliadores será estimada por meio da estatística kappa. Discordâncias serão discutidas com um revisor independente. Estudos identificados nas listas de referências das publicações selecionadas, inclusive revisões sistemáticas de interesse, serão revisados. As referências serão transferidas para o EndNoteWeb® (Reuters, Carlsbad, CA, EUA), onde as duplicatas serão removidas. Nos casos de artigos diferentes com a mesma população de estudo e com as mesmas informações de exposição/desfecho de interesse, será utilizada a publicação mais completa ou a mais atual.

#### *7.2.5. Coleta de dados*

Dois investigadores preencherão um formulário de extração de informações sobre os SNPs (rs, frequência de cada alelo, técnica de genotipagem e equilíbrio de Hardy-Weinberg), a exposição (técnica de dosagem, coeficiente de regressão ou concentrações médias e IC 95% em relação a cada genótipo), os desfechos de interesse (definição, critérios

diagnósticos, magnitude de associação com o genótipo e IC 95%), as características da população (etnia, proporção de homens, idade média, IMC médio, comorbidades — DCV prévia ou diabetes etc —, uso de medicamentos anti-hipertensivos e para dislipidemia e concentrações circulantes de marcadores inflamatórios, como proteína C-reativa e fibrinogênio) e as características do estudo (local, ano, amostra, delineamento do estudo, tamanho amostral, critérios de diagnóstico e variáveis de ajuste ou de pareamento). Inconsistências nos formulários de extração serão analisadas por um terceiro pesquisador.

#### 7.2.6. Plano de análise

A análise estatística será composta por três etapas principais: (1) quantificação da diferença média de adiponectina ( $\Delta_{AA}$  vs.  $aa$ ), (2) quantificação da relação entre cada SNP e o risco ou a mortalidade por DCV ( $RO_{AA}$  vs.  $aa$ ) e (3) avaliação do efeito da adiponectina sobre o risco e a mortalidade por DCV ( $RO^{1/\Delta P}_{AA}$  vs.  $aa$ ).

As medidas de cada estudo (etapas 1 e 2) serão combinadas usando o modelo de efeito fixo com o método de Mantel-Haenszel. Se existir heterogeneidade moderada ou elevada entre estudos, avaliada com base na estatística de  $I^2$  ( $I^2 > 50\%$ ), o modelo de efeitos aleatórios será utilizado (método de Der Simonian e Laird). Para a etapa 3, a relação entre o efeito combinado de SNP-desfechos e o efeito combinado de SNPs-adiponectina será calculada. O método delta será usado para estimar os erros padrão (THOMPSON *et al.*, 2005).

Os dados de cada estudo, bem como seu efeito combinado, serão apresentados em dois gráficos de floresta (*forest plots*): um para a associação SNP-desfechos e outro para SNP-exposição. Além disso, o log da razão de odds dos desfechos segundo genótipo será plotado contra as diferenças médias de adiponectina segundo genótipo, incluindo seus erros padrão, com o objetivo de avaliar se há relação dose-resposta entre adiponectina e desfechos. Em estudos caso-controle, serão considerados apenas os dados da concentração sanguínea de adiponectina do grupo controle, uma vez que a medida está sujeita à causalidade reversa.

A fim de explorar as possíveis fontes de heterogeneidade entre os estudos, serão realizados procedimentos de metaregressão considerando as características listadas no item “Coleta de dados”.

Dois gráficos de funil serão criados com o objetivo de avaliar a presença de viés de publicação na associação entre SNPs no gene *ADIPOQ* e níveis de adiponectina (1) e na associação entre SNPs no gene *ADIPOQ* e risco/mortalidade por DCV (2). A decisão sobre a presença de heterogeneidade será feita por meio de inspeção visual. O teste de regressão de Egger para avaliar assimetria também será usado. Se houver evidência de viés de estudos pequenos, será feita uma análise de sensibilidade utilizando o método *trim-and-fill* no intuito de estimar o potencial efeito desse viés sobre as estimativas agregadas.

A avaliação da qualidade do estudo seguirá as orientações do *Manual HuGE Review Handbook for meta-analysis of genetic association studies* (LITTLE e HIGGINS, 2006). Para estudos com delineamento caso-controle, serão observados os critérios para seleção dos casos (casos prevalentes vs. incidentes, severidade dos casos) e para seleção dos controles (representativos ou não da população que originou os casos). Para estudos de coorte, as perdas de acompanhamento serão avaliadas, especialmente se diferirem por grupo étnico. Em todos os estudos, serão avaliados a técnica de genotipagem e os procedimentos de controle de qualidade devido à possibilidade de viés de informação por erros de genotipagem (diferencial e não diferencial). Em estudos com populações miscigenadas, os procedimentos para controlar para estratificação populacional serão avaliados. Além da avaliação qualitativa do risco de viés de seleção e de informação, será avaliado se os genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em estudos de coorte e no grupo controle de estudos caso-controle.



## 8. CRONOGRAMA

- A) Revisão da literatura;
- B) Elaboração do projeto;
- C) Estágio sanduíche;
- D) Busca e seleção dos estudos para revisão sistemática;
- E) Leitura dos textos completos e preenchimento do formulário de extração;
- F) Análise dos dados;
- G) Elaboração dos artigos científicos;
- H) Defesa da tese.

Atividade	2013		2014		2015		2016
	jan/jun	jul/dez	jan/jun	jul/dez	jan/jun	jul/dez	jan/jun
A	X	X	X	X			
B			X	X			
C				X	X	X	
D				X	X		
E					X		
F					X	X	
G						X	X
H							X

## 9. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os artigos científicos derivados do projeto de doutorado serão publicados em periódicos científicos indexados, nacionais e/ou internacionais. Os resultados do estudo também serão divulgados na imprensa local.

## 10. FINANCIAMENTO

A coorte de Pelotas de 1982 obteve recursos da *Wellcome Trust* para a sua realização. As fases iniciais do estudo de coorte foram financiadas pelo Programa Nacional de Núcleos de Excelência (PRONEX), o Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), Ministério de Saúde (Brasil), *International Development Research Center* (Canadá), *United Nations Development Fund for Women* (Reino Unido). A doutoranda Maria Carolina Borges recebe bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

ABBENHARDT, C. et al. Effects of individual and combined dietary weight loss and exercise interventions in postmenopausal women on adiponectin and leptin levels. **J Intern Med**, v. 274, n. 2, p. 163-75, Aug 2013. ISSN 0954-6820.

ACHARYA, S. D. et al. Weight loss is more important than the diet type in improving adiponectin levels among overweight/obese adults. **J Am Coll Nutr**, v. 32, n. 4, p. 264-71, 2013. ISSN 0731-5724.

AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 5, p. R1220-5, May 2005. ISSN 0363-6119.

AL-DAGHRI, N. M. et al. Adiponectin gene variants and the risk of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 6, p. 3703-8, Aug 2011. ISSN 1573-4978.

ALEXANDER, D. H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655-1664, Sep 2009. ISSN 1088-9051.

ANTONOPOULOS, A. S. et al. Genetic variability on adiponectin gene affects myocardial infarction risk: the role of endothelial dysfunction. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 1, p. 326-30, Sep 2013. ISSN 1874-1754.

ARANETA, M. R. G.; BARRETT-CONNOR, E. Adiponectin and Ghrelin levels and body size in normoglycemic Filipino, African-American, and white women. **Obesity**, v. 15, n. 10, p. 2454-2462, Oct 2007. ISSN 1930-7381.

ARITA, Y. et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-

induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. **Circulation**, v. 105, n. 24, p. 2893-2898, Jun 18 2002. ISSN 0009-7322.

AVERY, P. J. et al. Common variation in the adiponectin gene has an effect on systolic blood pressure. **J Hum Hypertens**, v. 25, n. 12, p. 719-24, Dec 2011. ISSN 1476-5527.

BACCI, S. et al. The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 27, n. 8, p. 2015-20, Aug 2004. ISSN 0149-5992.

BACHA, F. et al. Adiponectin in youth - relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. **Diabetes Care**, v. 27, n. 2, p. 547-552, Feb 2004. ISSN 0149-5992.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, Jan 15 2005. ISSN 1367-4803.

BELARBI, Y. et al. MicroRNA-193b Controls Adiponectin Production in Human White Adipose Tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 8, p. E1084-8, Aug 2015. ISSN 1945-7197.

BERG, A. H. et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 947-953, Aug 2001. ISSN 1078-8956.

BERTHIER, M. T. et al. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. **J Lipid Res**, v. 46, n. 2, p. 237-44, Feb 2005. ISSN 0022-2275.

BEVAN, S. et al. Adiponectin level as a consequence of genetic variation, but not leptin level or leptin: adiponectin ratio, is a risk factor for carotid intima-media thickness. **Stroke**, v. 42, n. 6, p. 1510-4, Jun 2011. ISSN 1524-4628.

BIDULESCU, A. et al. Gender differences in the association of visceral and subcutaneous adiposity with adiponectin in African Americans: the Jackson Heart Study. **Bmc Cardiovascular Disorders**, v. 13, Feb 22 2013.

BOUMAIZA, I. et al. Single-nucleotide polymorphisms at the adiponectin locus and risk of coronary artery disease in Tunisian coronaries. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**, v. 12, n. 9, p. 619-24, Sep 2011a. ISSN 1558-2035.

BOUMAIZA, I. et al. Association between eight adiponectin polymorphisms, obesity, and metabolic syndrome parameters in Tunisian volunteers. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 9, n. 6, p. 419-26, Dec 2011b. ISSN 1557-8518.

BOUND, J.; JAEGER, D. A.; BAKER, R. M. PROBLEMS WITH INSTRUMENTAL VARIABLES ESTIMATION WHEN THE CORRELATION BETWEEN THE INSTRUMENTS AND THE ENDOGENOUS EXPLANATORY VARIABLE IS WEAK. **Journal of the American Statistical Association**, v. 90, n. 430, p. 443-450, Jun 1995. ISSN 0162-1459.

BOYD, A. et al. Cohort Profile: The 'Children of the 90s'-the index offspring of the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 1, p. 111-127, Feb 2013. ISSN 0300-5771.

BOYNE, M. S. et al. Sex-differences in adiponectin levels and body fat distribution: Longitudinal observations in Afro-Jamaicans. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 90, n. 2, p. E33-E36, Nov 2010.

BREITFELD, J.; STUMVOLL, M.; KOVACS, P. Genetics of adiponectin. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2157-2163, Oct 2012. ISSN 0300-9084.

BRION, M.-J. A.; SHAKHBAZOV, K.; VISSCHER, P. M. Calculating statistical power in Mendelian randomization studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 5, p. 1497-1501, Oct 2013. ISSN 0300-5771; 1464-3685.

BURGESS, S.; THOMPSON, S. G. Use of allele scores as instrumental variables for Mendelian randomization. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 4, p. 1134-1144, Aug 2013. ISSN 0300-5771; 1464-3685.

CARDON, L. R.; PALMER, L. J. Population stratification and spurious allelic association. **Lancet**, v. 361, n. 9357, p. 598-604, Feb 15 2003. ISSN 0140-6736.

CARTEGNI, L.; CHEW, S. L.; KRAINER, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 4, p. 285-298, Apr 2002. ISSN 1471-0056.

CHANG, Y. C. et al. Interaction of ADIPOQ genetic polymorphism with blood pressure and plasma cholesterol level on the risk of coronary artery disease. **Circ J**, v. 73, n. 10, p. 1934-8, Oct 2009. ISSN 1347-4820.

CHEN, X. L. et al. [Study on the relationship between polymorphism of adiponectin gene and risk of ischemic stroke among Han population in the Northern parts of China]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 31, n. 2, p. 129-32, Feb 2010. ISSN 0254-6450.

CHIODINI, B. D. et al. Adiponectin gene polymorphisms and their effect on the risk of myocardial infarction and type 2 diabetes: an association study in an Italian population. **The Adv Cardiovasc Dis**, v. 4, n. 4, p. 223-30, Aug 2010. ISSN 1753-9455.

CHOW, W.-S. et al. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension - A 5-year prospective study. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1455-1461, Jun 2007. ISSN 0194-911X.

CHU, H. et al. AdipoQ polymorphisms are associated with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis study. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 29, n. 7, p. 532-45, Oct 2013. ISSN 1520-7552.

CHUNG, H. K. et al. Influence of adiponectin gene polymorphisms on adiponectin level and insulin resistance index in response to dietary intervention in overweight-obese patients with impaired fasting glucose or newly diagnosed type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 4, p. 552-8, Apr 2009. ISSN 1935-5548.

CNOP, M. et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 459-469, Apr 2003. ISSN 0012-186X.

COMBS, T. P. et al. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 12, p. 1875-1881, Dec 2001. ISSN 0021-9738.

COMUZZIE, A. G. et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4321-4325, Sep 2001. ISSN 0021-972X.

DASTANI, Z. et al. Novel Loci for Adiponectin Levels and Their Influence on Type 2 Diabetes and Metabolic Traits: A Multi-Ethnic Meta-Analysis of 45,891 Individuals. **Plos Genetics**, v. 8, n. 3, Mar 2012. ISSN 1553-7404.

DASTANI, Z. et al. The shared allelic architecture of adiponectin levels and coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 1, p. 145-148, Jul 2013. ISSN 0021-9150.

DAVEY SMITH, G. et al. Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects. **Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1484-98, Oct 22-28 2005. ISSN 0140-6736.

DE CATERINA, R. et al. Strong association of the APOA5-1131T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 2, p. 397-403, Feb 2011. ISSN 1879-1484.

DELAIGLE, A. M. et al. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: In vivo and in vitro studies. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5589-5597, Dec 2004. ISSN 0013-7227.

DROLET, R. et al. Fat Depot-specific Impact of Visceral Obesity on Adipocyte Adiponectin Release in Women. **Obesity**, v. 17, n. 3, p. 424-430, Mar 2009. ISSN 1930-7381.

EBRAHIM, S.; SMITH, G. D. Mendelian randomization: can genetic epidemiology help redress the failures of observational epidemiology? **Human Genetics**, v. 123, n. 1, p. 15-33, Feb 2008. ISSN 0340-6717.

EFSTATHIOU, S. P. et al. Smoking cessation increases serum adiponectin levels in an apparently healthy Greek population. **Atherosclerosis**, v. 205, n. 2, p. 632-6, Aug 2009. ISSN 0021-9150.

ENNS, J. E.; TAYLOR, C. G.; ZAHRADKA, P. Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions. **J Obes**, v. 2011, p. 168659, 2011. ISSN 2090-0708.

ENSEMBL PROJECT. E-Esembl. Disponível em: <  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core)>. Acesso em: 22 agosto 2016.

ESTEGHAMATI, A. et al. Association of +45(T/G) and +276(G/T) polymorphisms in the adiponectin gene with coronary artery disease in a population of Iranian patients with type 2 diabetes. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 3791-7, Apr 2012. ISSN 1573-4978.



FANTUZZI, G. Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. 326-330, Feb 2008. ISSN 0091-6749.

FASSHAUER, M. et al. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 3, p. 1084-1089, Jan 25 2002. ISSN 0006-291X.

FASSHAUER, M. et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 4, p. 1045-1050, Feb 21 2003. ISSN 0006-291X.

FERRIS, W. F. et al. The relationship between insulin sensitivity and serum adiponectin levels in three population groups. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 11, p. 695-701, Nov 2005. ISSN 0018-5043.

FILIPPI, E. et al. The adiponectin gene SNP+276G>T associates with early-onset coronary artery disease and with lower levels of adiponectin in younger coronary artery disease patients (age  $\leq$ 50 years). **J Mol Med (Berl)**, v. 83, n. 9, p. 711-9, Sep 2005. ISSN 0946-2716.

FOUCAN, L. et al. Adiponectin multimers and ADIPOQ T45G in coronary artery disease in Caribbean type 2 diabetic subjects of African descent. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 7, p. 1466-8, Jul 2010. ISSN 1930-739X.

FRANCKE, S. et al. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 24, p. 2751-2765, Nov 15 2001. ISSN 0964-6906.

FREDRIKSSON, J. et al. A polymorphism in the adiponectin gene influences adiponectin expression levels in visceral fat in obese subjects. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, n. 2, p. 226-32, Feb 2006. ISSN 0307-0565.

FUMERON, F. et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1150-7, Apr 2004. ISSN 0012-1797.

MENDEL, G. *Experiments in Plant Hybridization* (1865). 1866. Disponível em: <http://www.mendelweb.org/archive/Mendel.Experiments.txt>. Acesso em: 01 abril 2014.

GABLE, D. R. et al. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. **Ann Hum Genet**, v. 71, n. Pt 4, p. 453-66, Jul 2007. ISSN 0003-4800.

GAO, H. et al. Evidence of a Causal Relationship Between Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity. **Diabetes**, v. 62, n. 4, p. 1338-1344, Apr 2013. ISSN 0012-1797.

GAO, M. et al. Association of Genetic Variants in the Adiponectin Gene with Metabolic Syndrome: A Case-Control Study and a Systematic Meta-Analysis in the Chinese Population. **Plos One**, v. 8, n. 4, Apr 4 2013. ISSN 1932-6203.

GHERMAN, C. D.; PAMFIL, D.; BOLBOACĂ, S. D. Association of atherosclerotic peripheral arterial disease with adiponectin genes SNP+45 and SNP+276: a case-control study. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 501203, 2013. ISSN 2314-6141.

GOLDBERGER, A. Structural equation methods in social sciences. **Econometrica**, v. 40, p. 979-1001, 1972.

GONG, M. et al. Association of the ADIPOQ rs17360539 and rs266729 polymorphisms with type 2 diabetes: a meta-analysis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 325, n. 1-2, p. 78-83, Aug 30 2010. ISSN 0303-7207.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. L. et al. An SNP in the adiponectin gene is associated with decreased serum adiponectin levels and risk for impaired glucose tolerance. **Obes Res**, v. 13, n. 5, p. 807-12, May 2005. ISSN 1071-7323.

GOYENECHEA, E. et al. The - 11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. **Horm Metab Res**, v. 41, n. 1, p. 55-61, Jan 2009. ISSN 0018-5043.

GRAY, R.; WHEATLEY, K. HOW TO AVOID BIAS WHEN COMPARING BONE-MARROW TRANSPLANTATION WITH CHEMOTHERAPY. **Bone Marrow Transplantation**, v. 7, p. 9-12, 1991 1991. ISSN 0268-3369.

GREENLAND, S. An introduction to instrumental variables for epidemiologists. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, n. 4, p. 722-729, Aug 2000. ISSN 0300-5771.

GU, H. F. Biomarkers of adiponectin: plasma protein variation and genomic DNA polymorphisms. **Biomark Insights**, v. 4, p. 123-33, 2009. ISSN 1177-2719.

GUI, M. H. et al. Association of the adiponectin gene rs1501299 G>T variant, serum adiponectin levels, and the risk of coronary artery disease in a Chinese population. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 97, n. 3, p. 499-504, Sep 2012. ISSN 1872-8227.

HAN, L. Y. et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T > G,+276G > T,-11377C > G,-11391G > A) of adiponectin gene and type 2

diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 54, n. 9, p. 2303-2314, Sep 2011. ISSN 0012-186X.

HAO, G. et al. Serum total adiponectin level and the risk of cardiovascular disease in general population: A meta-analysis of 17 prospective studies. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 1, p. 29-35, May 2013. ISSN 0021-9150.

HEGENER, H. H. et al. Association of adiponectin gene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control study. **Clin Chem**, v. 52, n. 11, p. 2021-7, Nov 2006. ISSN 0009-9147.

HEID, I. M. et al. Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: Results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 2, p. 412-420, Feb 2010. ISSN 0021-9150.

HEID, I. M. Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 375-384, Feb 2006. ISSN 0012-1797.

HIVERT, M.-F. et al. Common Variants in the Adiponectin Gene (ADIPOQ) Associated With Plasma Adiponectin Levels, Type 2 Diabetes, and Diabetes-Related Quantitative Traits The Framingham Offspring Study. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3353-3359, Dec 2008. ISSN 0012-1797.

HOEFLE, G. et al. The -11377 C>G promoter variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men. **Thromb Haemost**, v. 97, n. 3, p. 451-7, Mar 2007. ISSN 0340-6245.

HOLLAND, W. L. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature Medicine**, v. 17, n. 1, p. 55-U226, Jan 2011. ISSN 1078-8956.

HORTA, B.L. et al. Cohort Profile Update: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 2, p. 441a-441e, Apr 2015. ISSN 0300-577 (Print).

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 901-911, Apr 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. ADIPOSE EXPRESSION OF TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA - DIRECT ROLE IN OBESITY-LINKED INSULIN RESISTANCE. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993. ISSN 0036-8075.

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, Jun 2000. ISSN 1079-5642.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697-10703, May 3 1996. ISSN 0021-9258.

HUG, C. et al. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 28, p. 10308-13, Jul 2004. ISSN 0027-8424.

INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. Hapmap. Disponível em: < [http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27\\_B36/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36/) >. Acesso em: 13 abril 2014.

ISHIDA, M. et al. MicroRNA-378 regulates adiponectin expression in adipose tissue: a new plausible mechanism. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111537, 2014. ISSN 1932-6203.

IWASHIMA, Y. et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 6, p. 1318-1323, Jun 2004. ISSN 0194-911X.

JEE, S. H. et al. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study. **Am J Hum Genet**, v. 87, n. 4, p. 545-52, Oct 2010. ISSN 1537-6605.

JUNG, C. H. et al. Associations between two single nucleotide polymorphisms of adiponectin gene and coronary artery diseases. **Endocr J**, v. 53, n. 5, p. 671-7, Oct 2006. ISSN 0918-8959.

KANHAI, D. A. et al. Adiponectin and incident coronary heart disease and stroke. A systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Obesity Reviews**, v. 14, n. 7, p. 555-567, Jul 2013. ISSN 1467-7881.

KARMELIĆ, I. et al. Adiponectin level and gene variability are obesity and metabolic syndrome markers in a young population. **Arch Med Res**, v. 43, n. 2, p. 145-53, Feb 2012. ISSN 1873-5487.

KATAKAMI, N. et al. Adiponectin G276T gene polymorphism is associated with cardiovascular disease in Japanese patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 2, p. 437-42, Feb 2012. ISSN 1879-1484.

KATSUDA, Y. et al. Association of genetic variation of the adiponectin gene with body fat distribution and carotid atherosclerosis in Japanese obese subjects. **J Atheroscler Thromb**, v. 14, n. 1, p. 19-26, Feb 2007. ISSN 1340-3478.

KIM, J.-Y. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2621-2637, Sep 2007. ISSN 0021-9738.

KIM, S. H. et al. Adiponectin gene polymorphism 45T>G is associated with carotid artery plaques in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 57, n. 2, p. 274-9, Feb 2008. ISSN 0026-0495.

KOBASHI, C. et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. **Circulation Research**, v. 97, n. 12, p. 1245-1252, Dec 9 2005. ISSN 0009-7330.

KOERNER, A.; KRATZSCH, J.; KIESS, W. Adipocytokines: leptin - the classical, resistin - the controversial, adiponectin - the promising, and more to come. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 525-546, Dec 2005. ISSN 1521-690X.

KUMADA, M. et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2046-2049, May 4 2004. ISSN 0009-7322.

KUMADA, M. et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 1, p. 85-89, Jan 2003. ISSN 1079-5642.

KWON, K. et al. Reciprocal association between visceral obesity and adiponectin: in healthy premenopausal women. **International Journal of Cardiology**, v. 101, n. 3, p. 385-390, Jun 8 2005. ISSN 0167-5273.

LACQUEMANT, C. et al. The adiponectin gene SNP+45 is associated with coronary artery disease in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 21, n. 7, p. 776-81, Jul 2004. ISSN 0742-3071.

LAUMEN, H. et al. Functional characterization of promoter variants of the adiponectin gene complemented by epidemiological data. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 984-91, Apr 2009. ISSN 0012-1797.

LAWLOR, D. A. et al. Mendelian randomization: Using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. **Statistics in Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1133-1163, Apr 15 2008. ISSN 0277-6715.

LEE, E. S. et al. Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 4, p. 1029-1039, Aug 2013. ISSN 0300-5771; 1464-3685.

LEE, J. Y. et al. Genetic effects of adiponectin single nucleotide polymorphisms on the clustering of metabolic risk factors in young Korean adults. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 2, p. 623-9, Feb 2012. ISSN 1439-6327.

LEU, H. B. et al. Genetic variants of connexin37 are associated with carotid intima-medial thickness and future onset of ischemic stroke. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 1, p. 101-6, Jan 2011. ISSN 1879-1484.

LEU, H. B. et al. Adiponectin gene polymorphism is selectively associated with the concomitant presence of metabolic syndrome and essential hypertension. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19999, 2011. ISSN 1932-6203.

LI, S. et al. Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes A Systematic Review and Meta-analysis. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 2, p. 179-188, Jul 8 2009. ISSN 0098-7484.

LI, Y. et al. Association of adiponectin SNP+45 and SNP+276 with type 2 diabetes in Han Chinese populations: a meta-analysis of 26 case-control studies. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19686, 2011. ISSN 1932-6203.

LI, Y. Y. et al. Adiponectin-11377CG gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese population: a meta-analysis of 6425 subjects. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61153, 2013. ISSN 1932-6203.



LIANG, X. X. et al. Correlation between single nucleotide polymorphism (SNP + 276G/T) of adiponectin gene and coronary artery disease. **Chinese Journal of Cardiovascular Review**, v. 6, n. 11, p. 838-840, 2008.

LING, H. et al. Genome-wide linkage and association analyses to identify genes influencing adiponectin levels: the GEMS Study. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 4, p. 737-44, Apr 2009. ISSN 1930-7381.

LITTLE, J.; HIGGINS, J.P.T. (editors). **The HuGENet™ HuGE Review Handbook**, version 1.0. Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Disponível em: < [http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/assets/documents/HuGE\\_Review\\_Handbook\\_V1\\_0.pdf](http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/assets/documents/HuGE_Review_Handbook_V1_0.pdf) >.

LIU, F. et al. Association of adiponectin gene polymorphisms with the risk of ischemic stroke in a Chinese Han population. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 3, p. 1983-8, Mar 2011. ISSN 1573-4978.

LOOS, R. J. et al. Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to resting metabolic rate, respiratory quotient, and adiposity-related phenotypes in the Quebec Family Study. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 26-34, Jan 2007. ISSN 0002-9165.

LU, F. et al. Correlation between single nucleotide polymorphism (SNP + 276 G/T) of adiponectin gene and coronary artery disease in non-diabetic population. **Acta universitatis medicinalis nanjing**, v. 27, n. 7, p. 736-739, 2007.

MACKAWY, A. M. Association of the + 45T>G adiponectin gene polymorphism with insulin resistance in non-diabetic Saudi women. **Gene**, v. 530, n. 1, p. 158-63, Nov 2013. ISSN 1879-0038.

MACKEVICS, V. et al. The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy

Caucasians. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 3, p. 349-56, Mar 2006. ISSN 1018-4813.

MAEDA, K. et al. CDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adipose most abundant gene transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 221, n. 2, p. 286-289, Apr 16 1996. ISSN 0006-291X.

MAEDA, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nature Medicine**, v. 8, n. 7, p. 731-737, Jul 2002. ISSN 1078-8956.

MATSUBARA, M.; MARUOKA, S.; KATAYOSE, S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2764-2769, Jun 2002. ISSN 0021-972X.

MAZZALI, G. et al. Interrelations between fat distribution, muscle lipid content, adipocytokines, and insulin resistance: effect of moderate weight loss in older women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1193-1199, Nov 2006. ISSN 0002-9165.

MENTE, A. et al. Causal relationship between adiponectin and metabolic traits: a Mendelian randomization study in a multiethnic population. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66808, 2013. ISSN 1932-6203.

MENZAGHI, C. et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2306-12, Jul 2002. ISSN 0012-1797.

MENZAGHI, C. et al. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. **Physiological Genomics**, v. 19, n. 2, p. 170-174, Oct 4 2004. ISSN 1094-8341.

MERL, V. et al. Serum adiponectin concentrations during a 72-hour fast in over- and normal-weight humans. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 8, p. 998-1001, Aug 2005. ISSN 0307-0565.

MILJKOVIC-GACIC, I. et al. Genetic determination of adiponectin and its relationship with body fat topography in multigenerational families of African heritage. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 56, n. 2, p. 234-238, Feb 2007. ISSN 0026-0495.

MILLER, R. A. et al. Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2518-2528, Jun 2011. ISSN 0021-9738.

MORISAKI, H. et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. **Hum Mutat**, v. 33, n. 2, p. 402-10, Feb 2012. ISSN 1098-1004.

MOUSAVINASAB, F. et al. Common polymorphisms (single-nucleotide polymorphisms SNP+45 and SNP+276) of the adiponectin gene regulate serum adiponectin concentrations and blood pressure in young Finnish men. **Mol Genet Metab**, v. 87, n. 2, p. 147-51, Feb 2006. ISSN 1096-7192.

NAKANO, Y. et al. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. **Journal of Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 803-812, Oct 1996. ISSN 0021-924X.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, May 28 2014. ISSN 0140-6736.

OGURI, M. et al. Association of genetic variants with myocardial infarction in Japanese individuals with metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 486-93, Oct 2009. ISSN 1879-1484.

OHASHI, K. et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 7, p. 1195-200, Apr 2004. ISSN 0735-1097.

OHASHI, K. et al. Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6153-6160, Feb 26 2010. ISSN 0021-9258.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 22, p. 2767-2770, Nov 26 2002. ISSN 0009-7322.

OLIVEIRA, C. S. et al. Association of ADIPOQ variants, total and high molecular weight adiponectin levels with coronary artery disease in diabetic and non-diabetic Brazilian subjects. **J Diabetes Complications**, v. 26, n. 2, p. 94-8, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1873-460X.

OTERO, M. et al. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 9, p. 1198-1201, Sep 2006. ISSN 0003-4967.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules - Adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473-2476, Dec 21 1999. ISSN 0009-7322.

OUCHI, N. et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. **Circulation**, v. 103, n. 8, p. 1057-1063, Feb 27 2001. ISSN 0009-7322.

OUCHI, N. et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappa B signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1296-1301, Sep 12 2000. ISSN 0009-7322.

PAJVANI, U. B. et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. **J Biol Chem**, v. 279, n. 13, p. 12152-62, Mar 26 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

PATEL, S. et al. Variation in the ADIPOQ gene promoter is associated with carotid intima media thickness independent of plasma adiponectin levels in healthy subjects. **Eur Heart J**, v. 29, n. 3, p. 386-93, Feb 2008. ISSN 0195-668X.

PATEL, S. R.; LARKIN, E. K.; REDLINE, S. Shared genetic basis for obstructive sleep apnea and adiposity measures. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 5, p. 795-800, May 2008. ISSN 0307-0565.

PERA, J. et al. Temporal changes of adiponectin plasma levels in patients with acute ischemic stroke. **Neurological Research**, v. 35, n. 9, p. 988-991, Nov 2013. ISSN 0161-6412.

PERSEGHIN, G. et al. Insulin resistance, intramyocellular lipid (IMCL) content and plasma adiponectin concentration in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52, p. A332-A332, Jun 2003. ISSN 0012-1797.

PHILLIPS, S. A.; KUNG, J. T. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 676-683, Dec 2010. ISSN 1471-4892.

PINEIRO, R. et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. **FEBS Lett**, v. 579, n. 23, p. 5163-9, Sep 26 2005. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

PISCHON, T. et al. Single nucleotide polymorphisms at the adiponectin locus and risk of coronary heart disease in men and women. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 8, p. 2051-60, Aug 2007. ISSN 1930-7381.

PLAISANCE, E. P. et al. The influence of sex, body composition, and nonesterified fatty acids on serum adipokine concentrations. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 58, n. 11, p. 1557-1563, Nov 2009. ISSN 0026-0495.

PRIOR, S. L. et al. Association of the adiponectin rs266729 C>G variant and coronary heart disease in the low risk 'Golden Years' type 1 diabetes cohort. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 91, n. 3, p. e71-4, Mar 2011. ISSN 1872-8227.

QI, L. et al. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1512-6, May 2006. ISSN 0012-1797.

QI, L. et al. The +276 polymorphism of the APM1 gene, plasma adiponectin concentration, and cardiovascular risk in diabetic men. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1607-10, May 2005. ISSN 0012-1797.

QI, L. et al. Novel locus FER is associated with serum HMW adiponectin levels. **Diabetes**, v. 60, n. 8, p. 2197-201, Aug 2011. ISSN 1939-327X.

QIAO, L.; SHAO, J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. **J Biol Chem**, v. 281, n. 52, p. 39915-24, Dec 2006. ISSN 0021-9258.

RAMYA, K. et al. Genetic association of ADIPOQ gene variants with type 2 diabetes, obesity and serum adiponectin levels in south Indian population. **Gene**, v. 532, n. 2, p. 253-262, Dec 15 2013. ISSN 0378-1119; 1879-0038.

REGISTER, T. C. et al. Relationships Between Serum Adiponectin and Bone Density, Adiposity and Calcified Atherosclerotic Plaque in the African American-Diabetes Heart Study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 5, p. 1916-1922, May 2013. ISSN 0021-972X.

RICHARDS, J. B. et al. A genome-wide association study reveals variants in ARL15 that influence adiponectin levels. **PLoS Genet**, v. 5, n. 12, p. e1000768, Dec 2009. ISSN 1553-7404.

RICHIARDI, L.; BELLOCCO, R.; ZUGNA, D. Mediation analysis in epidemiology: methods, interpretation and bias. **Int J Epidemiol**, v. 42, n. 5, p. 1511-9, Oct 2013. ISSN 0300-5771.

RIZK, N. M. et al. Association of adiponectin gene polymorphism (+T45G) with acute coronary syndrome and circulating adiponectin levels. **Angiology**, v. 64, n. 4, p. 257-65, May 2013. ISSN 1940-1574.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L. et al. Lack of association between ADIPOQ rs266729 and ADIPOQ rs1501299 polymorphisms and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 1, p. 74-8, Jan 2011. ISSN 0001-2815.

RUCHAT, S. M. et al. Associations between glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion phenotypes and polymorphisms in adiponectin and adiponectin receptor genes in the Quebec Family Study. **Diabet Med**, v. 25, n. 4, p. 400-6, Apr 2008. ISSN 1464-5491.

RYAN, A. S. et al. Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2383-2388, Aug 2003. ISSN 0149-5992.

SABOURI, S. et al. Association between 45T/G polymorphism of adiponectin gene and coronary artery disease in an Iranian population. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 93-101, 2011. ISSN 1537-744X.

SADA, K.-E. et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1545-1552, Aug 2006. ISSN 0315-162X.

SAITO, T. et al. Association of subcutaneous and visceral fat mass with serum concentrations of adipokines in subjects with type 2 diabetes mellitus. **Endocrine Journal**, v. 59, n. 1, p. 39-45, Jan 20 2012. ISSN 0918-8959.

SCHERER, P. E. et al. A NOVEL SERUM-PROTEIN SIMILAR TO C1Q, PRODUCED EXCLUSIVELY IN ADIPOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, Nov 10 1995. ISSN 0021-9258.

SCHWARZ, P. E. et al. Global meta-analysis of the C-11377G alteration in the ADIPOQ gene indicates the presence of population-specific effects: challenge for global health initiatives. **Pharmacogenomics J**, v. 9, n. 1, p. 42-8, Feb 2009. ISSN 1470-269x.

SHAH, S. et al. Causal Relevance of Blood Lipid Fractions in the Development of Carotid Atherosclerosis Mendelian Randomization Analysis. **Circulation-Cardiovascular Genetics**, v. 6, n. 1, p. 63-72, Feb 2013. ISSN 1942-325X.

SHEA, S. A. et al. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2537-2544, May 2005. ISSN 0021-972X.

SHIN, M. J. et al. The association of SNP276G>T at adiponectin gene with circulating adiponectin and insulin resistance in response to mild weight loss. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, n. 12, p. 1702-8, Dec 2006. ISSN 0307-0565.

SMITH, G. D.; EBRAHIM, S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 1, p. 1-22, Feb 2003. ISSN 0300-5771.

SMITH, G. D. et al. Clustered environments and randomized genes: A fundamental distinction between conventional and genetic epidemiology. **Plos Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1985-1992, Dec 2007. ISSN 1549-1277.



STENVINKEL, P. et al. Adiponectin in renal disease: relationship to phenotype and genetic variation in the gene encoding adiponectin. **Kidney Int**, v. 65, n. 1, p. 274-81, Jan 2004. ISSN 0085-2538.

STOCK, J. H.; WRIGHT, J. H.; YOGO, M. A survey of weak instruments and weak identification in generalized method of moments. **Journal of Business & Economic Statistics**, v. 20, n. 4, p. 518-529, Oct 2002. ISSN 0735-0015.

SURIYAPROM, K. et al. The -11377C > G adiponectin gene polymorphism alters the adiponectin concentration and the susceptibility to type 2 diabetes in Thais. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 80, n. 3, p. 216-24, Jun 2010. ISSN 0300-9831.

SURIYAPROM, K.; PHONRAT, B.; TUNGTRONGCHITR, R. Association of adiponectin gene -11377C>G polymorphism with adiponectin levels and the metabolic syndrome in Thais. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 23, n. 1, p. 167-73, 2014. ISSN 0964-7058.

TCHERNOF, A.; DESPRES, J.-P. PATHOPHYSIOLOGY OF HUMAN VISCERAL OBESITY: AN UPDATE. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 359-404, Jan 2013. ISSN 0031-9333; 1522-1210.

THANASSOULIS, G.; O'DONNELL, C. J. Mendelian Randomization Nature's Randomized Trial in the Post-Genome Era. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 301, n. 22, p. 2386-2388, Jun 10 2009. ISSN 0098-7484.

THOMAS, D. C.; CONTI, D. V. Commentary: The concept of 'Mendelian randomization'. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 21-25, Feb 2004. ISSN 0300-5771.

THOMPSON, J. R. et al. Meta-analysis of genetic studies using Mendelian randomization - a multivariate approach. **Statistics in Medicine**, v. 24, n. 14, p. 2241-2254, Jul 30 2005. ISSN 0277-6715.

TONG, G. et al. Common variants in adiponectin gene are associated with coronary artery disease and angiographical severity of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, p. 67, 2013. ISSN 1475-2840.

TSO, A. W. et al. Polymorphisms of the gene encoding adiponectin and glycaemic outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study. **Diabetologia**, v. 49, n. 8, p. 1806-15, Aug 2006. ISSN 0012-186X.

TSUCHIDA, A. et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30817-30822, Jul 16 2004. ISSN 0021-9258.

TURER, A. T. et al. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2515-2524, Oct 2011. ISSN 0012-186X.

TURER, A. T.; SCHERER, P. E. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2319-2326, Sep 2012. ISSN 0012-186X.

VALSAMAKIS, G. et al. Fasting serum adiponectin concentration is reduced in Indo-Asian subjects and is related to HDL cholesterol. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 131-135, Mar 2003. ISSN 1462-8902.

VAN GAAL, L. F. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 12, p. 21-21, Oct 2010. ISSN 1462-8902.

VANDERWEELE, T. J. et al. Methodological Challenges in Mendelian Randomization. **Epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 427-435, May 2014. ISSN 1044-3983; 1531-5487.

VASSEUR, F. Adiponectin and its receptors: partners contributing to the "vicious circle" leading to the metabolic syndrome? **Pharmacol Res**, v. 53, n. 6, p. 478-81, Jun 2006. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618.

VASSEUR, F. et al. Concordance of two multiple analytical approaches demonstrate that interaction between BMI and ADIPOQ haplotypes is a determinant of LDL cholesterol in a general French population. **J Hum Genet**, v. 55, n. 4, p. 227-31, Apr 2010. ISSN 1435-232X.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C. Cohort profile: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 2, p. 237-242, Apr 2006. ISSN 0300-5771.

VIMALESWARAN, K. S. et al. A novel association of a polymorphism in the first intron of adiponectin gene with type 2 diabetes, obesity and hypoadiponectinemia in Asian Indians. **Human Genetics**, v. 123, n. 6, p. 599-605, Jul 2008. ISSN 0340-6717; 1432-1203.

VIONNET, N. et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: Evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1470-1480, Dec 2000. ISSN 0002-9297.

WANG, J.; LI, S. Adiponectin gene polymorphism in han people of Jilin region and its association with coronary heart disease. **Chinese Journal of Laboratory Diagnosis**, v. 10, n. 11, p. 1272–1274, 2006.

WANG, Y. et al. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. **Biochem J**, v. 409, n. 3, p. 623-33, Feb 2008. ISSN 1470-8728.

WARODOMWICHIT, D. et al. ADIPOQ polymorphisms, monounsaturated fatty acids, and obesity risk: the GOLDN study. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 3, p. 510-7, Mar 2009. ISSN 1930-7381.

WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, May 2001. ISSN 0021-972X.

WHEATLEY, K.; GRAY, R. Commentary: Mendelian randomization - an update on its use to evaluate allogeneic stem cell transplantation in leukaemia. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 15-17, Feb 2004. ISSN 0300-5771.

WIJESEKARA, N. et al. Adiponectin-induced ERK and Akt Phosphorylation Protects against Pancreatic Beta Cell Apoptosis and Increases Insulin Gene Expression and Secretion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33623-33631, Oct 29 2010. ISSN 0021-9258.

WILDMAN, R. P. et al. Adipocytokine and ghrelin levels in relation to cardiovascular disease risk factors in women at midlife: longitudinal associations. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 5, p. 740-748, May 2008. ISSN 0307-0565.

WINZELL, M. S. et al. Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 1, p. 154-160, Aug 11 2004. ISSN 0006-291X.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. World Health Organization. Geneva, p.162. 2011

WRIGHT, S. Appendix. In: WRIGHT, P. (Ed.). **The Tariff on Animal and Vegetable Oils**. New York: Macmillan, 1928.

WU, Y. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin levels in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 4, p. 1108-1119, Feb 15 2014. ISSN 0964-6906; 1460-2083.

WU, Y. et al. Genome-wide association study for adiponectin levels in Filipino women identifies CDH13 and a novel uncommon haplotype at KNG1-ADIPOQ. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 24, p. 4955-64, Dec 2010. ISSN 1460-2083.

WU, Z. et al. Association between Adiponectin Concentrations and Cardiovascular Disease in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**, v. 8, n. 11, Nov 4 2013. ISSN 1932-6203.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C. et al. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 3, p. 924-929, Apr 9 2004. ISSN 0006-291X.

XI, B. et al. Common polymorphisms (rs2241766 and rs1501299) in the ADIPOQ gene are not associated with hypertension susceptibility among the Chinese. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 9, p. 8771-5, Sep 2012. ISSN 1573-4978.

XU, A. M. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 1, p. 91-100, Jul 2003. ISSN 0021-9738.

XU, L.; LING, W. Correlation of adiponectin gene SNP + 45 T/G polymorphism with coronary heart disease. **Chinese Journal of Pathophysiology**, v. 26, n. 6, p. 1064–1068, 2010.

YAGHOOTKAR, H. et al. Mendelian Randomization Studies Do Not Support a Causal Role for Reduced Circulating Adiponectin Levels in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3589-3598, Oct 2013. ISSN 0012-1797.

YAMADA, Y. et al. Association of genetic variants with atherothrombotic cerebral infarction in Japanese individuals with metabolic syndrome. **Int J Mol Med**, v. 21, n. 6, p. 801-8, Jun 2008. ISSN 1107-3756.

YAMAMOTO, K. et al. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 6, p. 789-796, Jun 2005. ISSN 0017-5749.

YAMAMOTO, Y. et al. Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: Two-year follow-up study in Japanese population. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 1, p. 87-90, Jan 2004. ISSN 0021-972X.

YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762-769, Jun 12 2003. ISSN 0028-0836.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288-1295, Nov 2002. ISSN 1078-8956.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941-946, Aug 2001. ISSN 1078-8956.

YAMAUCHI, T. et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 332-339, Mar 2007. ISSN 1078-8956.

YAN, W. L. et al. Common SNPs of APM1 gene are not associated with hypertension or obesity in Chinese population. **Biomed Environ Sci**, v. 19, n. 3, p. 179-84, Jun 2006. ISSN 0895-3988.

YANG, W. S. et al. Adiponectin SNP276 is associated with obesity, the metabolic syndrome, and diabetes in the elderly. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 2, p. 509-13, Aug 2007. ISSN 0002-9165.

YARROW, J. F. et al. Influence of Androgens on Circulating Adiponectin in Male and Female Rodents. **Plos One**, v. 7, n. 10, Oct 10 2012. ISSN 1932-6203.

YE, R.; SCHERER, P. E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? **Mol Metab**, v.2, 2013. p.133-141. ISBN 2212-8778 (Print).

YOKOTA, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1723-1732, Sep 1 2000. ISSN 0006-4971.

YOSHIDA, T. et al. Association of gene polymorphisms with myocardial infarction in individuals with different lipid profiles. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 4, p. 581-90, Oct 2007. ISSN 1107-3756.

YOU, T. J. et al. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 4, p. E741-E747, Apr 2005. ISSN 0193-1849.

YU, Z. et al. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 2, p. 396-406, Feb 2012. ISSN 1930-739X.

ZHANG, B.-C. et al. Serum total adiponectin level and risk of cardiovascular disease in Han Chinese populations: a meta-analysis of 17 case-control studies. **Clinical Endocrinology**, v. 77, n. 3, p. 370-378, Sep 2012. ISSN 0300-0664.

ZHANG, H. et al. Association between polymorphisms in the adiponectin gene and cardiovascular disease: a meta-analysis. **BMC Med Genet**, v. 13, p. 40, 2012. ISSN 1471-2350.

ZHANG, H. et al. Adiponectin Levels and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-analysis of Prospective Studies. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 345, n. 6, p. 455-461, Jun 2013. ISSN 0002-9629.

ZHANG, X. P. et al. Correlation of adiponectin gene polymorphisms with coronary artery disease and plaque progression. **Journal of shanghai jiaotong university (medical science)**, v. 29, n. 4, p. 435–439, 2009.

ZHANG, Y. Y. et al. POSITIONAL CLONING OF THE MOUSE OBESE GENE AND ITS HUMAN HOMOLOG. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, Dec 1 1994. ISSN 0028-0836.

ZHAO, T.; ZHAO, J. Genetic effects of adiponectin on blood lipids and blood pressure. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 74, n. 2, p. 214-22, Feb 2011. ISSN 1365-2265.

ZHONG, C. et al. A lack of association between adiponectin polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population. **Genet Mol Biol**, v. 33, n. 3, p. 428-33, Jul 2010. ISSN 1415-4757.

ZHOU, L. et al. DsbA-L Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Adiponectin Downregulation. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2809-2816, Nov 2010. ISSN 0012-1797.

ZOICO, E. et al. Adipocytokines, fat distribution, and insulin resistance in elderly men and women. **Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 9, p. 935-939, Sep 2004. ISSN 1079-5006.



***SEÇÃO II - MODIFICAÇÕES NO  
PROJETO***

---

## MODIFICAÇÕES NO PROJETO

Nesta seção, são detalhadas as mudanças realizadas em cada artigo proposto no projeto original ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

**Artigo 1.** *Relação da concentração sanguínea de adiponectina com diferentes depósitos adiposos e com o padrão de distribuição de gordura corporal.*

Este artigo foi inicialmente proposto com a finalidade de avaliar a associação da concentração sanguínea de adiponectina com diferentes depósitos adiposos e com o padrão da distribuição de gordura corporal, utilizando dados do acompanhamento de 2012 da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982 (análise principal). Além disso, pretendia-se realizar análises complementares para (i) avaliar a potencial interação de diferentes depósitos adiposos com sexo e ancestralidade genômica em relação à concentração sanguínea de adiponectina e (ii) avaliar a possível mediação da associação entre distribuição de gordura corporal e adiponectinemia por marcadores inflamatórios.

Na versão modificada, optou-se por investigar em profundidade o efeito independente de cada depósito adiposo sobre a concentração sanguínea de adiponectina em detrimento do padrão geral de distribuição de gordura. Para isso, acrescentou-se à análise principal inicialmente proposta (i) a avaliação de relações não lineares na associação entre depósitos adiposos e adiponectina por modelagem com polinômios fracionais e (ii) a análise do efeito do acúmulo de gordura central ou periférico sobre a adiponectinemia utilizando a técnica de aleatorização mendeliana. Para a análise de aleatorização mendeliana, utilizou-se meta-dados de dois consórcios de estudos de varredura genômica (*genome-wide association studies*, GWAS): o consórcio GIANT (*The Genetic Investigation of ANthropometric Traits*), que inclui dados de genótipo, circunferência da cintura e do quadril de 210.088 participantes, e o consórcio ADIPOGen, que inclui dados de genótipo e adiponectinemia de 29.347 participantes.

Das análises complementares inicialmente planejadas, optou-se por explorar apenas a possível modificação de efeito por sexo, dada à consistente

evidência de dimorfismo sexual na distribuição de adiponectina. Além disso, acrescentou-se ao artigo a realização de imputação múltipla para explorar a possibilidade de viés nas estimativas por conta de dados faltantes.

**Artigo 2:** *Efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982.*

No artigo inicialmente proposto no projeto de qualificação, planejava-se conduzir um estudo de aleatorização mendeliana para investigar o efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares (perfil lipídico, pressão arterial, hemoglobina glicada e proteína C reativa) em adultos nascidos na cidade de Pelotas no ano de 1982.

A utilização apenas dos dados da coorte de 1982 trazia importante limitação à proposta, tendo em vista que estudos de aleatorização mendeliana demandam grandes amostras em função do baixo poder estatístico do método. Por conta disso, acrescentamos à proposta quatro estudos adicionais: a coorte *British Women Heart and Health Study* (BWHHS), que recrutou 4.286 mulheres britânicas com idade entre 60-79 anos, a coorte *Whitehall-II*, (WHII) que recrutou 10.308 servidores públicos britânicos, a coorte *Caerphilly Prospective Study* (CaPS), que incluiu 2.512 homens britânicos, e o estudo caso-controle aninhado no ensaio clínico *The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening* (UKCTOCS), que incluiu 4.913 mulheres britânicas com 50 anos ou mais. As estimativas advindas dos cinco estudos foram combinadas por meio de técnicas de meta-análise. Somado a isso, uma vez que esses estudos (BWHHS, WHII, CaPS e UKCTOCS) dispunham de dados de mais de 233 metabólitos, nós ampliamos extensamente o escopo do artigo de modo a explorar com grande detalhe o efeito da adiponectinemia sobre o metabolismo, além dos biomarcadores anteriormente propostos.

**Artigo 3:** *Efeito da concentração sanguínea de adiponectina sobre a incidência e sobre a mortalidade por DCV em adultos (revisão sistemática com metanálise).*

Este artigo previa uma revisão sistemática com metanálise para investigar o efeito da adiponectina sobre a incidência de doenças cardiovasculares (DCV), utilizando a técnica da aleatorização mendeliana.

Um dos examinadores do projeto, Prof. Alexandre Pereira, sugeriu que se utilizassem dados não publicados de estudos de varredura genômica (GWAS) disponíveis em bancos públicos, em lugar de dados obtidos por meio de revisão de literatura. Após o exame de qualificação, tomamos conhecimento da disponibilidade de meta-dados de diversos consórcios genéticos internacionais. Desse modo, optamos por utilizar meta-dados, publicamente disponíveis, de seis consórcios genéticos: ADIPOGen, CARDIoGRAM (*Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication And Meta-analysis*), CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip (*CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip and GWAS meta-analysis*), GIANT (*Genetic Investigation of ANthropometric Traits*), GLGC (*Global Lipids Genetics Consortium*) e MAGIC (*Meta-Analyses of Glucose and Insulin-Related Traits Consortium*). Tal mudança de estratégia trouxe duas vantagens cruciais em relação à proposta original: (i) eliminou a possibilidade de viés de publicação e (ii) aumentou radicalmente o poder do estudo, pois tornou possível o aumento do tamanho da amostra e do número de variantes genéticas que foram usadas como variáveis instrumentais.

**SEÇÃO III - TRABALHO DE  
CAMPO**

---

## TRABALHO DE CAMPO

Como parte do projeto de formação do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia (PPGE), a doutoranda participou da coleta de dados de uma das coortes de nascimentos de Pelotas.

Na ocasião do ingresso da doutoranda no programa (2013), a coleta dos dados utilizados no desenvolvimento da tese (oriundos do acompanhamento de 2012 da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982) já havia ocorrido. Por esse motivo, a experiência de campo da doutoranda deu-se na coorte de nascimentos de Pelotas de 2015, especificamente no acompanhamento pré-natal.

Do período de outubro de 2013 a fevereiro de 2014, a doutoranda atuou em diversas atividades relativas ao planejamento do trabalho de campo, como elaboração do questionário em papel e de sua versão eletrônica, planejamento da logística de recrutamento das gestantes, seleção e treinamento de entrevistadoras, visita às unidades de recrutamento e elaboração da análise de consistência das entrevistas. No período de março a setembro de 2014, a doutoranda atuou como supervisora de campo.

A versão resumida do relatório de campo do acompanhamento pré-natal consta no **Apêndice A** da tese. A versão do relatório na íntegra está disponível mediante requisição à equipe da coorte de 2015.

***SEÇÃO IV - DOSAGEM DA  
CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA  
DE ADIPONECTINA***

---

## DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ADIPONECTINA

A dosagem da concentração sanguínea de adiponectina total foi realizada nas dependências do Centro de Pesquisas Epidemiológicas no período de julho a setembro de 2015 pela técnica Deise farias Freitas sob coordenação da Profa. Isabel Oliveira e da doutoranda Maria Carolina Borges.

Foram analisadas amostras de soro de 3.542 membros da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982, coletadas no acompanhamento de 2012, quando os participantes tinham em torno de 30 anos.

A quantificação da adiponectina foi realizada por meio da técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) com o auxílio do *kit* de reagentes *Quantikine Human Total Adiponectin Immunoassay*, da empresa *R&D Systems* (Minneapolis, Minesota, EUA), e dos equipamentos *Aquamax® Microplate Washer* e *SpectraMax 190*, ambos comercializados pela empresa *Molecular Devices* (Sunnyvale, California, EUA).

O ensaio utilizou microplacas previamente revestidas com anticorpo monoclonal específico para o domínio globular da adiponectina. Padrões e amostras foram pipetados em placas contendo 96 poços e incubados. Após a lavagem na lavadora automática (*Aquamax® Microplate Washer*) para retirar quaisquer substâncias não ligadas, foi adicionado aos poços anticorpo monoclonal ligado à enzima específica para o domínio globular adiponectina. Após nova lavagem, uma solução de substrato foi adicionada aos poços para que a cor se desenvolvesse em proporção à quantidade de adiponectina ligada no passo inicial. O desenvolvimento da cor foi interrompido e a intensidade da cor foi medida no equipamento Spectramax 190 a 450 nm e 570 nm (para corrigir a leitura inicial por imperfeições da microplaca). A concentração de adiponectina foi predita por meio da equação de regressão linear derivada da curva padrão com base nos dados de concentração conhecida de adiponectina e densidade óptica de cada ponto da curva padrão. A concentração final de adiponectina de cada amostra foi determinada com base na leitura média das duplicatas da amostra. Detalhes do protocolo de dosagem constam no **Apêndice B** da tese.

A técnica utilizada detecta todas as subformas de adiponectina (baixo, médio e alto peso molecular) e tem como limite inferior de detecção 0.079-



0.891 ng/mL. Diversos procedimentos de controle de qualidade foram realizados ao longo do período de dosagem, como, por exemplo, avaliação da variabilidade intra-ensaio, avaliação da variabilidade interensaio e repetição das dosagens em casos de duplicatas com coeficiente de variação (CV) maior que 20%.

A avaliação da variabilidade intra- e interensaio foi realizada com base nos procedimentos recomendados pela empresa *R&D Systems*. Para a avaliação da variabilidade intra-ensaio, a mesma amostra foi pipetada 20 vezes em uma única placa e o CV das 20 amostras calculado, correspondendo a 5.96%. Para a avaliação da variabilidade interensaio, a mesma amostra (controle positivo) foi pipetada em duplicata a cada ensaio e o CV foi calculado, correspondendo a 16.07%.

***SEÇÃO V - ARTIGO 1: Obesity-  
induced hypoadiponectinemia:  
the opposite influences of  
central and peripheral fat  
compartments***

---

## **Obesity-induced hypoadiponectinemia: the opposite influences of central and peripheral fat compartments**

Borges MC<sup>1,\*</sup>; Oliveira IO<sup>1,2</sup>; Freitas DF<sup>1</sup>; Horta BL<sup>1</sup>; Ong KK<sup>3</sup>; Gigante DP<sup>1</sup>; Barros AJD<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>3</sup> Medical Research Council (MRC) Epidemiology Unit, Institute of Metabolic Science, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Corresponding author: Borges MC. Rua Marechal Deodoro, 1160 - 3° Piso, Centro, Pelotas, RS, Brazil. Zipcode: 96020-220. Phone: +55 (53) 3284 - 1300. Email: [carolina.borges.mcb@gmail.com](mailto:carolina.borges.mcb@gmail.com)

## Key messages

- Circulating adiponectin is substantially reduced among obese individuals, although adiponectin is mainly produced by mature adipocytes
- Our findings show that body fat distribution seems to be a causal determinant of circulating adiponectin and that upper- and lower-body fat have opposite influences regarding modulation of circulating adiponectin
- Modulation of circulating adiponectin might be a common mediator of the detrimental and protective effects of upper- and lower-body fat, respectively, in the context of metabolic diseases

## ABSTRACT

**Background:** Circulating adiponectin is a marker of metabolic and adipose tissue dysfunction. The substantial reduction in adiponectin concentration among obese individuals seems to depend on fat distribution and is one of the potential links between obesity and metabolic diseases.

**Objectives and methods:** We aimed to (i) address whether different fat depots (visceral, deep subcutaneous abdominal, superficial subcutaneous abdominal, and gluteofemoral) are independently associated with blood adiponectin concentration in 30-year-old adults using data from the 1982 Pelotas Birth Cohort, and (ii) investigate whether fat distribution causally determines blood adiponectin concentration by applying the Mendelian randomization approach to data from two consortia including multiple studies with genome-wide association scan (GWAS) data (GIANT and ADIPOGen consortia). For the Mendelian randomization analyses, genetic variants associated with waist or hip circumference were selected as proxies for central or peripheral fat accumulation, respectively.

**Results:** Our findings indicate that (i) abdominal fat (regardless of visceral or subcutaneous location) and gluteofemoral fat have independent and opposite trends concerning their association with adiponectin concentration and that (ii) central fat accumulation causes a decrease in adiponectin concentration, while the opposite occurs with peripheral fat accumulation.

**Conclusion:** These results reinforce that there is a complex interplay between body fat topography and circulating adiponectin concentration and that while obesity-induced hypoadiponectinemia seems to be primarily attributed to central fat accumulation, peripheral fat accumulation is likely to exert a protective effect.

**Keywords:** Adiponectin, Abdominal fat, Subcutaneous fat, Mendelian randomization, Body fat distribution, Adiposity, Obesity, Adipokines, Adipose tissue.

## INTRODUCTION

Adiponectin, the most abundant product of adipocytes, circulates in large amounts in the blood (3 to 30 mg/L) and is believed to promote adipogenesis, insulin sensitivity, and decrease inflammation.<sup>1</sup> Adiponectin is a marker of metabolic/adipose tissue dysfunction and a potential mediator of obesity-related complications, since its levels are inversely associated with several cardiometabolic disease risk factors.<sup>2</sup> Enlargement of adipose tissue is related to a decrease in adiponectin concentration, which seems to be mainly attributed to visceral, not subcutaneous fat.<sup>3-8</sup> However, few previous studies have properly addressed the independent contribution of specific fat depots and none has investigated whether different fat compartments are causally related to blood adiponectin concentration.

Mendelian randomization is a technique that uses genetic variants associated with an exposure aimed at unbiasedly detecting whether this exposure is likely to have a causal effect on the outcome of interest, provided that the genetic variant satisfies the assumptions of an instrumental variable (see details in Supplementary table 1). Mendelian randomization has several advantages over classical observational studies as most genetic variants tend to be uncorrelated with conventional epidemiological risk factors unlike the exposure itself, genetic variants are fixed at conception and, therefore, not subject to reverse causation, and genetic variants assessment is subject to relatively little measurement error.<sup>9</sup>

We aimed to (i) address whether different fat depots (visceral, deep subcutaneous abdominal, superficial subcutaneous abdominal, and gluteofemoral) are independently associated with blood adiponectin concentration, and (ii) investigate whether fat distribution causally determines blood adiponectin concentration by using the Mendelian randomization approach.

## METHODS

For the observational analysis, we used individual-level data from the 1982 Pelotas Birth Cohort (2012 follow-up, when participants were around 30 years old) to establish whether abdominal (visceral, deep subcutaneous, and superficial subcutaneous) and gluteofemoral fat depots are independently associated with blood adiponectin concentration among young adults (n = 3,701 participants).<sup>10, 11</sup>

For the Mendelian randomization analysis, we used summary data from two consortia including multiple studies with genome-wide association scan (GWAS) data to evaluate whether central and peripheral fat distribution causally determines blood adiponectin concentration: the Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) consortium (n = 210,088 participants)<sup>12</sup> and the ADIPOGen consortium (n = 29,347 participants).<sup>13</sup>

### Data sources

#### *1982 Pelotas Birth Cohort – Observational analysis*

### Participants

Pelotas is a medium-sized southern Brazilian city, with nearly 330,000 inhabitants. In 1982, all maternity hospitals in the city were visited daily and 99.2% of the births were identified. Those liveborns whose families lived in the urban area of the city were evaluated and their mothers interviewed (n = 5,914). Participants have been followed up on several occasions and further details of the study methodology have been described elsewhere.<sup>10, 11</sup> In 2012, 3,701 participants were evaluated, who added to the 325 known to have died, represented a follow-up rate of 68.1%. All phases of the 1982 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, which is affiliated with the Brazilian Federal Medical Council. Written informed consent was obtained from all participating subjects in the 2012 visit.

## Body composition and anthropometric measures

Abdominal fat depots were measured using the ultrasound machine Toshiba Xario (Toshiba Medical Systems Corp., Tokyo, Japan). Details can be found in previous publication<sup>14</sup> and Supplementary material. Gluteofemoral fat was assessed by Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance—GE, Germany). Details can be found in the Supplementary material.

## Blood adiponectin concentration

Serum samples were collected and stored at -70°C. Adiponectin was assayed with the ELISA Quantikine Human Total Adiponectin Immunoassay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) and SpectraMax 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices Corp, California, USA). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 6% and 16%, respectively.

## Covariates

Covariates were: sex (male or female), age, African genomic ancestry (%), leisure-time physical activity [inactive (0 min/week), insufficiently active (1 to 149 min/week), or active ( $\geq 150$  min/week)], alcohol drinking (< 1 or  $\geq 1$  dose/day), smoking (never, ex-smoker, 1 to 10, or  $\geq 10$  cigarettes/day), and body mass index (BMI; in kg/m<sup>2</sup>). Leisure-time physical activity practice was estimated using the long version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ).<sup>15</sup> Genomic ancestry was estimated using 370,539 ancestry informative markers. Details have been published previously<sup>16</sup> and can be found in Supplementary material.

## *GIANT and ADIPOGen consortia – Mendelian randomization analysis*

The Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) consortium included up to 210,088 individuals of European ancestry from cohorts genotyped with genome-wide SNP arrays (n = 57) or MetaboChip (n = 44).<sup>12</sup> Estimates of SNP-waist circumference or SNP-hip circumference association



(additive model) were adjusted for age, age<sup>2</sup>, body mass index, study-specific covariates and genomic control inflation factor ( $\lambda$ ). Summary data for the present study was downloaded from GIANT consortium website<sup>6</sup>

The ADIPOGen consortium included 29,347 individuals of European ancestry from 16 cohort studies with GWAS data and adiponectin measure.<sup>13</sup> Estimates of SNP-natural log adiponectin concentration association (additive model) were adjusted for age, sex, BMI, principal components of population stratification, study site (where appropriate), family structure (one family-based study), and genomic control inflation factor ( $\lambda$ ). Summary data for the present study was downloaded from ADIPOGen consortium website<sup>7</sup>.

Details on genotype imputation and quality control criteria for GIANT and ADIPOGen consortia can be found in Supplementary Table 2.

## Data analysis

### *1982 Pelotas Birth Cohort – Observational analysis*

Adiponectin was log-transformed prior to analyses due to positive skewness. Log-adiponectin, visceral, deep and superficial subcutaneous abdominal fat thickness (cm), and gluteofemoral fat mass (kg) were standardized for each sex. We used linear regression models to estimate the association of fat depots with potential confounders and with adiponectin concentration (crude and adjusted for covariates). Adjusted models were controlled for genomic ancestry, smoking status, alcohol intake, leisure-time physical activity and other fat depots. BMI was not included in the adjusted models to avoid model 'over-adjustment'. The correlation across fat depots and body mass index was estimated by Pearson's correlation coefficient. To explore nonlinear relations between fat depots and adiponectin concentration, we used two-degree fractional polynomial (FP) models. FP models were fitted separately for each fat depot and for each sex, adjusting for study covariates (eight models in total).

---

<sup>6</sup>[https://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT\\_consortium\\_data\\_files](https://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files)

<sup>7</sup><https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium>

The best fitting adjusted FP model was compared to the correspondent adjusted linear model using likelihood ratio (LR) test. Departures from linearity were assessed by P-values from LR test after Bonferroni correction (Bonferroni corrected P-values =  $0.05/8 = 0.00625$ ). All analyses were conducted separately according to sex, excluded pregnant women ( $n = 73$ ), and were based on complete cases (no missing information in study covariates).

### Sensitivity analysis

We checked whether observations were missing completely at random (MCAR) by testing the association of our complete case analysis indicator with all study covariates. Missing values were imputed with multivariate imputation using chained equations (MICE) for 20 complete datasets with ten iterations each. Multiple imputation was performed separately for each sex (and excluded pregnant women). The same crude and adjusted linear regression models previously described were fitted using the imputed dataset. Coefficients and standard errors for the variability between imputations were combined according to Rubin's rules.<sup>17</sup>

### *GIANT and ADIPOGen consortia – Mendelian randomization analysis*

We used summary data from GIANT and ADIPOGen consortia to perform a two-sample Mendelian randomization analysis aimed at investigating the causal influence of central or peripheral fat accumulation on adiponectin concentration. All SNPs associated with waist or hip circumference in GIANT consortium at GWAS threshold  $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$  were selected (937 SNPs for waist circumference and 2,016 SNPs for hip circumference). Variants in linkage disequilibrium (criteria:  $R^2 > 0.05$  and distance limit  $< 500\text{kb}$ ) were removed using SNP Annotation and Proxy Search (SNAP) tool<sup>18</sup> with 1000 Genomes Pilot 1 CEU (Utah residents with Northern and Western European ancestry) reference population. This resulted in 64 SNPs for waist circumference and 83 SNPs for hip circumference, which were used as instrumental variables in the Mendelian randomization analysis (Supplementary Tables 3 and 4).

Data on the association of SNPs with (a) waist or hip circumference (first samples) and (b) blood adiponectin concentration (second sample) were combined using the inverse-variance weighted (IVW) method, described by Burgess et al.<sup>19</sup> Two main models were used in Mendelian randomization analysis: (I) crude model<sup>19</sup>; (II) multivariate model, in which a multivariate IVW method was used to adjust the effect of waist circumference on adiponectin concentration for hip circumference and vice-versa<sup>20</sup> (see Supplementary material for details on IVW method). To evaluate whether genetically-increased adiponectin concentration could influence fat distribution, we selected, as instrumental variables for adiponectin concentration, SNPs previously used in a multi-SNP score for adiponectin concentration<sup>13</sup>, restricting to the four SNPs (rs6810075, rs16861209, rs17366568, rs3774261) within *ADIPOQ* gene ( $\pm$  50 kb) (Supplementary Table 5). Mendelian randomization results for the effect of adiponectin concentration on waist and hip circumference were also estimated by the IVW method.

### Sensitivity analyses

To assess the validity of causal inference from our main Mendelian randomization findings, we conducted a series of sensitivity analyses based on two stages.<sup>21</sup> In stage one, we investigated the presence of heterogeneity and asymmetry in causal estimates from each genetic variant using standard methods from meta-analysis literature. Heterogeneity was assessed by visually inspecting the forest plot of per SNP IVW estimate and by Cochran's Q test.<sup>22</sup> Asymmetry was evaluated using funnel plot and Egger's test.<sup>21, 23</sup> Assuming that all valid instrumental variables identify the same causal parameter, substantial heterogeneity would be suggestive of pleiotropic SNPs and asymmetry could indicate directional (unbalanced) pleiotropy, meaning that the overall causal estimate is biased.

In stage two, we used other Mendelian randomization estimators based on a less stringent set of assumptions than a conventional Mendelian randomization analysis (IVW method). Two methods were used: the Penalized weighted median estimator<sup>24</sup> and the Mendelian randomization (MR)-Egger method.<sup>25</sup> The weighted median estimator gives consistent estimates even if up to 50% of

weight in the analysis is from invalid instrumental variables and downweights (penalizes) the contribution of heterogeneous variants. The MR-Egger method gives consistent estimates even if all the genetic variants are invalid instruments provided that the InSIDE (Instrument Strength Independent of Direct Effect) assumption holds, which requires that there is no correlation between SNP-exposure association and direct effects of SNP on outcome.<sup>25</sup> Bootstrapping was used to derive corrected 95% confidence intervals for both Penalized weighted median and the MR-Egger estimates.<sup>24, 25</sup> See supplementary methods for a detailed description of the Penalized weighted median estimator and MR-Egger method.

## RESULTS

### *1982 Pelotas Birth Cohort – Observational analysis*

#### Main results

Participants' characteristics are described in Table 1. 2,742 individuals (1,315 males and 1,427 females) had complete information on all study variables (mean age 30.2 y; SD: 0.3). Median blood adiponectin concentration was 6,237 ng/mL (interquartile interval: 4,163-8,979) in men and 10,061 ng/mL (interquartile interval: 7,001-14,280) in women.

Results regarding the association between fat depots and covariates are listed in supplementary table 6. Briefly, African ancestry was negatively associated with deep subcutaneous abdominal and gluteofemoral fat in males and positively associated with visceral fat in females. Leisure-time physical activity was negatively associated with visceral fat, while smoking was negatively associated with subcutaneous fat depots in both sexes. Alcohol intake was positively related to visceral fat in males.

Subcutaneous fat depots (deep abdominal, superficial abdominal, and gluteofemoral) were moderately to highly correlated among each other ( $r = 0.46-0.79$ ) and moderately correlated with visceral fat ( $r = 0.30-0.53$ ) (Supplementary Table 7). In crude linear models, all fat depots were strongly and negatively associated with blood adiponectin concentration (Figure 1). After adjusting linear models for other fat depots and study covariates, the association between gluteofemoral fat and adiponectin concentration became positive. The association of adiponectin concentration with deep subcutaneous abdominal fat was attenuated in the adjusted models, especially among men, and remained similar for visceral and superficial subcutaneous abdominal fat (Figure 1). Among men, there was a monotonic but nonlinear trend in the relation of adiponectin concentration with visceral and superficial subcutaneous abdominal fat depots (P-value for nonlinear trend = 0.003 and  $5 \times 10^{-6}$ , respectively) and a "U" shaped curve in the association of adiponectin concentration and gluteofemoral fat mass (P-value for nonlinear trend =  $3 \times 10^{-4}$ ) (Figures 2). Among women, fat depots were associated with adiponectin in a

linear fashion, except in the case of visceral fat (P-value for nonlinear trend = 0.006) (Figures 3).

### Sensitivity analysis

Missingness was only associated with leisure-time physical activity and alcohol intake in females and was associated with leisure-time physical activity, alcohol intake, body mass index, and abdominal fat depots in males (Supplementary Table 8). Overall, results from complete case (Figure 1) and imputed models (Table 2) were similar.

### *GWAS consortia – Mendelian randomization analysis*

#### Main results

In crude models, genetically-predicted waist circumference was inversely related to blood adiponectin concentration ( $\beta_{IVW} = -0.15$  log adiponectin per increase in standard units of waist circumference, 95% CI: -0.20; -0.11), while genetically-predicted hip circumference was positively associated with blood adiponectin concentration ( $\beta_{IVW} = 0.09$  log adiponectin per increase in standard units of hip circumference, 95% CI: 0.05; 0.12). In the multivariate models, adjusting waist circumference models for hip circumference, and vice-versa, produced even larger effect size estimates (Multivariate model) (Figure 4). We also performed a reverse Mendelian randomization analysis to test whether genetically-predicted adiponectin concentration could influence fat distribution; our findings did not support a role of adiponectin concentration in either waist ( $\beta_{IVW} = -0.01$  standard units per increase in log adiponectin concentration; 95%CI: -0.05, 0.02) or hip circumference ( $\beta_{IVW} = -0.01$  standard units per increase in log adiponectin concentration; 95%CI: -0.04, 0.03).

Substantial heterogeneity was identified among Mendelian randomization estimates from genetic variants used as instrumental variables for waist ( $I^2 = 68.9\%$ ; P-value for heterogeneity =  $2 \times 10^{-16}$ ) and hip ( $I^2 = 45.4\%$ ; P-value for heterogeneity =  $7 \times 10^{-6}$ ) circumference (Supplementary Figures 1 and 2). However, there was no strong evidence of directional pleiotropy as evidenced

by the absence of substantial asymmetry in funnel plots and by the P-value for Egger test ( $P = 0.32$  for waist and  $P = 0.73$  for hip circumference) (Supplementary Figure 3).

### Sensitivity analysis

In the sensitivity analysis, we used other Mendelian randomization methods (MR-Egger regression method and Penalized weighted median estimator) to investigate the potential impact of invalid instruments on our Mendelian randomization estimates from the IVW method. The Penalized weighted median estimator indicated that each increase in standardized waist or hip circumference was related to a variation of  $-0.13$  (95% CI:  $-0.20$ ;  $-0.06$ ) and  $0.05$  (95% CI:  $-0.01$ ;  $0.11$ ), respectively, in log adiponectin concentration (Figure 5). The MR-Egger method predicted that each unit increase in standardized waist or hip circumference was related to a variation of  $-0.09$  (95% CI:  $-0.30$ ;  $0.17$ ) and  $0.09$  (95% CI:  $-0.08$ ;  $0.22$ ), respectively, in log adiponectin concentration with no evidence of directional pleiotropy (intercept for waist circumference =  $0.00$  (95% CI:  $-0.01$ ;  $0.00$ ); intercept for hip circumference =  $0.00$  (95% CI:  $0.00$ ;  $0.01$ ) (Figure 5). We also repeated the IVW method after removing heterogeneous genetic variants, defined as those with Q statistics for IVW estimates above 3.84 considering a chi-squared distribution with one degree of freedom, and results were similar (waist circumference:  $-0.12$ , 95%CI:  $-0.17$ ;  $-0.07$ ; hip circumference:  $0.06$ , 95%CI:  $0.02$ ;  $0.10$ ).

## DISCUSSION

Our findings reinforce previous evidence for a complex interplay between body fat topography and circulating adiponectin concentration.<sup>3-8</sup> The present results advance previous studies by showing that body fat distribution seems to be a causal determinant of circulating adiponectin and that upper- and lower-body fat have opposite influences regarding modulation of circulating adiponectin. In contrast, our results suggest that circulating adiponectin concentration is unlikely to influence body fat distribution.

Low adiponectin concentration has been previously reported to be associated with increased visceral fat mass.<sup>3-8</sup> We observed that abdominal fat depots, regardless of visceral or subcutaneous location, were negatively correlated with adiponectin. In addition, findings from the Mendelian randomization analysis highlight that central fat accumulation lowers adiponectin concentration, corroborating the hypothesis that obesity-induced hypoadiponectinemia can be primarily attributed to the expansion of central fat mass.

We also observed that gluteofemoral fat was positively associated with adiponectin concentration in agreement with previous results.<sup>7, 8, 26, 27</sup> Our findings that individuals genetically-predisposed to peripheral fat accumulation have higher adiponectin concentration are supportive of the increasingly acknowledged protective effect of lower-body fat in the context of metabolic diseases. It is hypothesized that peripheral subcutaneous compartments act as lipid-buffering tissues protecting several organs/tissues from ectopic fat deposition and that expansion of lower-body fat mass could prevent the development of metabolic dysfunction when facing energy surplus.<sup>28, 29</sup>

Intrinsic functional differences are likely to explain the opposing modulation of central and peripheral fat on adiponectin concentration. Adiponectin production by cultured omental adipocytes is affected by both insulin and insulin-sensitizing drugs (e.g. rosiglitazone), while subcutaneous fat seems to be nonresponsive.<sup>4</sup> Glucocorticoids, prolactin, and growth hormone are also known to modulate adiponectin production,<sup>30, 31</sup> but it is not clear how specific fat compartments might respond differently to these hormones. Depot-specific modulation of adiponectin concentration may also be related to differences in tissue local microenvironment, especially with reference to adipocytokine secretion pattern,



i.e. tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  expression, an inhibitor of adiponectin production, is increased in visceral fat expansion.<sup>32</sup>

Overproduction of adiponectin in animal models can induce substantial expansion of subcutaneous fat depots,<sup>33</sup> which is consistent with the capacity of adiponectin to activate peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- $\gamma$ , a key transcription factor of adipogenesis. In humans, PPAR- $\gamma$  agonists, such as thiazolidinediones, increase fat mass, particularly the subcutaneous compartment.<sup>34</sup> This raises the question of whether adiponectin is directly playing a protective role against ectopic fat deposition. However, our findings are not supportive that genetically-increased adiponectin concentration influences either central or peripheral fat accumulation.

This is one of the largest studies to address the independent contribution of several fat depots to adiponectinemia using detailed data on body composition. We have followed a rigorous analysis plan by accounting for multiple important confounders, exploring nonlinear associations between exposure and outcome and conducting multiple imputation to investigate the presence of bias from the complete case analysis. This is also the first study to use Mendelian randomization to unravel the causal relations between fat topography and adiponectin concentration. In our Mendelian randomization analysis we established a systematic approach to selecting our instrumental variables and conducted a range of sensitivity analyses to assess the robustness of our findings.

The main limitation in our Mendelian randomization analysis is the use of multiple genetic variants as instrumental variables, for most of which there is no clear biological understanding on how they influence fat distribution. Therefore, it is possible that at least some variants violate the instrumental variables assumption due to horizontal pleiotropy. Although we cannot discard the possibility of horizontal pleiotropy biasing our results, we did show that this is unlikely since there was no evidence of directional pleiotropy and Mendelian randomization estimates from different methods (with different assumptions) were generally consistent with findings from the IVW method. Other limitation in the Mendelian randomization analysis is the use of summary data, which precluded us from investigating sex-specific and nonlinear effects.

In summary, our findings suggest that fat topography is a causal determinant of adiponectin concentration, while adiponectin concentration does not seem to influence central or peripheral fat accumulation. Our results add to the understanding of the complex metabolic regulation by adipose tissue and point that modulation of adiponectin concentration might be a common mediator of the detrimental and protective effects of upper- and lower-body fat, respectively, in the context of metabolic diseases.

## Acknowledgements

The authors thank Fernando P Hartwig (Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas) for the help in the selection of SNPs for the instrumental variables of waist and hip circumference and Thiago H de Sá for revising the final manuscript.

Data on adiponectin have been contributed by ADIPOGen Consortium and have been downloaded from <https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium>. Data on anthropometric traits have been contributed by Genetic Investigation of ANthropometric Traits (*GIANT*) consortium and have been downloaded from [http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT\\_consortium\\_data\\_files](http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files).

## Funding Sources

The study "Pelotas Birth Cohort, 1982" is conducted by Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO). From 2004 to 2013, the Wellcome Trust supported the 1982 birth cohort study. The International Development Research Center, World Health Organization, Overseas Development Administration, European Union, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), the Brazilian National Research Council (CNPq), and the Brazilian Ministry of Health supported previous phases of the study.

MCB receives financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq) [144749/2014-9, 201498/2014-6 (Science Without Borders Program), and 163291/2015-2] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*). KKO is supported by the Medical Research Council [Unit Programme numbers MC\_UU\_12015/1 and MC\_UU\_12015/2].

MCB had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The work is of the authors and the views expressed here may not be the views of any funding bodies.

### Declaration of interests

The authors have no conflicts of interest to declare (MCB, IOO, DFF, BLH, KKO, DPG, AJDB).

## References

1. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007 Mar;**13**(3): 332-9.
2. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 2012 Sep;**55**(9): 2319-26.
3. Drolet R, Bélanger C, Fortier M, et al. Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring)* 2009 Mar;**17**(3): 424-30.
4. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Dec;**87**(12): 5662-7.
5. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003 Apr;**46**(4): 459-69.
6. Park KG, Park KS, Kim MJ, et al. Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Res Clin Pract* 2004 Feb;**63**(2): 135-42.
7. Snijder MB, Flyvbjerg A, Stehouwer CD, et al. Relationship of adiposity with arterial stiffness as mediated by adiponectin in older men and women: the Hoorn Study. *Eur J Endocrinol* 2009 Mar;**160**(3): 387-95.
8. Hanley AJ, Bowden D, Wagenknecht LE, et al. Associations of adiponectin with body fat distribution and insulin sensitivity in nondiabetic Hispanics and African-Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jul;**92**(7): 2665-71.
9. Davey Smith G, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies. *Hum Mol Genet* 2014 Sep 15;**23**(R1): R89-98.
10. Victora CG, Barros FC. Cohort profile: the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Epidemiol* 2006 Apr;**35**(2): 237-42.

11. Horta BL, Gigante DP, Goncalves H, et al. Cohort Profile Update: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Int J Epidemiol* 2015 Mar;**44**(2): 441a-441e.
12. Shungin D, Winkler TW, Croteau-Chonka DC, et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature* 2015 Feb;**518**(7538): 187-96.
13. Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet* 2012;**8**(3): e1002607.
14. Araujo de Franca GV, Lucia Rolfe E, Horta BL, et al. Associations of birth weight, linear growth and relative weight gain throughout life with abdominal fat depots in adulthood: the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2016; **40**(1):14-21.
15. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003 Aug;**35**(8): 1381-95.
16. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* 2015;**5**: 9812.
17. Rubin DB. *Multiple Imputation for Nonresponse in Surveys*. New York: John Wiley & Sons; 1987.
18. Johnson AD, Handsaker RE, Pulit SL, Nizzari MM, O'Donnell CJ, de Bakker PI. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics* 2008 Dec 15;**24**(24): 2938-9.
19. Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. *Genet Epidemiol* 2013 Nov;**37**(7): 658-65.
20. Burgess S, Dudbridge F, Thompson SG. Re: "Multivariable Mendelian randomization: the use of pleiotropic genetic variants to estimate causal effects". *Am J Epidemiol* 2015 Feb 15;**181**(4): 290-1.
21. Burgess S, Bowden J, Fall T, Ingelsson E, Thompson SG. Sensitivity analyses for robust causal inference from Mendelian randomization analyses with multiple genetic variants. *Epidemiology (in press)* 2016.

22. Greco M FD, Minelli C, Sheehan NA, Thompson JR. Detecting pleiotropy in Mendelian randomisation studies with summary data and a continuous outcome. *Stat Med* 2015 Sep;**34**(21): 2926-40.
23. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997 Sep 13;**315**(7109): 629-34.
24. Bowden J, Smith GD, Haycock PC, Burgess S. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator. *Genetic Epidemiology (in press)* 2016.
25. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. *Int J Epidemiol* 2015 Apr;**44**(2): 512-25.
26. Turer AT, Khera A, Ayers CR, et al. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia* 2011 Oct;**54**(10): 2515-24.
27. Buemann B, Sørensen TI, Pedersen O, et al. Lower-body fat mass as an independent marker of insulin sensitivity--the role of adiponectin. *Int J Obes (Lond)* 2005 Jun;**29**(6): 624-31.
28. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013 Jan;**93**(1): 359-404.
29. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol* 2015 Feb;**11**(2): 90-100.
30. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002 Jan 25;**290**(3): 1084-9.
31. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord* 2008 Jun;**6**(2): 87-102.
32. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006 Dec;**444**(7121): 875-80.
33. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007 Sep;**117**(9): 2621-37.

34. Yang X, Smith U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* 2007 Jun;**50**(6): 1127-39.



## Figure legends

**Figure 1.** Mean difference (95% CI) in standardized log adiponectin concentration per unit increase in fat depots for males (A) and females (B). Crude models estimates are represented by grey dots and adjusted models, by black squares. Adjusted models included genomic ancestry, smoking status, alcohol intake, physical activity and other fat depots. Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

**Figure 2.** Dose-response relation between fat depots and adiponectin concentration in males. (A) Visceral fat (P for nonlinear trend = 0.003); (B) Deep subcutaneous abdominal fat (P for nonlinear trend = 0.121); (C) Superficial subcutaneous abdominal fat (P for nonlinear trend =  $5 \times 10^{-6}$ ); (D) Gluteofemoral fat (P for nonlinear trend =  $3 \times 10^{-4}$ ). SD: standard deviation. Models were adjusted for genomic ancestry, smoking status, alcohol intake, physical activity and other fat depots. Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

**Figure 3.** Dose-response relation between fat depots and adiponectin concentration in females. (A) Visceral fat (P for nonlinear trend = 0.006); (B) Deep subcutaneous abdominal fat (P for nonlinear trend = 0.105); (C) Superficial subcutaneous abdominal fat (P for nonlinear trend = 0.058); (D) gluteofemoral fat (P for nonlinear trend = 0.037). SD: standard deviation. Models were adjusted for genomic ancestry, smoking status, alcohol intake, physical activity and other fat depots. Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

**Figure 4.** Mendelian randomization analysis of the mean difference (95% CI) in log adiponectin concentration per unit increase in standardized waist (gray dots) or hip circumference (black squares). Data from GIANT and ADIPOGen consortia. Crude model: unadjusted IVW method. Multivariate model: IVW method adjusted for hip circumference (in waist circumference model) or waist circumference (in hip circumference model). Waist and hip circumference were

adjusted by body mass index prior to analysis. IVW method: inverse variance method.

**Figure 5.** Mean difference in log adiponectin concentration according to genetically-increased standardized waist (A) or hip (B) circumference.

Each data point represents betas for SNP-adiponectin (Y axis) and SNP-waist or hip circumference (X axis) association. Predicted values for the main analyses are represented by the full black line (crude IVW method) and full gray line (multivariate IVW method). Predicted values for the sensitivity analyses are represented by the dashed black line (weighted median estimator) and dashed gray line (MR-Egger method). IVW method: inverse-variance weighted method; MR-Egger method: Mendelian randomization-Egger method.

**Table 1.** Participants' characteristics. Pelotas, 2012.

	Male		Female		Total	
	<i>N and %</i>					
African ancestry						
0.00-4.59%	449	34.1	472	33.1	921	33.6
4.60-10.99%	430	32.7	481	33.7	911	33.2
11.00-87.91%	436	33.2	474	33.2	910	33.2
Leisure-time physical activity						
Inactive (0 min/week)	440	33.5	890	62.4	1330	48.5
Insufficiently active (1-149 min/week)	367	27.9	237	16.6	604	22.0
Active ( $\geq 150$ min/week)	508	38.6	300	21.0	808	29.5
Smoking						
Never smoker	737	56.0	852	59.7	1589	58.0
Ex-smoker	232	17.6	262	18.4	494	18.0
1-9 cigarettes/day	104	7.9	127	8.9	231	8.4
$\geq 10$ cigarettes/day	242	18.4	186	13.0	428	15.6
Alcohol drinking						
$< 1$ dose/day	481	36.6	916	64.2	1397	50.9
$\geq 1$ dose/day	834	63.4	511	35.8	1345	49.1
Body mass index						
Underweight/normal weight ( $< 25$ kg/m <sup>2</sup> )	494	37.5	670	47.0	1164	42.5
Overweight (25-29.9 kg/m <sup>2</sup> )	557	42.4	414	29.0	971	35.4
Obese ( $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup> )	264	20.1	343	24.0	607	22.1
	<i>Mean and SD</i>					
Total fat (kg)	20.6	9.9	27.9	11.4	24.4	11.3
Fat depots:						
Visceral (cm)	6.8	1.9	4.9	1.6	5.8	2.0
Deep subcutaneous abdominal (cm)	1.2	0.7	1.5	0.8	1.4	0.8
Superficial subcutaneous abdominal (cm)	0.7	0.3	1.0	0.5	0.9	0.5
Gluteofemoral (kg)	3.7	1.6	5.4	1.9	4.6	2.0
Adiponectin (ng/mL)*	7208	4411	11278	6017	9326	5683
N total	1315		1427		2742	

Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort. \*Median blood adiponectin concentration was 6,237 ng/mL (interquartile interval: 4,163-8,979) in men and 10,061 ng/mL (interquartile interval: 7,001-14,280) in women.

**Table 2.** Mean difference (95% CI) in log adiponectin concentration per unit increase in fat depots for males (A) and females (B) after multiple imputation.

Variables	N missing	Males (n = 1,787)				Females (n = 1,841)				
		Crude		Adjusted		Crude		Adjusted		
		$\beta$	95% CI	$\beta$	95% CI	$\beta$	95% CI	$\beta$	95% CI	
VAT	63	-0.24	(-0.29, -0.2)	-0.25	(-0.31, -0.2)	76	-0.36	(-0.4, -0.31)	-0.31	(-0.36, -0.26)
Deep SCAT	48	-0.14	(-0.19, -0.09)	-0.07	(-0.14, 0)	71	-0.25	(-0.3, -0.21)	-0.19	(-0.24, -0.13)
Superficial SCAT	48	-0.16	(-0.21, -0.12)	-0.12	(-0.19, -0.06)	71	-0.29	(-0.34, -0.25)	-0.24	(-0.29, -0.19)
GFAT	112	-0.14	(-0.18, -0.1)	0.10	(0.02, 0.18)	85	-0.18	(-0.23, -0.14)	0.21	(0.14, 0.27)

Adjusted models included age, genomic ancestry, smoking status, alcohol intake, and other fat depots. Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

Figure 1

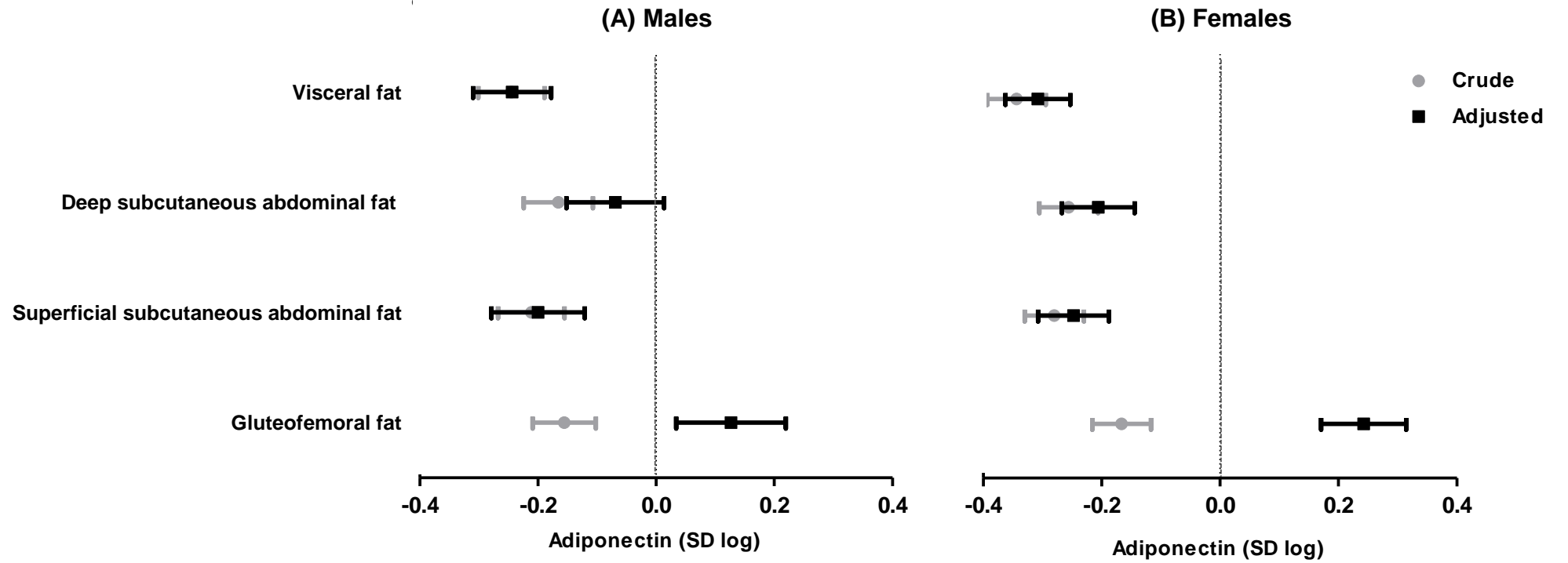


Figure 2.

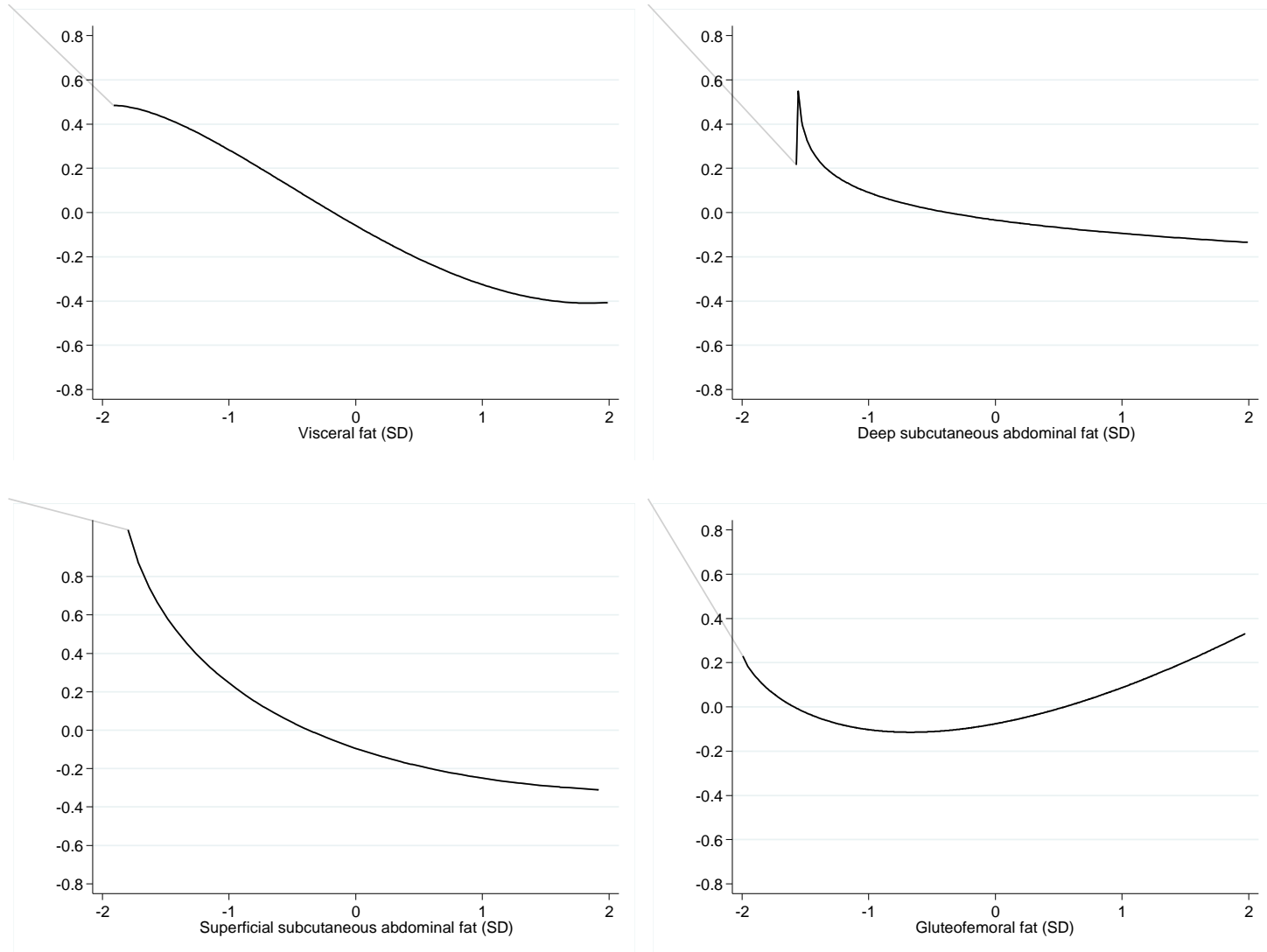


Figure 3.

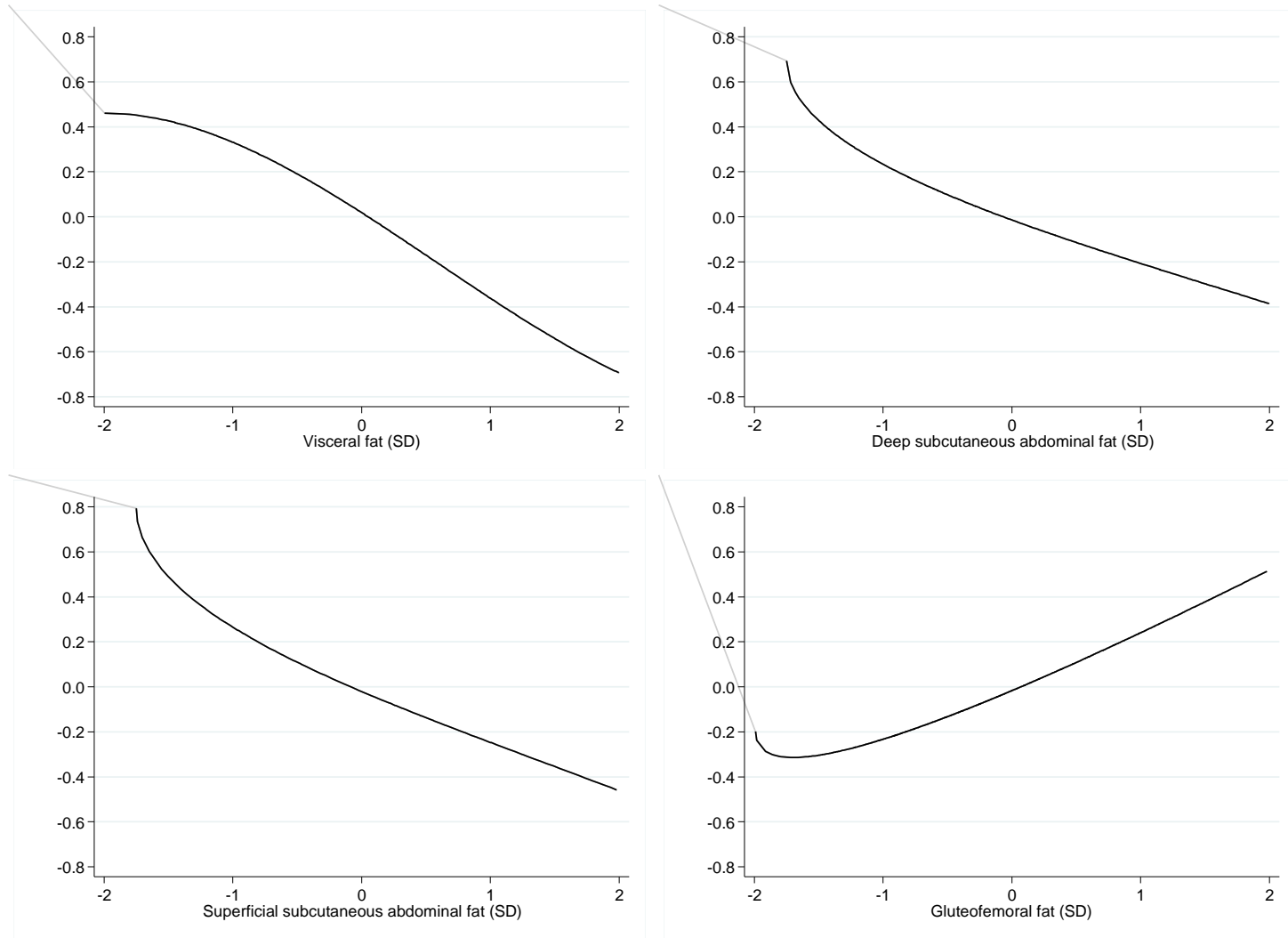


Figure 4.

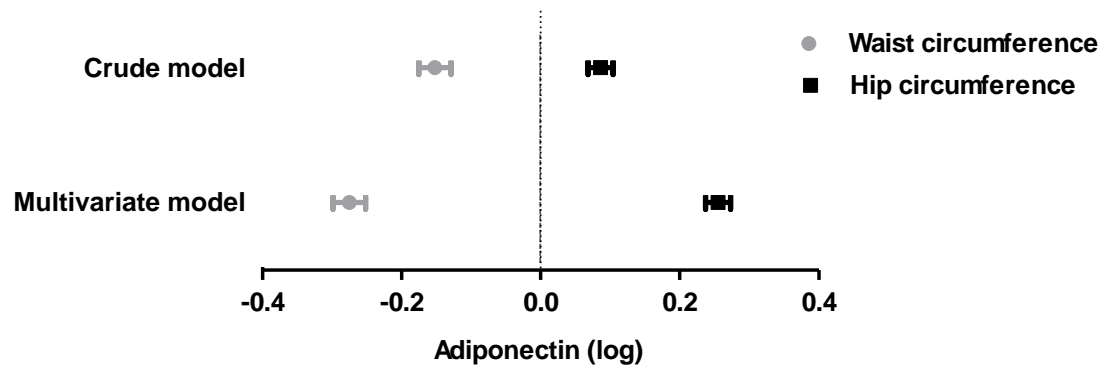
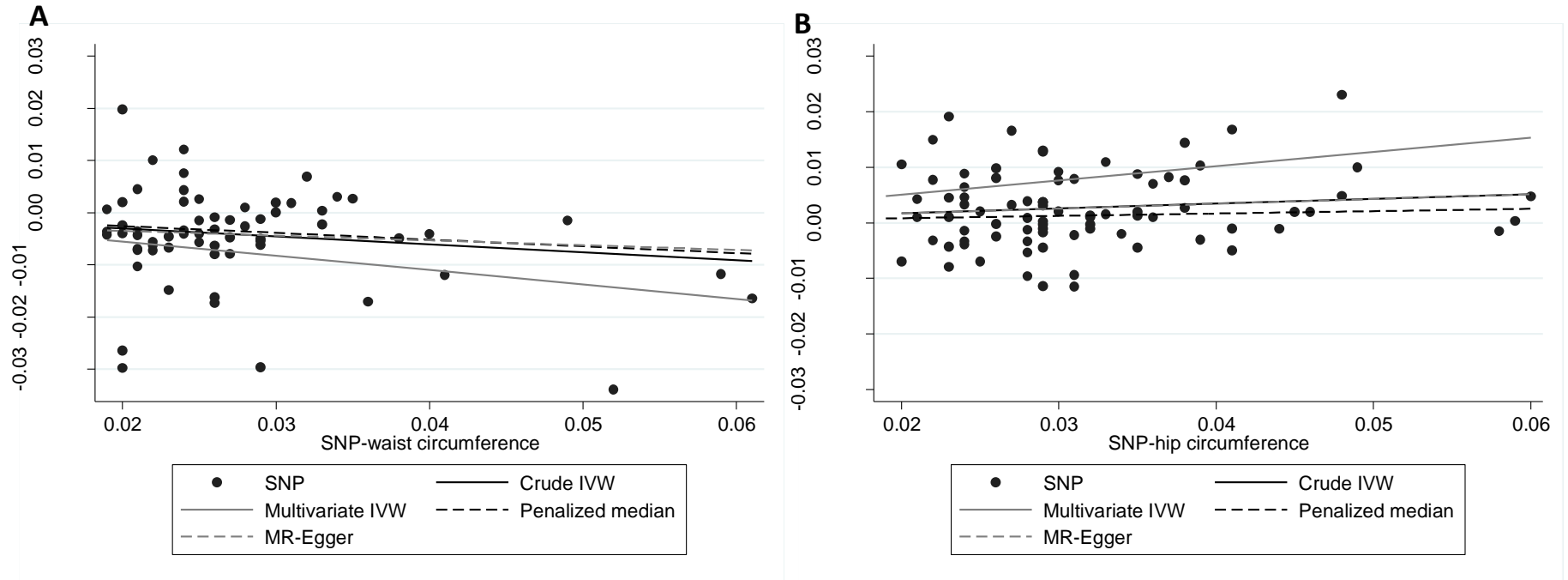




Figure 5.



**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

## SUPPLEMENTARY METHODS

### *1982 Pelotas Birth Cohort – Observational analysis*

#### Body composition and anthropometric measures

Abdominal fat depots were measured using the ultrasound machine Toshiba Xario (Toshiba Medical Systems Corp., Tokyo, Japan)<sup>1-3</sup>. Briefly, visceral fat thickness was estimated by the distance between the peritoneum and the lumbar spine at the intersection between the xyphoid line and the waist circumference. Subcutaneous abdominal fat thickness was estimated at the same probe site by the distance between the posterior line of dermis and the outer bowel wall. Intra-observer error was 4.1% for visceral and 3.4% for subcutaneous abdominal fat. Inter-observer technical error of measurement was 3.1% for both visceral fat and subcutaneous abdominal fat. Women that were pregnant or three months postpartum were excluded.

Gluteofemoral fat was assessed by Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance—GE, Germany). Participants with osteoarticular disabilities, confirmed or suspected pregnancy, non-removable metallic objects, wheelchair users, extremely obese (weight > 120 kg) or extremely tall (height > 192 cm) individuals were excluded. Weight was measured to the nearest 0.1 kg on a calibrated electronic scale (TANITA model BC-418 MA; Tanita, Tokyo, Japan).

Standing height was assessed to the nearest 0.1 cm using a full-length wall-mounted stadiometer (SECA 240; Seca, Birmingham, United Kingdom).

#### Genomic ancestry

Genomic ancestry was estimated using 370,539 ancestry informative markers shared by samples from the HapMap Project<sup>4</sup>, the Human Genome Diversity Project (HGDP)<sup>5</sup> and the Epigen-Brazil study population<sup>6</sup>. The following HapMap samples were used: 266 Africans (176 Yoruba in Ibadan, Nigeria [YRI] and 90 Luhya in Webuye, Kenya [LWK]), 262 Europeans (174

Utah residents with Northern and Western European ancestry [CEU] and 88 from Tuscans from Italy [TSI]), 170 admixed individuals (77 Mexicans from Los Angeles, California [MEX] and 83 Afro-African from Southwest USA [ASW]), and 93 Native Americans from the HGDP (25 Pima, 22 Karitiana, 25 Maya and 21 Surui). The software ADMIXTURE <sup>7</sup> was used to estimate the contribution from European, African and Native American ancestry for each cohort participant. SNPs were genotyped using Illumina Omni 2.5M-8v1 array (San Diego, California). Further details can be found in Lima-Costa et al. <sup>6</sup>.

### *1982 Pelotas Birth Cohort – Mendelian randomization analysis*

#### *Inverse-variance weighted (IVW) method*

For the crude Mendelian randomization model, the inverse-variance weighted (IVW) method was used to derive the beta coefficient (mean difference in log adiponectin per unit increase in waist or hip circumference) and its standard error by using the following formulas:

$$\hat{\beta}_{IVW} = \frac{\sum_{k=1}^K X_k Y_k \sigma_{yk}^{-2}}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}} \quad SE_{\hat{\beta}_{IVW}} = \sqrt{\frac{1}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}}}$$

Where  $X_k$  is the mean difference in waist or hip circumference per additional effect allele of SNP  $k$  and  $Y_k$  is the mean difference in log adiponectin per additional effect allele of SNP  $k$  with standard error  $\sigma_{yk}$ .

For the multivariate Mendelian randomization model, we fitted a model having betas for SNP-adiponectin levels association as the dependent variable, betas for SNP-waist circumference and SNP-hip circumference as independent variables and inverse variance weights (with no intercept) to estimate the independent association of genetically increased waist or hip circumference with blood adiponectin levels. This method is equivalent to IVW method when there is only one independent variable <sup>8</sup>.

### *MR-Egger regression method*

The Egger regression has been used for almost two decades to detect small study bias in meta-analyses of randomized clinical trials<sup>9</sup>. In this method, the ratio of the effect estimate by its standard error is regressed against the estimate's precision (the inverse of the standard error). Bowden et al.<sup>10</sup> recently proposed an adaptation of the Egger regression to test for bias from pleiotropy in Mendelian randomization studies.

While the IVW estimate is equivalent to the slope of the best fitting line through the observations that pass through the origin, the MR-Egger estimate would be the of the best fitting line through the observations in a model that allows the intercept to vary. In this method, the intercept will reflect the average pleiotropic effect across genetic variants (e.g. mean difference in log adiponectin levels when difference in waist or hip circumference per allele is zero) and the slope coefficient will provide an estimate of the causal effect provided that the InSIDE (Instrument Strength Independent of Direct Effect) assumption holds, which requires that there is no correlation between SNP-exposure association and direct effects of SNP on outcome. The MR-Egger estimate may be underpowered, as it relies on variants having different strengths of association with the risk factor. Bootstrapping (10,000 iterations) was used to derive corrected 95% confidence intervals for MR-Egger intercept and slope using the percentile method<sup>10</sup>.

### *Penalized weighted median estimator*

Median-based methods give consistent estimates even when up to half the genetic variants are invalid instrumental variables. The weighted median estimate is defined as the median of an empirical distribution in which each instrumental variable estimate appears with probability proportional to the inverse of its variance. The weighted median estimate is consistent under the assumption that genetic variants representing over 50% of the weight in the analysis are valid instruments. The contribution of heterogeneous variants to the weighted median estimate was downweighted (penalized) by multiplying the inverse-variance weight by the p-value of a chi-squared distribution (1 degree of

freedom) corresponding to the Q statistics of each SNP when p-value < 0.05<sup>11</sup>. Bootstrapping (1,000 iterations) was carried out and the bootstrap standard error (the standard deviation of the bootstrap estimates) and a normal approximation (estimate  $\pm$  1.96\*standard error) were used to derive 95% confidence interval<sup>11</sup>.

## SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

**Supplementary table 1.** Core instrumental variable assumptions and strategies used to address them

Assumption	Graphical examples of assumption violation*	Consequences of potential violation	Validation of assumption in the current analysis
1. IV should be (strongly) associated with the exposure		A weak association between the IV and E can reduce precision and introduce weak instrument bias, which tends to bias in the causal estimate towards the OLS estimate in one-sample MR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The strength of association SNPs was explored using the F-statistic (<math>F &gt; 20</math> for every SNP)</li> <li>- In two-sample MR studies with non-overlapping datasets, any bias from weak instruments would be in the direction of the null and, thus, should not result in false positive findings</li> </ul>
2. IV should only affect the outcome through the exposure		Bias in MR estimate can result from horizontal pleiotropy (e.g. genetic variant itself or a correlated variant is associated with multiple pathways independent of the exposure) the direction and magnitude of this bias will depend up the direction and magnitude of the association path from IV to O that is not via E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- We extensively investigated heterogeneity and asymmetry in IVW estimates</li> <li>- We compared results from the conventional Mendelian randomization analysis to other Mendelian randomization estimators (Penalized weighted median estimator MR-Egger method) based on a less stringent set of assumptions to assess the validity of our findings</li> </ul>
3. IV should be independent of exposure-outcome confounders and IV-outcome exposures		In cases of population stratification, there could be a spurious association between IV and phenotypes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- To reduce the possibility of bias due to population stratification, the analyses were restricted to European-ancestry individuals</li> <li>- All consortia accounted for population structure by adjusting for genomic control inflation factor</li> </ul>

IV: instrumental variable; E: exposure; O: outcome; U: unknown confounder; X: other phenotype; G: other genetic variant in LD; LD: linkage disequilibrium. A dashed arrow was used to indicate weak association between IV and E. Adapted from Vanderweele.<sup>12</sup>

**Supplementary Table 2.** Characteristics of data sources used in the Mendelian randomisation analyses

Consortium	Use	Studies	Study population	Imputation	Quality control criteria†	Model	Adjustments	Data download
ADIPOGen	SNP-adiponectin*	16 cohort studies with GWAS data	29,347 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH, BIMBAM or Beagle (reference: Phase II CEU HapMap population)	Call rate > 0.95; MAF > 0.01; $p_{HWE} > 10^{-6}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , or proper info $\geq 0.4$ )	additive	Age, sex, BMI, principal components of genomic ancestry, study site (where appropriate), family structure (one family-based study) and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	<a href="https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium">https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium</a>
GIANT	SNP-BMI-adjusted WC SNP-BMI-adjusted HipC	101 studies of multiple designs with GWAS or Metachip data	up to 210,088 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH or Beagle (reference: Phase II CEU HapMap population)	Sample call rate > 0.85-0.98; SNP call rate > 0.90-0.99; MAF > 0.00-0.01; $p_{HWE} > 10^{-3}$ - $10^{-7}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , proper info $\geq 0.4$ , or no filtering)	additive	Age, age2, BMI and study specific variables (e.g. principal components of genomic ancestry), and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )‡	<a href="http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files">http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files</a>

\* Blood adiponectin concentration was assessed using ELISA or RIA methods. † Quality control criteria may have varied across studies within each consortium. ‡ For each GIANT cohort, residuals from the adjusted models were calculated for men and women separately and then transformed by the inverse standard normal function. BMI: body mass index; CEU: Centre d'Etude du Polymorphisme Humain collected in Utah; GIANT: Genetic Investigation of ANthropometric Traits; GWAS: genome-wide association study; HipC: hip circumference; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; MAF: minor allele frequency; SNP: single nucleotide polymorphism; WC: waist circumference.



**Supplementary Table 3.** SNPs used as instrumental variables for waist circumference in Mendelian randomization analysis

rs ID	Chr	EA	NEA	EAf	Beta	SE	P-value	N
rs9435732	1	C	T	0.83	0.031	0.0038	4.E-16	228,579
rs7536458	1	T	G	0.65	0.030	0.0038	1.E-15	228,790
rs12064744	1	T	C	0.34	0.026	0.0035	2.E-14	231,298
rs984222	1	G	C	0.58	0.036	0.0035	2.E-25	231,215
rs11205277	1	G	A	0.39	0.027	0.0036	1.E-13	215,898
rs2274432	1	A	G	0.37	0.025	0.0036	2.E-12	227,843
rs991967	1	C	A	0.19	0.026	0.0037	1.E-12	230,157
rs12991495	2	T	C	0.68	0.028	0.0037	6.E-14	229,964
rs6715793	2	T	C	0.45	0.019	0.0034	1.E-08	231,071
rs3791679	2	A	G	0.73	0.035	0.0039	2.E-19	228,968
rs2052670	2	G	A	0.41	0.020	0.0035	2.E-08	231,210
rs2124969	2	C	T	0.41	0.020	0.0034	7.E-09	231,284
rs13083798	3	A	G	0.54	0.020	0.0034	3.E-09	230,391
rs9864077	3	T	C	0.76	0.022	0.0037	1.E-09	219,478
rs6772896	3	T	C	0.64	0.024	0.0036	2.E-11	231,246
rs7621331	3	A	G	0.69	0.021	0.0036	9.E-09	231,264
rs1344674	3	G	A	0.48	0.024	0.0033	4.E-13	231,241
rs17451107	3	T	C	0.63	0.026	0.0036	1.E-13	227,636
rs12493901	3	G	A	0.54	0.021	0.0034	8.E-10	230,668
rs710841	4	T	C	0.24	0.029	0.0038	9.E-14	230,174
rs1812175	4	G	A	0.81	0.033	0.0045	4.E-13	230,433
rs17541471	5	C	T	0.23	0.023	0.0043	4.E-08	230,478
rs12656497	5	T	C	0.48	0.022	0.0034	2.E-10	231,223
rs459193	5	A	G	0.22	0.025	0.0038	8.E-11	231,220
rs10041657	5	A	G	0.22	0.025	0.0040	3.E-10	230,824
rs272869	5	G	A	0.66	0.021	0.0034	7.E-10	229,935
rs4868125	5	G	C	0.64	0.021	0.0036	3.E-09	225,860
rs10516107	5	A	G	0.29	0.023	0.0036	8.E-11	231,310
rs6556301	5	T	G	0.38	0.028	0.0039	2.E-12	191,245
rs806794	6	A	G	0.73	0.030	0.0037	2.E-15	224,418
rs1776897	6	G	T	0.08	0.061	0.0067	6.E-20	197,374
rs998584	6	A	C	0.48	0.029	0.0038	6.E-15	210,814
rs395962	6	T	G	0.37	0.029	0.0036	1.E-15	231,306
rs2745359	6	C	T	0.07	0.052	0.0087	2.E-09	178,085
rs2745353	6	T	C	0.55	0.029	0.0033	8.E-19	231,143
rs6570507	6	G	A	0.75	0.024	0.0037	6.E-11	228,993
rs798489	7	C	T	0.73	0.025	0.0037	1.E-11	230,932
rs2214442	7	G	A	0.44	0.026	0.0045	4.E-09	152,053
rs4141278	7	C	T	0.18	0.034	0.0043	3.E-15	231,233
rs7801581	7	T	C	0.26	0.027	0.0042	8.E-11	216,463
rs849140	7	T	C	0.40	0.029	0.0034	5.E-17	228,910
rs12679556	8	G	T	0.21	0.026	0.0039	1.E-11	225,056
rs473902	9	T	G	0.94	0.049	0.0071	4.E-12	204,544

rs7854560	9	T	C	0.27	0.026	0.0037	5.E-12	229,674
rs10748826	10	T	C	0.58	0.023	0.0037	3.E-10	195,019
rs2638953	12	C	G	0.63	0.024	0.0036	7.E-11	228,074
rs2071449	12	A	C	0.33	0.032	0.0036	3.E-18	226,567
rs7970350	12	C	T	0.51	0.019	0.0034	4.E-08	229,815
rs12317176	12	T	C	0.62	0.020	0.0035	6.E-09	230,924
rs12372180	12	A	G	0.07	0.041	0.0073	3.E-08	219,175
rs7166081	15	A	G	0.81	0.024	0.0039	2.E-09	230,255
rs4886782	15	G	A	0.73	0.024	0.0036	6.E-12	228,446
rs4262914	15	A	G	0.54	0.021	0.0034	1.E-09	230,760
rs7162542	15	G	C	0.52	0.038	0.0034	1.E-28	229,892
rs4246302	15	G	A	0.33	0.022	0.0037	6.E-09	227,205
rs4567683	15	A	G	0.28	0.022	0.0038	8.E-09	228,589
rs16957304	16	A	G	0.95	0.059	0.0110	3.E-08	151,917
rs3760318	17	G	A	0.64	0.021	0.0035	9.E-10	228,998
rs757608	17	A	G	0.30	0.027	0.0036	1.E-13	229,039
rs4239436	18	G	A	0.74	0.040	0.0041	1.E-22	229,607
rs12608504	19	A	G	0.34	0.020	0.0036	2.E-08	228,998
rs3786897	19	G	A	0.41	0.020	0.0035	9.E-09	228,567
rs979012	20	T	C	0.36	0.033	0.0036	5.E-20	229,815
rs2179129	22	A	G	0.55	0.019	0.0034	3.E-08	228,844

Chr: chromosome; EA: effect allele (trait-increasing allele); NEA: non-effect allele; EAF: effect allele frequency; Beta: increase in increase standardized waist circumference per EA; SE: standard error; N: sample size.

**Supplementary Table 4.** SNPs used as instrumental variables for hip circumference in Mendelian randomization analysis

rs ID	Chr	EA	NEA	EAf	Beta	SE	P-value	N
rs6657613	1	T	A	0.53	0.031	0.0036	4.E-18	210,917
rs12086130	1	T	C	0.10	0.037	0.0063	3.E-09	206,610
rs3748656	1	C	T	0.80	0.024	0.0042	6.E-09	210,890
rs11205303	1	C	T	0.36	0.041	0.0040	6.E-25	196,314
rs17346473	1	G	A	0.22	0.030	0.0040	3.E-14	210,431
rs12075079	1	G	A	0.16	0.031	0.0043	5.E-13	211,016
rs2301453	1	A	G	0.54	0.022	0.0035	6.E-10	210,882
rs1046934	1	C	A	0.38	0.023	0.0037	6.E-10	210,450
rs991967	1	C	A	0.19	0.022	0.0038	7.E-09	210,314
rs2820443	1	C	T	0.30	0.048	0.0039	2.E-35	211,030
rs6672530	1	A	C	0.77	0.028	0.0046	8.E-10	208,172
rs1545552	2	G	A	0.71	0.029	0.0040	6.E-13	208,132
rs3791679	2	A	G	0.73	0.038	0.0041	1.E-20	210,979
rs10195252	2	C	T	0.44	0.023	0.0036	1.E-10	210,403
rs4973517	2	T	C	0.75	0.029	0.0045	2.E-10	175,930
rs11242	3	T	C	0.43	0.027	0.0036	6.E-14	204,637
rs1388251	3	A	G	0.74	0.023	0.0040	2.E-08	211,029
rs10804591	3	C	A	0.15	0.038	0.0044	7.E-18	210,953
rs724016	3	G	A	0.48	0.048	0.0035	8.E-43	211,032
rs4243400	3	G	A	0.50	0.025	0.0036	3.E-12	210,478
rs2098771	3	G	A	0.33	0.022	0.0041	4.E-08	196,732
rs6845078	4	C	T	0.84	0.035	0.0051	9.E-12	207,534
rs9993613	4	T	G	0.51	0.027	0.0045	7.E-10	143,494
rs1662837	4	C	T	0.28	0.028	0.0038	1.E-13	210,825
rs12648786	4	A	G	0.41	0.032	0.0039	2.E-16	199,289
rs1812175	4	G	A	0.81	0.059	0.0048	2.E-34	211,054
rs11736535	4	G	A	0.30	0.029	0.0046	1.E-10	143,695
rs11730399	4	A	C	0.95	0.060	0.0083	5.E-13	173,372
rs1173771	5	A	G	0.48	0.026	0.0036	6.E-13	210,986
rs7703857	5	T	C	0.41	0.028	0.0045	5.E-10	143,721
rs1294410	6	T	C	0.38	0.029	0.0037	2.E-15	210,861
rs13216391	6	G	A	0.15	0.028	0.0047	3.E-09	199,240
rs11754288	6	A	G	0.47	0.021	0.0036	3.E-09	210,954
rs806794	6	A	G	0.73	0.046	0.0040	2.E-31	204,203
rs12210905	6	A	G	0.88	0.033	0.0058	1.E-08	210,929
rs1759645	6	C	T	0.13	0.029	0.0051	9.E-09	209,671
rs16894959	6	C	T	0.10	0.036	0.0050	3.E-13	210,242
rs975496	6	G	A	0.84	0.031	0.0051	1.E-09	199,331
rs6903448	6	C	T	0.84	0.034	0.0050	5.E-12	211,031
rs12207675	6	C	T	0.13	0.041	0.0055	1.E-13	211,077
rs7759938	6	C	T	0.36	0.028	0.0038	2.E-13	211,029
rs1538170	6	T	C	0.38	0.026	0.0038	3.E-12	201,926
rs9491696	6	C	G	0.48	0.023	0.0036	1.E-10	210,813

rs9388766	6	T	C	0.33	0.028	0.0039	8.E-13	211,072
rs6570509	6	G	T	0.74	0.045	0.0040	1.E-29	197,803
rs798497	7	A	G	0.72	0.035	0.0038	4.E-20	210,942
rs849141	7	A	G	0.29	0.032	0.0039	2.E-16	211,081
rs42235	7	T	C	0.34	0.036	0.0039	8.E-20	208,455
rs3731321	7	T	C	0.87	0.029	0.0052	5.E-08	182,525
rs7008867	8	A	G	0.21	0.024	0.0041	6.E-09	211,066
rs10958476	8	C	T	0.14	0.028	0.0046	9.E-10	199,716
rs6984782	8	T	C	0.88	0.033	0.0054	2.E-09	210,592
rs6470764	8	C	T	0.81	0.039	0.0045	8.E-18	210,864
rs7007820	8	A	G	0.63	0.020	0.0036	1.E-08	211,016
rs473902	9	T	G	0.94	0.058	0.0075	7.E-15	184,792
rs4448343	9	G	A	0.32	0.024	0.0037	3.E-11	210,984
rs10123368	9	C	T	0.20	0.026	0.0044	5.E-09	210,933
rs686320	11	G	C	0.91	0.038	0.0055	7.E-12	199,308
rs2638953	12	C	G	0.63	0.024	0.0038	2.E-10	207,847
rs1351394	12	T	C	0.48	0.025	0.0035	5.E-13	210,068
rs10748128	12	T	G	0.36	0.023	0.0040	4.E-09	197,305
rs7953508	12	T	C	0.25	0.024	0.0040	4.E-09	210,624
rs12817549	12	T	C	0.57	0.029	0.0036	2.E-16	210,856
rs1727294	12	A	G	0.20	0.032	0.0043	8.E-14	208,707
rs3118906	13	G	A	0.76	0.030	0.0039	8.E-15	211,005
rs558003	13	A	G	0.04	0.049	0.0063	4.E-15	199,267
rs10140922	14	G	T	0.63	0.030	0.0046	5.E-11	143,568
rs1254263	14	C	T	0.28	0.029	0.0048	9.E-10	143,808
rs4262914	15	A	G	0.54	0.020	0.0036	2.E-08	210,620
rs7162542	15	G	C	0.52	0.041	0.0036	2.E-30	209,929
rs17193922	16	G	C	0.38	0.024	0.0040	1.E-09	198,589
rs9890032	17	C	G	0.63	0.026	0.0037	2.E-12	207,385
rs561341	17	G	T	0.18	0.031	0.0050	3.E-10	211,106
rs7223966	17	A	G	0.33	0.029	0.0039	2.E-13	211,080
rs1120297	17	T	C	0.48	0.021	0.0035	2.E-09	210,991
rs4369779	18	C	T	0.74	0.035	0.0044	3.E-15	210,787
rs181553	18	A	G	0.68	0.029	0.0038	9.E-15	210,832
rs12980348	19	G	T	0.38	0.029	0.0036	9.E-16	210,456
rs169797	20	A	G	0.75	0.024	0.0040	1.E-09	204,594
rs6088619	20	G	A	0.13	0.039	0.0054	9.E-13	199,166
rs143384	20	G	A	0.40	0.044	0.0038	1.E-31	209,682
rs6060717	20	C	T	0.16	0.032	0.0047	6.E-12	211,073
rs6141600	20	C	T	0.28	0.035	0.0053	3.E-11	142,740

Chr: chromosome; EA: effect allele (trait-increasing allele); NEA: non-effect allele; EAF: effect allele frequency; Beta: increase in increase in standardized hip circumference per EA; SE: standard error; N: sample size.

**Supplementary Table 5.** SNPs used as instrumental variables for adiponectin concentration in Mendelian randomization analysis and association with log adiponectin concentration

rs ID	Chr	EA	NEA	EAF	Beta	SE	P-value	N
rs6810075	3	T	C	0.63	0.066	0.0048	4.E-41	29140
rs16861209	3	A	C	0.01	0.192	0.0100	3.E-77	29199
rs17366568	3	G	A	0.91	0.154	0.0087	3.E-66	24865
rs3774261	3	A	G	0.60	0.070	0.0046	1.E-49	29081

Chr: chromosome; EA: effect allele (trait-increasing allele); NEA: non-effect allele; EAF: effect allele frequency; Beta: increase in increase in log adiponectin concentration per EA; SE: standard error; N: sample size.

**Supplementary Table 6.** Mean difference in fat depots according to ancestry and lifestyle characteristics

	Visceral			Deep subcutaneous abdominal			Superficial subcutaneous abdominal			Gluteofemoral		
	$\beta$	95% CI		$\beta$	95% CI		$\beta$	95% CI		$\beta$	95% CI	
<i>Males (n = 1,315)</i>												
African ancestry (%)												
0.00-4.59	Ref			Ref			Ref			Ref		
4.60-10.99	0.01	-0.12	0.13	-0.02	-0.14	0.10	-0.03	-0.16	0.10	-0.09	-0.22	0.04
11.00-87.91	-0.11	-0.24	0.02	-0.19	-0.31	-0.07	-0.06	-0.18	0.07	-0.27	-0.40	-0.14
Leisure-time physical activity												
Inactive	Ref			Ref			Ref			Ref		
Insufficiently active	-0.02	-0.15	0.11	-0.02	-0.15	0.11	-0.08	-0.22	0.05	-0.08	-0.22	0.06
Active	-0.18	-0.30	-0.06	-0.10	-0.22	0.02	-0.09	-0.21	0.04	-0.13	-0.26	0.00
Smoking												
Never smoker	Ref			Ref			Ref			Ref		
Ex-smoker	0.13	-0.01	0.27	-0.10	-0.24	0.03	-0.17	-0.31	-0.03	-0.05	-0.20	0.10
1-9 cigarettes/day	-0.04	-0.23	0.16	-0.33	-0.51	-0.14	-0.37	-0.57	-0.18	-0.39	-0.60	-0.19
$\geq 10$ cigarettes/day	-0.03	-0.17	0.11	-0.39	-0.52	-0.26	-0.46	-0.59	-0.32	-0.40	-0.55	-0.26
Alcohol drinking												
< 1 dose/day	Ref			Ref			Ref			Ref		
$\geq 1$ dose/day	0.18	0.08	0.29	-0.03	-0.14	0.07	-0.09	-0.20	0.02	0.01	-0.11	0.12
<i>Females (n = 1,427)</i>												
African ancestry (%)												
0.00-4.59	Ref			Ref			Ref			Ref		
4.60-10.99	0.06	-0.07	0.18	-0.06	-0.18	0.07	-0.02	-0.15	0.10	-0.13	-0.26	0.00
11.00-87.91	0.21	0.09	0.33	0.02	-0.10	0.15	0.10	-0.02	0.23	-0.03	-0.16	0.10
Leisure-time physical activity												
Inactive	Ref			Ref			Ref			Ref		
Insufficiently active	-0.21	-0.35	-0.07	0.02	-0.12	0.16	0.03	-0.11	0.17	-0.05	-0.19	0.10
Active	-0.30	-0.42	-0.17	-0.08	-0.21	0.05	-0.10	-0.23	0.02	-0.07	-0.20	0.06
Smoking												
Never smoker	Ref			Ref			Ref			Ref		
Ex-smoker	0.07	-0.07	0.20	-0.02	-0.16	0.12	-0.03	-0.16	0.11	-0.08	-0.22	0.06
1-9 cigarettes/day	-0.04	-0.22	0.14	0.00	-0.18	0.19	-0.16	-0.34	0.02	-0.28	-0.47	-0.09
$\geq 10$ cigarettes/day	0.15	0.00	0.31	-0.13	-0.29	0.03	-0.25	-0.40	-0.09	-0.31	-0.47	-0.15
Alcohol drinking												
< 1 dose/day	Ref			Ref			Ref			Ref		
$\geq 1$ dose/day	-0.01	-0.12	0.09	0.04	-0.07	0.15	-0.04	-0.14	0.07	0.05	-0.06	0.16

Results are expressed as mean difference in relation to the reference category (Ref) and 95% confidence interval (95% CI). Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

**Supplementary Table 7. Correlation matrix**

		BMI	Total fat	VAT	dSCAAT	sSCAAT	GFAT
MALE	BMI	1.00	0.89	0.67	0.66	0.60	0.84
	Total fat	0.89	1.00	0.62	0.75	0.71	0.97
	VAT	0.67	0.62	1.00	0.35	0.30	0.53
	dSCAAT	0.66	0.75	0.35	1.00	0.59	0.71
	sSCAAT	0.60	0.71	0.30	0.59	1.00	0.69
	GFAT	0.84	0.97	0.53	0.71	0.69	1.00
FEMALE	BMI	1.00	0.94	0.63	0.71	0.66	0.89
	Total fat	0.94	1.00	0.55	0.73	0.68	0.97
	VAT	0.63	0.55	1.00	0.34	0.31	0.48
	dSCAAT	0.71	0.73	0.34	1.00	0.46	0.65
	sSCAAT	0.66	0.68	0.31	0.46	1.00	0.61
	GFAT	0.89	0.97	0.48	0.65	0.61	1.00

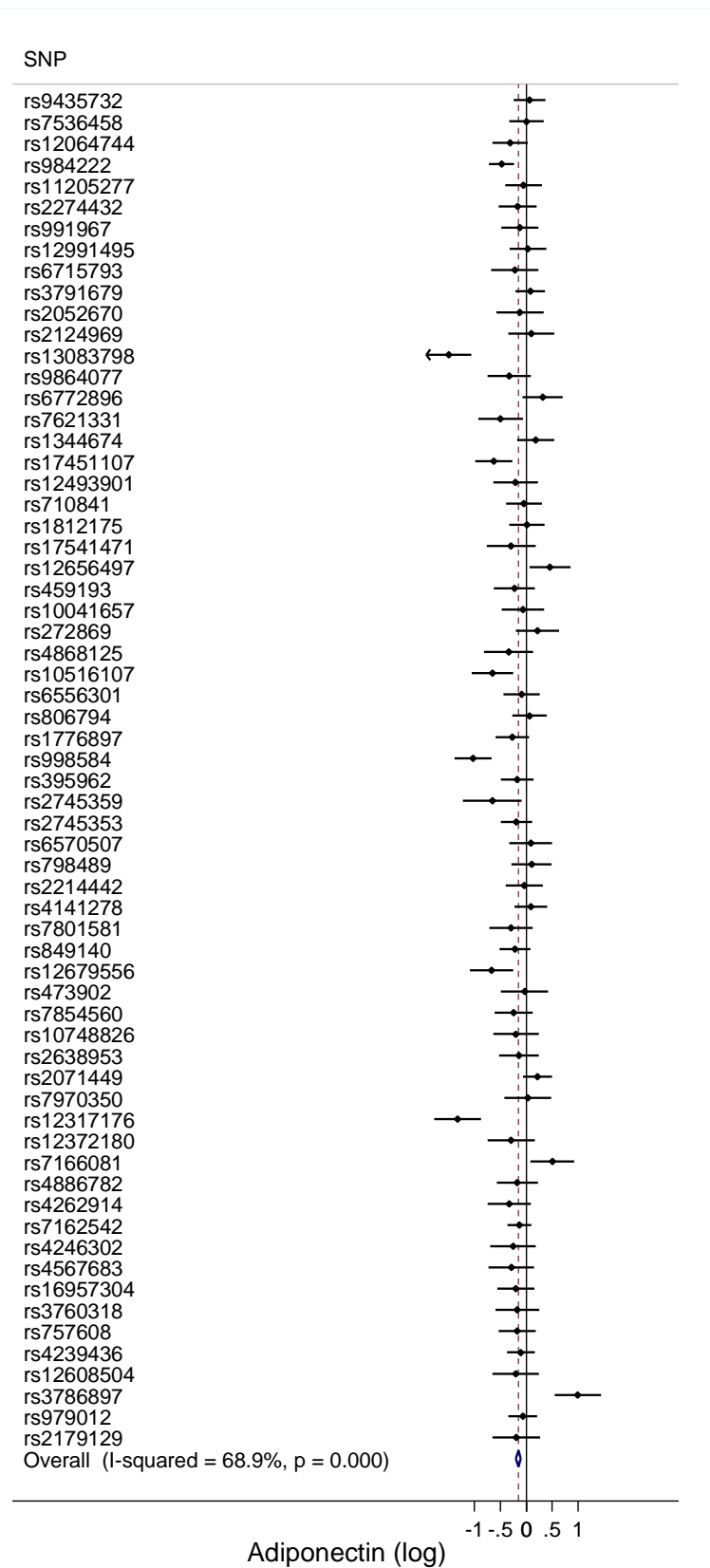
BMI: body mass index; GFAT: gluteofemoral adipose tissue; dSCAAT: deep subcutaneous adipose tissue; sSCAAT: superficial subcutaneous adipose tissue; VAT: visceral adipose tissue. Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort.

**Supplementary Table 8.** P values for the association of study variables with missingness indicator

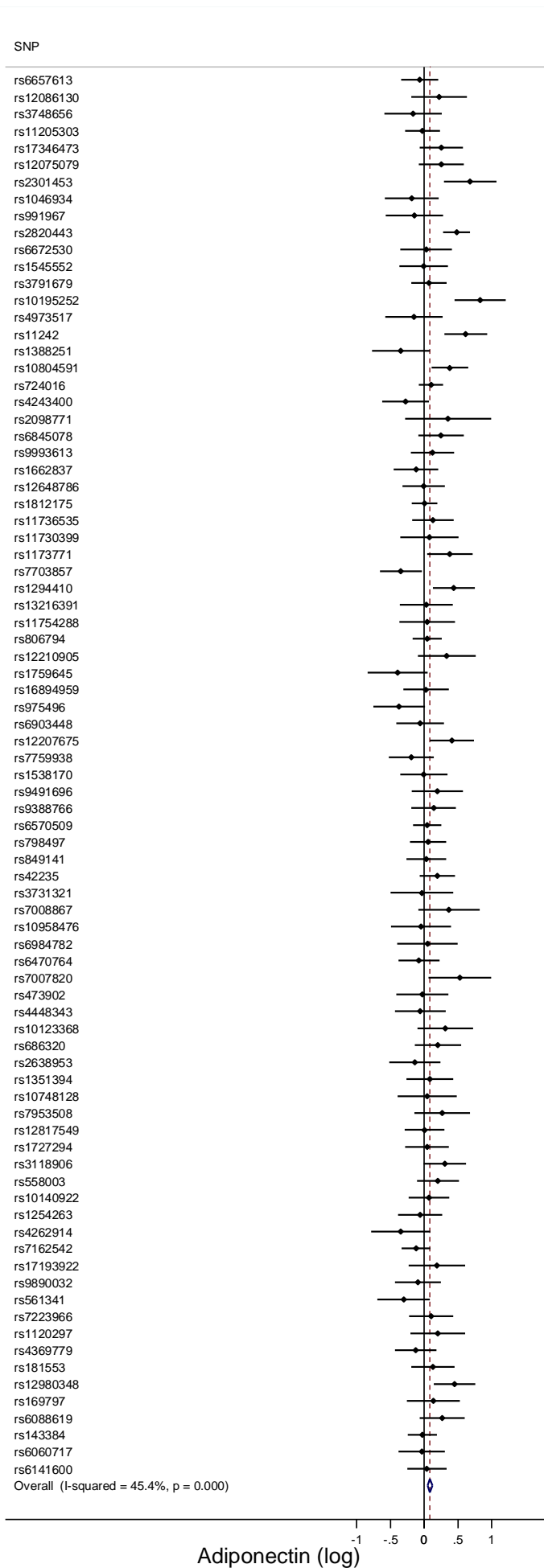
Variable	P values	
	Males	Females
African ancestry (%)	0.130	0.670
LTPA (min/week)	<b>0.004</b>	<b>0.008</b>
Smoking (cigarettes/week)	0.470	0.470
Alcohol drinking (g/week)	<b>0.037</b>	<b>0.014</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>1E-08</b>	0.780
VAT (cm)	<b>2E-04</b>	0.700
Deep SCAAT (cm)	<b>3E-05</b>	0.700
Superficial SCAAT (cm)	<b>0.013</b>	0.450
GFAT (kg)	0.160	0.320
Adiponectin (ng/mL)	0.800	0.750
Glucose (mg/dL)	0.120	0.860
CRP (mg/L)	0.160	0.180

Data from the 2012 follow-up of the 1982 Pelotas Birth Cohort

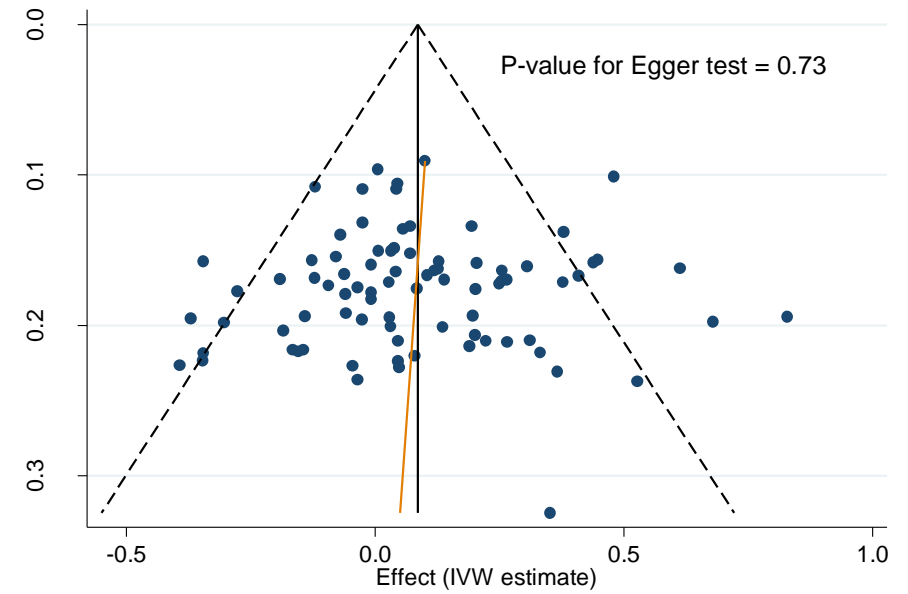
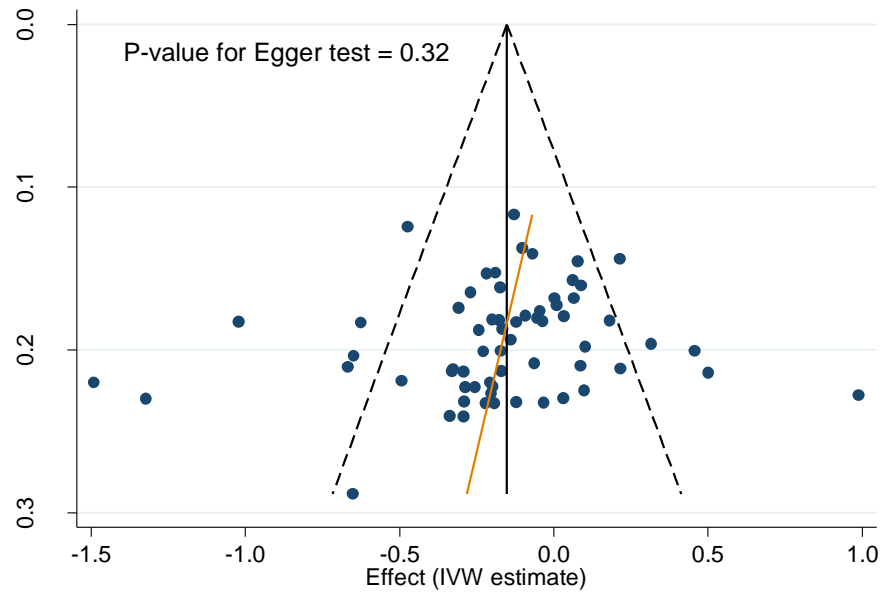




**Supplementary Figure 1.** Meta-analysis and heterogeneity analysis of Mendelian randomization estimates of each SNP for the association of waist circumference with blood adiponectin levels. Data from GIANT and ADIPOGen consortia.



**Supplementary Figure 2.** Meta-analysis and heterogeneity analysis of Mendelian randomization estimates of each SNP for the association of hip circumference with blood adiponectin levels. Data from GIANT and Adipogen consortia.



**Supplementary Figure 3.** Funnel plot of instrument precision (standard error of IVW estimate) against IVW estimates for each genetic variant for Mendelian randomization analysis of the influence of waist (A) or hip (B) circumference on adiponectin levels. Each blue dot corresponds to estimates of one genetic variant. Full vertical line represents the overall IVW estimate and dashed lines represent pseudo 95% confidence limits. Red line indicates the presence of asymmetry. IVW: inverse-variance weighted method. Data from GIANT and ADIPOGen consortia

## Reference

1. Rolfe Ede L, Loos RJ, Druet C, et al. Association between birth weight and visceral fat in adults. *Am J Clin Nutr* 2010 Aug;**92**(2): 347-52.
2. Stolk RP, Wink O, Zelissen PM, Meijer R, van Gils AP, Grobbee DE. Validity and reproducibility of ultrasonography for the measurement of intra-abdominal adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001 Sep;**25**(9): 1346-51.
3. Araujo de Franca GV, Lucia Rolfe E, Horta BL, et al. Associations of birth weight, linear growth and relative weight gain throughout life with abdominal fat depots in adulthood: the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2015 Sep 23.
4. International HapMap C, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010 Sep 2;**467**(7311): 52-8.
5. Li JZ, Absher DM, Tang H, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 2008 Feb 22;**319**(5866): 1100-4.
6. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Genomic ancestry and ethnorracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* 2015;**5**: 9812.
7. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 2009 Sep;**19**(9): 1655-64.
8. Burgess S, Dudbridge F, Thompson SG. Re: "Multivariable Mendelian randomization: the use of pleiotropic genetic variants to estimate causal effects". *Am J Epidemiol* 2015 Feb 15;**181**(4): 290-1.

9. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997 Sep 13;**315**(7109): 629-34.
10. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. *Int J Epidemiol* 2015 Apr;**44**(2): 512-25.
11. Bowden J, Smith GD, Haycock PC, Burgess S. Consistent estimation in Mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator. *Genetic Epidemiology (in press)* 2016.
12. VanderWeele TJ, Tchetgen Tchetgen EJ, Cornelis M, Kraft P. Methodological challenges in mendelian randomization. *Epidemiology* 2014 May;**25**(3): 427-35.

***SEÇÃO VI - ARTIGO 2: Metabolic  
signature of adiponectin levels in  
adults: observational and  
Mendelian randomization analysis***

---

**Metabolic signature of adiponectin levels in adults: observational and Mendelian randomization analysis**

Borges, Maria Carolina<sup>1</sup>, carolina.borges.mcb@gmail.com

Barros, Aluísio JD<sup>1</sup>, abarros.epi@gmail.com

Lawlor, Debbie A<sup>2,3</sup>, D.A.Lawlor@bristol.ac.uk

Casas, Juan Pablo<sup>4</sup>, jp.casas@ucl.ac.uk

Horta, Bernardo Lessa<sup>1</sup>, blhorta@gmail.com

Kivimaki, Mika<sup>5</sup>, mika.kivimaki@helsinki.fi

Kumari, Meena<sup>5,6</sup>, mkumari@essex.ac.uk

Usha, Menon<sup>7</sup>, u.menon@ucl.ac.uk

Gaunt, Tom<sup>2,3</sup>, tom.gaunt@bristol.ac.uk

Ben-Shlomo, Yoav<sup>3</sup>, y.ben-shlomo@bristol.ac.uk

Freitas, Deise F<sup>1</sup>, ise.freitas07@hotmail.com

Oliveira, Isabel O<sup>1,8</sup>, isabel.ufpel@gmail.com

Hingorani, Aroon<sup>4</sup>, a.hingorani@ucl.ac.uk

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>2</sup> MRC Integrative Epidemiology Unit at the University of Bristol, Bristol, UK

<sup>3</sup> School of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, UK

<sup>4</sup> Institute of Cardiovascular Science and Farr Institute, University College London, London, UK

<sup>5</sup> Department of Epidemiology and Public Health, University College London, London, UK

<sup>6</sup> Institute for Social and Economic Research, University of Essex, Essex, UK

<sup>7</sup> Department for Women's Cancer, Institute for Women's Health, Faculty of Population Health Sciences, University College London, London, UK

<sup>8</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

Corresponding author: Borges MC. Rua Marechal Deodoro, 1160 - 3° Piso, Centro, Pelotas, RS, Brazil. Zipcode: 96020-220. Phone: +55 (53) 3284 - 1300. Email: [carolina.borges.mcb@gmail.com](mailto:carolina.borges.mcb@gmail.com)



## ABSTRACT

**Background:** Adiponectin, a protein largely produced by mature adipocytes, has insulin-sensitizing, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and cardiomyocyte-protective properties in animal models. However, the systemic effects of adiponectin in humans are unknown.

**Objectives:** Our aims were to: (i) define the metabolic signature associated with blood adiponectin levels and (ii) investigate whether variation in adiponectin levels causally affect the systemic metabolic profile.

**Methods:** We applied multivariable regression and Mendelian randomization (using adiponectin genetic variants as instrumental variables for adiponectin's causal effect) to five longitudinal studies: the 1982 Pelotas Birth Cohort (PEL82), including adults aged 30 years old born in the city of Pelotas, Brazil, in 1982; the British Women's Heart and Health Study (BWHHS), including UK women aged 60-79 years old at recruitment in 2000; the Whitehall-II Study (WHII), including UK government workers aged 45-69 years at phase 5 in 1997-1999; the Caerphilly Prospective Study (CaPS), including men aged 52-72 years at phase III in 1989-1993; and a case-control study nested in The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS), including UK postmenopausal women aged 50-74 years at recruitment in 2001-2005.

**Results:** In pooled analyses higher circulating adiponectin was associated with a cardio-protective metabolic pattern, notably with higher HDL lipids and lower VLDL lipids, insulin, and branched-chain amino acids levels. Our Mendelian randomization analyses were not consistent with a causal influence of adiponectin on systemic metabolites levels. Findings were consistent across the five studies and in females and males.

**Conclusion:** Our findings indicate that blood adiponectin concentration is an epiphenomenon in the context of metabolic disease, rather than a key determinant.

## INTRODUCTION

The recognition that adipose tissue is an endocrine organ raised new prospects for discovering adipose-derived products that could be valuable drug targets for the treatment and prevention of cardio-metabolic diseases. In this context, adiponectin, a 30KDa protein largely produced by mature adipocytes, has been attracting widespread attention due to its insulin-sensitizing, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and cardiomyocyte-protective properties, as demonstrated in animal models (1).

However, human studies have yielded a far more complicated picture. Unlike most other adipokines, circulating adiponectin levels are lower with greater adiposity. In prospective human studies higher circulating adiponectin is associated with lower risk of type 2 diabetes (2), hepatic dysfunction (3), and metabolic syndrome (4), but higher mortality in patients with kidney disease, heart failure, previous cardiovascular disease or general elderly cohorts (5-8); this different direction of effect between risk of incident disease and mortality among high risk groups has been called “the adiponectin paradox” (9).

Given the complex metabolic derangements and compensatory epiphenomena that commonly occur in human diseases, the correlation between adiponectin levels and cardio-metabolic diseases might be explained by reverse causality (where disease status could alter adiponectin levels) or residual confounding (where adiponectin could be a marker of another causal factor, such as adiposity or insulin resistance) (10). Classical observational studies cannot distinguish causal from non-causal associations, and randomized controlled trials (RCTs) specifically targeting adiponectin are not available.

Mendelian randomization uses genetic variants (mostly single nucleotide polymorphisms (SNPs)) that are robustly related to the risk factor of interest as tools to assess its role in causing disease (11). The random allocation of parental alleles at meiosis should theoretically reduce confounding in genetic association studies and this has been shown to be the case (12); the unidirectional flow of biological information from genetic variant to phenotypes avoids reverse causality. Mendelian randomization has been used in clinical research to investigate potential etiological mechanisms, such as the causal effects of low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) (13), systolic blood pressure (SBP) (13) and C reactive protein (14) on coronary heart

disease (CHD), validate and prioritize novel drug targets, such as interleukin-6 receptor (15), and increase understanding of current therapies, for example statins (16).

Previous Mendelian randomization studies indicate that circulating adiponectin is a consequence of low insulin sensitivity (17), but whether adiponectin levels are also a cause of insulin sensitivity is uncertain (17-19). Using Mendelian randomization in a study of 63,746 CHD cases and 130,681 controls we have recently shown that adiponectin is not causally related to CHD (20). Whilst multivariable analyses show higher adiponectin levels are associated with lower glycated haemoglobin, insulin, triglycerides and higher high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), using Mendelian randomization, we found little evidence these were causal (20). Whether adiponectin is associated with systemic metabolic profile, and, if it is, what aspects of these associations are causal is unknown. A broader interrogation of the metabolic effects of adiponectin through high-throughput profiling of metabolic status could provide valuable insights into whether adiponectin is a valuable (non-causal) biomarker or causally important in the pathophysiology of some human diseases (21).

We combined genotype, adiponectin and metabolomics profile data from five longitudinal studies with the aim of (i) defining the metabolic signature of blood adiponectin levels and (ii) investigating whether variation in adiponectin levels is causally related to the systemic metabolic profile.

## METHODS

### *Study Populations*

The metabolic signature of blood adiponectin levels was examined in five longitudinal studies: the 1982 Pelotas Birth Cohort (PEL82), including adults aged 30 years old born in the city of Pelotas, Brazil, in 1982 (22, 23); the British Women's Heart and Health Study (BWHHS), including UK women aged 60-79 years old at recruitment in 2000 (24); the Whitehall-II Study (WHII), including UK government workers aged 45-69 years at phase 5 in 1997-1999 (25); the Caerphilly Prospective Study (CaPS), including men aged 52-72 years at phase III in 1989-1993 (26); and a case-control study nested in The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS), including UK postmenopausal women aged 50-74 years at recruitment in 2001-2005 (27). All study participants provided written informed consent, and study protocols were approved by the local ethics committees. Studies' characteristics are summarized on **Table 1**. BWHHS, WHII, CaPS, and UKCTOCS are part of the UCLEB consortium (University College-London School-Edinburgh-Bristol) (28).

### *Metabolite Quantification*

A high-throughput serum nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy platform was utilized to quantify up to 150 metabolic measures and 83 derived measures (ratios) in each study. This NMR platform has been used in several other studies (21, 29, 30) and methodological details have been described elsewhere (31, 32). 60 metabolic measures were selected for this study aimed at representing a broad molecular signature of the systemic metabolite profile, as previously reported by Wurtz et al (33), including: lipoprotein traits (lipids content, particle size, and apolipoproteins), free fatty acids, amino acids, glycolysis-related metabolites, ketone bodies, fluid balance (albumin and creatinine), and inflammatory markers (glycoprotein acetyls). The remaining 90 metabolic measures from the NMR platform are related to other lipid traits (esterified and free cholesterol, total cholesterol, triglycerides, phospholipids, and particle concentration) from 14 lipoprotein subclasses and are not presented in this study. Eight additional measures, not obtained from the NMR platform, were also included in this study: C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-6, fibrinogen, blood viscosity, insulin, glycated haemoglobin

(Hb<sub>A1c</sub>), and systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). PEL82 did not have data on metabolic measures from NMR platform and contributed data to analyses of conventional lipid risk factors (total cholesterol, HDL-c, LDL-c, and triacylglycerols (TAG)), and some of the additional measures described (CRP, Hb<sub>A1c</sub>, SBP, DBP). Adiponectin was available for PEL82, BWHHS and WHII and was assayed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in all of these studies. CaPS and UKCTOCS did not have data on adiponectin levels. Blood samples used for adiponectin, NMR metabolites, and other blood based outcomes were taken after overnight or minimum 6-hours fast in BWHHS and CaPS and on non-fasting samples in PEL82 and UKCTOCS. WHII had a mixture of fasting and non-fasting samples.

### ***Genotyping***

BWHHS, CaPS, WHII and UKCTOCS were genotyped using MetaboChip, a platform comprising 200,000 SNPs, which cover the loci identified by GWAS in cardio-metabolic diseases, and rare variants from the 1000 Genomes Project (34). For PEL82, genotyping was performed by using the Illumina HumanOmni2.5-8v1 array (Illumina Inc.) and approximately 2,500,000 SNPs were genotyped (35). Quality control criteria and imputation using 1000 Genomes European ancestry reference samples have been previously described for studies within UCLEB consortium (28). For PEL82, quality control criteria have been previously described (35) and imputation was performed in two steps: first, genotypes were phased using SHAPEIT; then, IMPUTE2 was used for the actual imputation. For autosomal and X-chromosome SNPs, 1000 Genomes Phase I integrated haplotypes (December 2013 release) and 1000 Genomes Phase I integrated variant set (March 2012 release), respectively, were used. For PEL82, ancestry-informative principal components were calculated by using a linkage disequilibrium–pruned subset of 655,046 autosomal SNPs to adjust analyses for potential population stratification.

### ***Other covariates***

Anthropometric variables (weight and height) were measured in each study using standard procedures and body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) / height (m)<sup>2</sup>. Demographic and smoking status information were obtained through questionnaires.

## **Data analysis**

Prior to analyses, adiponectin and all other 68 metabolic measures were log-transformed and converted into study- and sex-specific standard deviation units. Pregnant women from PEL82 ( $n = 73$ ) were excluded. For both observational and Mendelian randomization analyses, we corrected for multiple testing using the Bonferroni method ( $p = 0.05/68 \text{ metabolites} = 0.0007$ ).

### Observational analysis

The conventional observational association of adiponectin with individual metabolites was estimated using a two-stage individual participant meta-analysis. In the first stage, linear regression models were fitted for each study, adjusting for sex, age at metabolites assessment, and recruitment centre (BWHHS). In the second stage, study-specific estimates were meta-analysed using DerSimonian & Laird random effect model (36). Heterogeneity was assessed using Cochran's Q test (37).

### Genetic analyses

*Selection of genetic variants.* The SNPs used for the Mendelian randomization analysis were selected from 145 SNPs strongly ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) associated with blood adiponectin levels in the European ancestry GWAS meta-analysis from the ADIPOGen consortium (38). Independent SNPs within the *ADIPOQ* locus ( $\pm 50$  kb) have been previously selected by Dastani et al (2013) (39) by linkage disequilibrium (LD) pruning of the genome-wide significant SNPs, retaining SNPs that explained most variance in adiponectin levels in each LD block (LD threshold:  $R^2 < 0.05$  in HapMap CEU population (Utah residents with Northern and Western European ancestry)). This resulted in four SNPs (rs6810075, rs16861209, rs17366568, and rs3774261) (**Table 2**). Data for the association of each selected SNP with adiponectin levels in the discovery GWAS sample was downloaded from ADIPOGen website (<https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium>).

*Association of genetic variants with classical confounders.* The association between genetic variants and classical confounders (sex, age group, smoking, and body mass index) was examined for each study using logistic regression models.

*Mendelian randomization analysis.* In order to allow all participants with relevant genetic and metabolic measure data to contribute to analyses, even when adiponectin data was not available (as in CaPS and UKCTOCS), a two-sample

Mendelian randomization design was used. Two-sample Mendelian randomization is a recent extension to the more conventional one-sample Mendelian randomization and has the additional advantage of avoiding bias due to genetic variants correlating with confounders by chance (statistical overfitting) when samples are independent (40). The two-sample Mendelian randomization estimates and respective standard errors were obtained using the inverse variance-weighted (IVW) method with the following formulas, as described by Burgess et al. (41):

$$\hat{\beta}_{IVW} = \frac{\sum_{k=1}^K X_k Y_k \sigma_{yk}^{-2}}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}} \quad SE_{\hat{\beta}_{IVW}} = \sqrt{\frac{1}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}}}$$

Where  $X_k$  is the mean change in standardized log adiponectin units per additional effect allele of SNP  $k$  and  $Y_k$  is the mean change in standardized units of log metabolic measures per additional effect allele of SNP  $k$  with standard error  $\sigma_{Y_k}$ . To increase precision and avoid bias due to statistical overfitting, estimates for  $X_k$  were obtained from ADIPOGen consortium dataset (38). Prior to analysis, estimates from ADIPOGen consortium were standardized (converted from log adiponectin to standardized log adiponectin units) using individual level data from PEL82 with a similar adiponectin distribution (adiponectin levels in ADIPOGen consortium: mean = 9.8  $\mu\text{g/ml}$  (standard deviation = 5.6); adiponectin levels in 1982 Pelotas Birth Cohort: mean = 9.3  $\mu\text{g/ml}$  (standard deviation = 5.7)). Estimates for  $Y_k$  were derived from each study using linear regression models, adjusting for sex, age, recruitment place (BWHHS and UKCTOCS), and principal components of genomic ancestry (for PEL82 only). Study-specific Mendelian randomization estimates were meta-analysed using inverse variance fixed effect model (36). Heterogeneity across studies was assessed using Cochran's Q test (37). Results from conventional observational and Mendelian randomization analyses were compared using the Z-test:

$$Z = (\beta_{obs} - \beta_{MR}) / \sqrt{(SE_{obs}^2 + SE_{MR}^2)}$$

Where  $\beta_{obs}$  represents estimates from conventional observational analysis (with respective standard error,  $SE_{obs}$ ) and  $\beta_{MR}$  represents estimates from Mendelian randomization analysis (with respective standard error,  $SE_{MR}$ ).

## RESULTS

The study included up to 6,633 adults in the observational analysis and up to 10,116 adults in the Mendelian randomization analysis. Characteristics of participants from each of the five longitudinal studies are listed in **Table 2**. Briefly, the sample was predominantly female (64%), white European (92%), non-smoking (83%), or overweight/obese (62%) individuals. Median blood adiponectin was 8.5 µg/mL (p25-p75: 5.8, 12.6).

### Adiponectin and the Systemic Metabolic Signature

In the multivariable analysis, adiponectin was associated with 50 out of 68 (74%) at nominal level ( $p < 0.05$ ) and 42 out of 68 (62%) after correcting for multiple testing ( $p < 0.0007$ ). Overall, higher circulating adiponectin was associated with a protective systemic metabolite profile. Blood adiponectin levels were strongly related to multiple lipoprotein traits. With higher adiponectin levels, lipid concentration was lower in VLDL subclasses and higher in HDL subclasses, except for small HDL. There was no strong evidence of circulating adiponectin associating with lipid content in LDL subclasses or in IDL. Higher adiponectin was associated with lower cholesterol concentration and mean particle diameter in VLDL and higher diameter in HDL and LDL. Higher levels were associated with higher concentration of apolipoprotein (Apo)-AI and phospholipids and lower triglyceride levels (**Figure 1**).

Higher circulating adiponectin was also associated with better glycemic status (lower glucose and insulin levels), lower blood levels of glycolysis-related metabolites (lactate and pyruvate), saturated fatty acids, systemic inflammatory markers (CRP, IL-6, glycoprotein acetyls and blood viscosity), systolic blood pressure, and higher ketone bodies (acetoacetate and 3-hydroxy-butyrate). In addition, higher adiponectin levels were associated with lower concentrations of free branched chain amino acids (isoleucine, leucine, and valine), aromatic amino acids (phenylalanine and tyrosine), and alanine and higher concentration of glutamine (**Figure 2**).

Pooled estimates for 20 out of 68 (29%) metabolic measures across studies had some evidence of heterogeneity ( $p < 0.05$ ) in the multivariable analyses. This did not seem to be driven by sex differences as findings were consistent between men and women (**Supplementary figures 1 to 4**).



### **Causal effects of adiponectin on the Systemic Metabolic Signature**

Characteristics of the four SNPs (rs6810075, rs16861209, rs17366568 and rs3774261) used in Mendelian randomization and their association with adiponectin levels are shown in **Table 3**. SNPs effect allele frequency were similar across studies, except for rs3774261, which had a higher frequency in PEL85 compared to other studies (49% in PEL82 vs. 38-39% in other studies) (**Table 3**). As expected, there was no consistent evidence that any of the selected SNPs was associated with classical confounders (**Supplementary table 1**).

In the Mendelian randomization analysis, 18 out of 68 (26%) metabolic measures were associated with adiponectin at nominal level ( $p < 0.05$ ) and only 2 out of 68 (3%) were associated after correcting for multiple testing ( $p < 0.0007$ ). Findings from Mendelian randomization analysis were broadly inconsistent with results from conventional observational analysis. Firstly, there was no (strong) evidence that adiponectin influenced HDL and VLDL traits. Secondly, there was weak evidence that genetically-increased adiponectin was positively related to higher concentration of (i) lipids in IDL and LDL subclasses, (ii) cholesterol (free, esterified and remnant), and (iii) phospholipids (phosphatidylcholines and sphingomyelins) (**Figure 1**). Nevertheless, none of these traits remained related to blood adiponectin after correcting for multiple testing in these Mendelian randomization analyses.

Overall, genetically-increased adiponectin levels were not associated with glycemic traits, free amino acids, glycolysis-related metabolites, and inflammatory markers concentration. After correcting for multiple testing, only omega-3 free fatty acids, including docosaenoic acid (DHA), were positively associated with genetically-predicted adiponectin levels (**Figure 2**).

Pooled Mendelian randomization estimates for 7 out of 68 (10%) metabolic measures across studies had some evidence of heterogeneity ( $p < 0.05$ ), suggesting low heterogeneity in models from genetic analysis. This did not seem to be driven by sex differences as findings were consistent between men and women (**Supplementary figures 1 to 4**).

## DISCUSSION

In up to 6,633 adults we found that circulating adiponectin was associated with a cardio-protective metabolic pattern. Metabolomic profiling of higher blood adiponectin levels revealed a pronounced increase of HDL lipids and decrease of VLDL lipids, insulin, and branched-chain amino acids levels. However, when we used genetic variants in the *ADIPOQ* locus to test the causal effect of adiponectin on systemic metabolic profiles amongst up to 10,116 adults, we found little evidence to support the multivariable regression associations representing causal effects. With the exception of omega-3 free fatty acids, our genetic Mendelian randomization analyses did not support a causal effect of adiponectin on metabolic parameters.

Despite the evidence of shared genetic architecture between adiponectin levels and cardio-metabolic diseases (38), previous Mendelian randomization studies have casted doubt on the causal role of blood adiponectin levels in the risk of type 2 diabetes (17) and coronary heart disease (20). In addition, there seems to be no consistent evidence that circulating adiponectin directly affects traditional cardiovascular risk factors, such as HDL-c, LDL-c, triglycerides, and fasting glucose in the population (17). We have added importantly to those previous studies and explore effects on systemic metabolic profiles. Taken together, our and previous Mendelian randomization studies suggest that the association between circulating adiponectin and metabolic biomarkers and cardio-metabolic diseases is likely to be explained by shared pleiotropic factors (confounding) rather than by a direct role of adiponectin in metabolism and downstream cardio-metabolic disease. These results are in contrast to findings from animal models pointing to insulin-sensitizing, anti-inflammatory, and anti-atherogenic actions of adiponectin (1).

Circulating adiponectin is known to be substantially reduced among obese individuals, particularly in the presence of central fat accumulation (43). A recent Mendelian randomization study examining the causal metabolic effects of BMI demonstrated that lower BMI was related to favorable lipoprotein subclass profile and lower levels of branched-chain amino acids, inflammatory markers, and insulin (33), which is remarkably similar to our results from the conventional observational analysis. In addition, numerous studies have shown that adiponectin production is suppressed by insulin action in humans, which seems to be at least partly attributed to regulation at the transcriptional level (10, 44). As an example, elevated circulating

adiponectin is found in contexts of both primary deficiency of insulin (type 1 diabetes) (45) and global insulin resistance due to genetic or acquired defects in the insulin receptor (46). Evidence from animal models has raised the possibility of a bidirectional relationship between adiponectin and insulin levels (47). Early Mendelian randomization studies did indicate that adiponectin could mitigate insulin resistance (18, 19); however, these results could not be replicated in a larger Mendelian randomization study (17), as well as in our study presented here. The well-known metabolic effects of adiposity and insulin on circulating adiponectin levels reinforce that the clustering of adiponectin and several traditional and novel biomarkers is likely to result from confounding due to increasing adiposity and disruption of insulin action.

Strengths of our study include detailed metabolic profile in several longitudinal studies, which enabled us to characterize the metabolic signature of high adiponectin levels beyond traditional biomarkers, as well as the use of Mendelian randomization to disentangle the causal effect of adiponectin on the metabolism. Mendelian randomization analysis can reliably test for the presence of a causal relation under the three assumptions of an instrumental variable (IV) that (1) the IV (genetic variants) are robustly associated with the risk factor of interest (adiponectin), (2) the IV should only affect the outcome (metabolites) through the exposure, and (3) the IV is not associated with exposure-outcome confounders. To ensure that IV assumptions were met, or were at least plausible, we only used SNPs strongly and specifically (within *ADIPOQ* gene) related to adiponectin levels as instrumental variables and we adjusted for population structure in models using data from 1982 Pelotas Birth Cohort, to avoid confounding by population stratification. Two limitations of our study were the limited power in the Mendelian randomization analysis for some metabolites. Importantly, we had limited power to detect possible explanations for the heterogeneity between studies in the multivariable analyses. Results looked consistent between women and men and in the Mendelian randomization analyses there was little evidence of heterogeneity across the metabolites, suggesting that different confounding structures between the studies might explain heterogeneity in the multivariable analyses. We did not have measures of high-molecular weight adiponectin, which is believed to account for most of adiponectin biological effects in experimental settings. However, most human (and many animal model) studies have

not used high-molecular weight adiponectin, and we found the same multivariable observational associations as in previous studies.

Overall, our findings suggest that altered total blood adiponectin concentration is an epiphenomenon in the context of metabolic disease, rather than a key determinant. Interventions targeting manipulation of adiponectin levels are unlikely to result in therapeutic benefits for tackling cardiovascular diseases. Our results highlight the potential of Mendelian randomization analysis and high-throughput metabolomics profiling to yield important insights to advance our understanding in the pathophysiology of common complex diseases and to inform which targets are 'best-bets' for taking forward into drug development, given that drug target validation is a key obstacle underlying the unsustainably high rate of drug development failure. Whilst our, and other studies, suggest adiponectin is not a valuable target for developing drugs aimed at preventing cardio-metabolic diseases, it may nonetheless be a valuable biomarker for predicting these diseases given the wide ranging associations shown here. The associations we have found would need to be replicated in additional independent studies before testing their ability to predict disease outcomes.

## REFERENCES

1. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012;55(9):2319-26.
2. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes A Systematic Review and Meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2009;302(2):179-88.
3. Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism*. 2011;60(3):313-26.
4. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):29-33.
5. Wannamethee SG, Welsh P, Whincup PH, Sawar N, Thomas MC, Gudnarsson V, et al. High adiponectin and increased risk of cardiovascular disease and mortality in asymptomatic older men: does NT-proBNP help to explain this association? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011;18(1):65-71.
6. Lee ES, Park S-s, Kim E, Yoon YS, Ahn H-Y, Park C-Y, et al. Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 2013;42(4):1029-39.
7. Menon V, Li L, Wang X, Greene T, Balakrishnan V, Madero M, et al. Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(9):2599-606.
8. Beatty AL, Zhang MH, Ku IA, Na B, Schiller NB, Whooley MA. Adiponectin is associated with increased mortality and heart failure in patients with stable ischemic heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):587-92.
9. Sattar N, Nelson SM. Adiponectin, diabetes, and coronary heart disease in older persons: unraveling the paradox. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3299-301.
10. Cook JR, Semple RK. Hypoadiponectinemia--cause or consequence of human "insulin resistance"? *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1544-54.

11. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med*. 2008;27(8):1133-63.
12. Smith GD, Lawlor DA, Harbord R, Timpson N, Day I, Ebrahim S. Clustered environments and randomized genes: a fundamental distinction between conventional and genetic epidemiology. *PLoS Med*. 2007;4(12):e352.
13. Ference BA, Julius S, Mahajan N, Levy PD, Williams KA, Flack JM. Clinical effect of naturally random allocation to lower systolic blood pressure beginning before the development of hypertension. *Hypertension*. 2014;63(6):1182-8.
14. Collaboration CRPCHDG, Wensley F, Gao P, Burgess S, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ*. 2011;342:d548.
15. Collaboration IRGCERF, Sarwar N, Butterworth AS, Freitag DF, Gregson J, Willeit P, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet*. 2012;379(9822):1205-13.
16. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JE, Shah T, et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet*. 2015;385(9965):351-61.
17. Yaghootkar H, Lamina C, Scott RA, Dastani Z, Hivert MF, Warren LL, et al. Mendelian randomization studies do not support a causal role for reduced circulating adiponectin levels in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(10):3589-98.
18. Mente A, Meyre D, Lanktree MB, Heydarpour M, Davis AD, Miller R, et al. Causal relationship between adiponectin and metabolic traits: a Mendelian randomization study in a multiethnic population. *PLoS One*. 2013;8(6):e66808.
19. Gao H, Fall T, van Dam RM, Flyvbjerg A, Zethelius B, Ingelsson E, et al. Evidence of a Causal Relationship Between Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 2013;62(4):1338-44.
20. Borges MC, Lawlor DA, de Oliveira C, White J, Horta BL, Barros AJ. Role of Adiponectin in Coronary Heart Disease Risk: A Mendelian Randomization Study. *Circ Res*. 2016;119(3):491-9.

21. Würtz P, Mäkinen VP, Soininen P, Kangas AJ, Tukiainen T, Kettunen J, et al. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. *Diabetes*. 2012;61(6):1372-80.
22. Horta BL, Gigante DP, Gonçalves H, dos Santos Motta J, Loret de Mola C, Oliveira IO, et al. Cohort Profile Update: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Int J Epidemiol*. 2015;44(2):441, a-e.
23. Victora CG, Barros FC. Cohort profile: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*. 2006;35(2):237-42.
24. Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G, study Bwshah. Socioeconomic position in childhood and adulthood and insulin resistance: cross sectional survey using data from British women's heart and health study. *BMJ*. 2002;325(7368):805.
25. Marmot M, Brunner E. Cohort Profile: the Whitehall II study. *Int J Epidemiol*. 2005;34(2):251-6.
26. Patterson CC, Blankenberg S, Ben-Shlomo Y, Heslop L, Bayer A, Lowe G, et al. Which biomarkers are predictive specifically for cardiovascular or for non-cardiovascular mortality in men? Evidence from the Caerphilly Prospective Study (CaPS). *Int J Cardiol*. 2015;201:113-8.
27. Menon U, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Sharma A, Burnell M, Hallett R, et al. Recruitment to multicentre trials--lessons from UKCTOCS: descriptive study. *BMJ*. 2008;337:a2079.
28. Shah T, Engmann J, Dale C, Shah S, White J, Giambartolomei C, et al. Population genomics of cardiometabolic traits: design of the University College London-London School of Hygiene and Tropical Medicine-Edinburgh-Bristol (UCLEB) Consortium. *PLoS One*. 2013;8(8):e71345.
29. Würtz P, Havulinna AS, Soininen P, Tynkkynen T, Prieto-Merino D, Tillin T, et al. Metabolite profiling and cardiovascular event risk: a prospective study of 3 population-based cohorts. *Circulation*. 2015;131(9):774-85.
30. Würtz P, Wang Q, Soininen P, Kangas AJ, Fatemifar G, Tynkkynen T, et al. Metabolomic Profiling of Statin Use and Genetic Inhibition of HMG-CoA Reductase. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(10):1200-10.
31. Soininen P, Kangas AJ, Würtz P, Tukiainen T, Tynkkynen T, Laatikainen R, et al. High-throughput serum NMR metabonomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism. *Analyst*. 2009;134(9):1781-5.

32. Soininen P, Kangas AJ, Würtz P, Suna T, Ala-Korpela M. Quantitative serum nuclear magnetic resonance metabolomics in cardiovascular epidemiology and genetics. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(1):192-206.
33. Würtz P, Wang Q, Kangas AJ, Richmond RC, Skarp J, Tiainen M, et al. Metabolic signatures of adiposity in young adults: Mendelian randomization analysis and effects of weight change. *PLoS Med*. 2014;11(12):e1001765.
34. Voight BF, Kang HM, Ding J, Palmer CD, Sidore C, Chines PS, et al. The metabochip, a custom genotyping array for genetic studies of metabolic, cardiovascular, and anthropometric traits. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002793.
35. Borges MC, Hartwig FP, Oliveira IO, Horta BL. Is there a causal role for homocysteine concentration in blood pressure? A Mendelian randomization study. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(1):39-49.
36. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*. 1986;7(3):177-88.
37. Cochran GW. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics*. 1954;10:101-29.
38. Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, Perry JR, Yuan X, Scott RA, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002607.
39. Dastani Z, Johnson T, Kronenberg F, Nelson CP, Assimes TL, März W, et al. The shared allelic architecture of adiponectin levels and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2013;229(1):145-8.
40. Lawlor DA. Commentary: On Gao C et al. Mendelian randomization study of adiposity-related traits and risk of breast, ovarian, prostate, lung and colorectal cancer. *Int J Epidemiol*. 2016.
41. Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. *Genet Epidemiol*. 2013;37(7):658-65.
42. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med*. 2002;21(11):1539-58.
43. Borges M, Oliveira I, Freitas D, Horta B, Ong K, Gigante D, et al. Obesity-induced hypoadiponectinemia: the opposite influence of central and peripheral fat compartments. *International Journal of Epidemiology* (under review). 2016.



44. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Diabetes*. 2003;52(7):1779-85.
45. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(9):1665-6.
46. Semple RK, Cochran EK, Soos MA, Burling KA, Savage DB, Gorden P, et al. Plasma adiponectin as a marker of insulin receptor dysfunction: clinical utility in severe insulin resistance. *Diabetes Care*. 2008;31(5):977-9.
47. Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, et al. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8748-55.

**Table 1.** Characteristics of participating studies

	PEL82	BWHHS	WHII	CaPS	UKCTOCS case-control <sup>a</sup>
Study design	Cohort	Cohort	Cohort	Cohort	Nested case-control study
Setting	Brazil	United Kingdom	United Kingdom	United Kingdom	United Kingdom
Recruitment setting	Hospitals	General practices	Workplace	General practices and electoral register	Hospitals
Participants	Adults aged 30 years old born in the city of Pelotas in 1982	Women aged 60-79 years old at recruitment	Civil servants aged 45-69 years at phase 5	Men aged 52-72 years old at phase III	Postmenopausal women aged 50 years old and above at recruitment
Phase of data collection	2012 follow-up	Recruitment (2000)	Phase 5 (1997-1999)	Phase III (1989-1993)	Recruitment (2001-2005)
Blood samples fasted	No	Yes	Mixed	Yes	No
N at data collection phase	3,701	4,286	7,870	2,154	4,867
N with adiponectin	3,541	498	2,662	0	0
N with metabolites	3,530 <sup>b</sup>	3,780	4,641	1,225	4,813
N with other phenotypes <sup>c</sup>	3,530-3,617	3,636-3,964	4,620-4,874	608-1,207	0
N with genotype	2,838	1,980	3,078	1,349	1,472
N for multivariable associations	3,494-3,505	397-498	2,443-2,657	—	—
N for MR analyses	2,754-2,784	1,657-1,968	2,774-3021	608-1,210	1,068-1,435
Website	<a href="http://www.epidemioufpel.org.br/site/content/coorte_1982-en/index.php">http://www.epidemioufpel.org.br/site/content/coorte_1982-en/index.php</a>	<a href="http://www.lshtm.ac.uk/eph/ncde/research/bwhhs/index.html">http://www.lshtm.ac.uk/eph/ncde/research/bwhhs/index.html</a>	<a href="http://www.ucl.ac.uk/whitehallII">http://www.ucl.ac.uk/whitehallII</a>	<a href="http://www.bristol.ac.uk/social-community-medicine/projects/caerphilly/about/">http://www.bristol.ac.uk/social-community-medicine/projects/caerphilly/about/</a>	<a href="http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/womens-cancer/gcrc/ukctocs">http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/womens-cancer/gcrc/ukctocs</a>

<sup>a</sup> The nested case-control study consisted of a subsample (n = 4,913) of the original UKCTOCS randomized controlled trial (N = 202,638 recruited individuals).

<sup>b</sup> For PEL82, the only metabolites available were glucose, total cholesterol, HDL-c, LDL-c and TAG.

<sup>c</sup> Other phenotypes include systolic and diastolic blood pressure, glycated hemoglobin, C reactive protein, interleukin-6, fibrinogen and blood viscosity.

BWHHS: British Women's Heart and Health Study; CaPS: The Caerphilly Prospective Study; PEL82: 1982 Pelotas Birth Cohort; UKCTOCS: case-control study nested in The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening; WHII: Whitehall-II Study.

**Table 2.** Characteristics of studies' populations

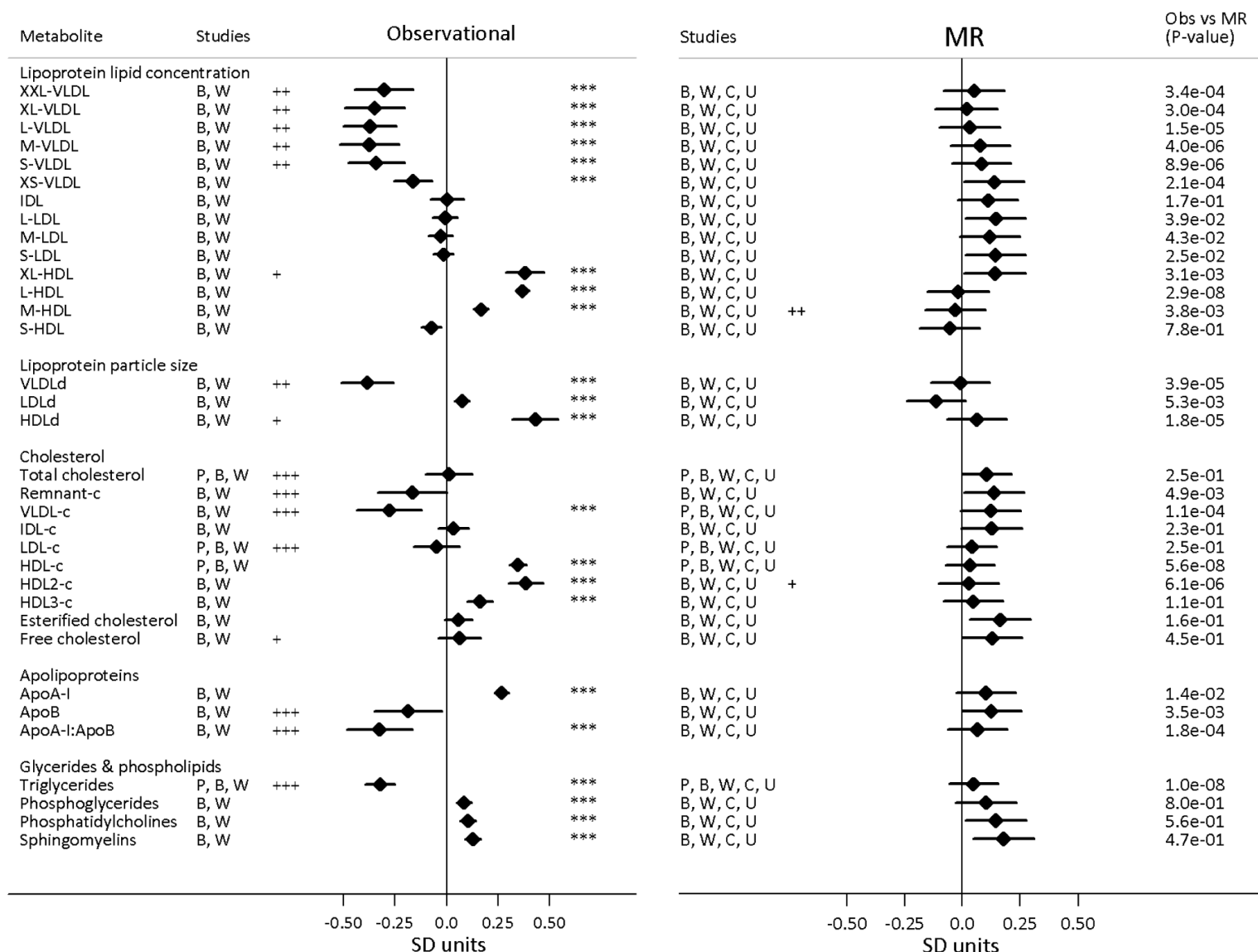
	PEL82	BWHHS	WHII	CaPS	UKCTOCS	TOTAL
			%			
Male	49	0	72	100	0	36
White	75	100	93	—	97	92
Smoker	24	12	17	20	—	17
Overweight/obese	58	72	57	69	60	62
			Median (p25, p75)			
Age (years)	30 (30, 30)	69 (64, 73)	55 (51, 61)	56 (53, 60)	66 (60, 70)	60 (50, 67)
Adiponectin (µg/mL)	7.9 (5.2, 11.9)	15.8 (10.8, 21.5)	8.5 (6.1, 12)	—	—	8.5 (5.8, 12.6)
Glucose (mmol/L)	4.8 (4.4, 5.3)	4.7 (4.3, 5.1)	5 (4.7, 5.4)	3.8 (3.5, 4.2)	2.2 (1.7, 3.1)	4.5 (3.6, 5.1)
HDL-c (mmol/L)	1.5 (1.2, 1.7)	1.6 (1.4, 1.9)	1.5 (1.3, 1.7)	0.9 (0.7, 1)	1.6 (1.4, 1.9)	1.5 (1.3, 1.8)
LDL-c (mmol/L)	2.7 (2.3, 3.3)	2.3 (1.9, 2.8)	1.9 (1.6, 2.2)	1.6 (1.3, 1.9)	1.8 (1.4, 2.2)	2 (1.6, 2.5)
TAG (mmol/L)	1.1 (0.8, 1.6)	1.5 (1.1, 2)	1.1 (0.9, 1.5)	1.5 (1.2, 2)	1.5 (1.1, 2.1)	1.3 (1, 1.8)
SBP (mmHg)	120 (112, 130)	146 (130, 163)	121 (111, 133)	144 (130, 160)	—	128 (115, 144)
DBP (mmHg)	75 (69, 81)	79 (71, 87)	77 (70, 84)	84 (76, 92)	—	78 (70, 85)

BWHHS: British Women's Heart and Health Study; CaPS: The Caerphilly Prospective Study; DBP: diastolic blood pressure; HDL-c: high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein-cholesterol; PEL82: 1982 Pelotas Birth Cohort; SBP: systolic blood pressure; TAG: triacylglycerol; UKCTOCS: case-control study nested in The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening; WHII: Whitehall-II Study.

**Table 3.** Characteristics of SNPs selected for Mendelian randomization analysis

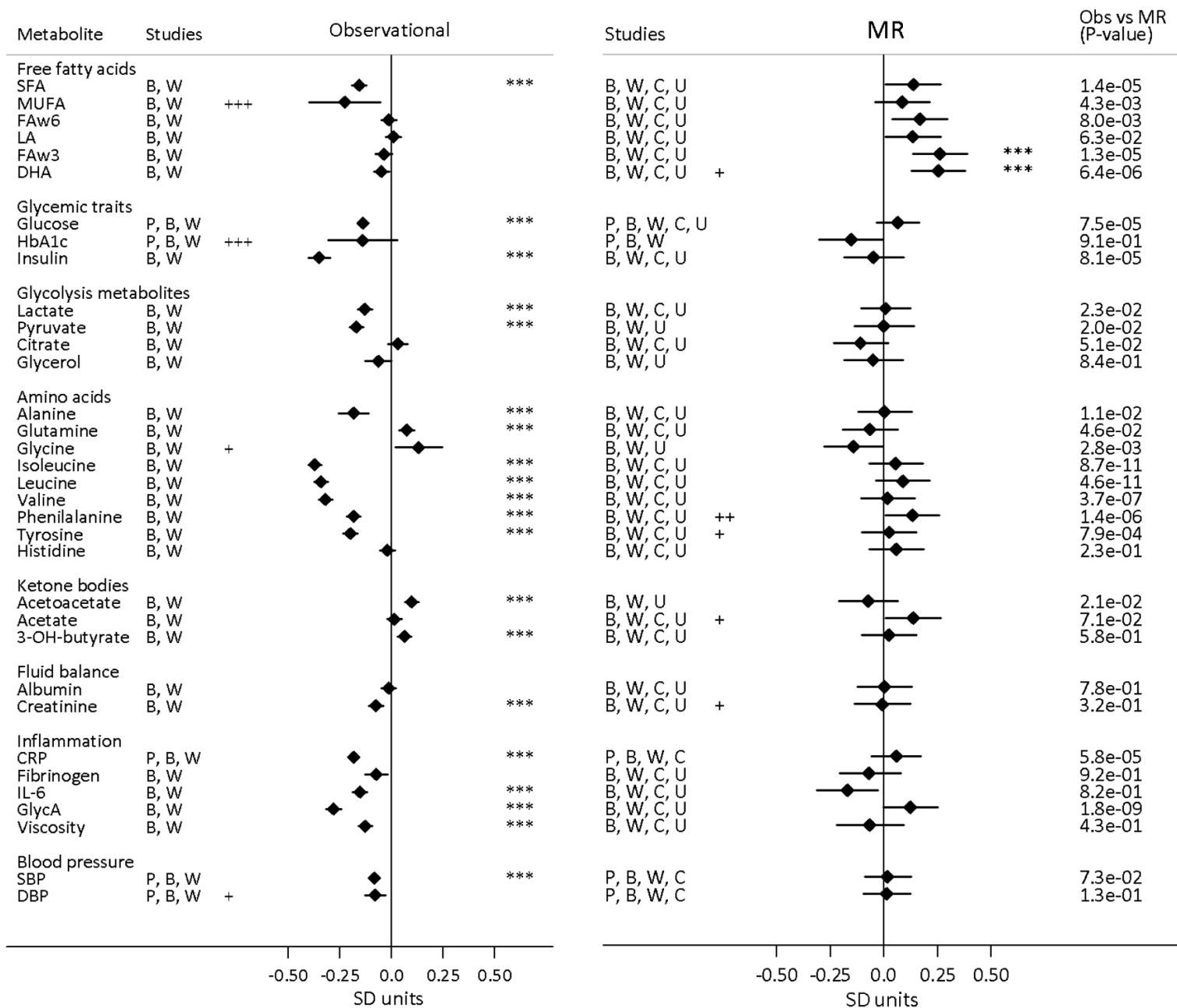
	SNP			
	rs6810075	rs16861209	rs17366568	rs3774261
Chr	3	3	3	3
Position†	186548565	186563114	186570453	186571559
Closest gene	ADIPOQ	ADIPOQ	ADIPOQ-AS1, ADIPOQ	ADIPOQ-AS1, ADIPOQ
EA	T	A	G	A
NEA	C	C	A	G
<i>ADIPOGen consortium</i>				
EAF‡	0.63	0.07	0.90	0.39
Beta§	0.11	0.31	0.25	0.11
SE	0.01	0.02	0.01	0.01
<i>PEL82</i>				
EAF	0.65	0.11	0.92	0.49
Beta	0.13	0.33	0.22	0.08
SE	0.03	0.04	0.05	0.03
R <sup>2</sup>	0.008	0.021	0.005	0.002
<i>BWHHS</i>				
EAF	0.67	0.09	0.89	0.38
Beta	0.32	0.30	1.04	0.30
SE	0.10	0.14	0.24	0.08
R <sup>2</sup>	0.022	0.020	0.051	0.044
<i>WHII</i>				
EAF	0.68	0.10	0.89	0.38
Beta	0.16	0.36	0.56	0.14
SE	0.04	0.05	0.08	0.03
R <sup>2</sup>	0.008	0.027	0.025	0.010
<i>CaPS</i>				
EAF	0.69	0.10	0.89	0.39
Beta	—	—	—	—
SE	—	—	—	—
R <sup>2</sup>	—	—	—	—
<i>UKCTOCS</i>				
EAF	0.69	0.10	0.89	0.38
Beta	—	—	—	—
SE	—	—	—	—
R <sup>2</sup>	—	—	—	—

Beta (and SE) refers to mean difference in standardized log adiponectin per additional SNP effect allele. <sup>a</sup>Genome Reference Consortium Human Build 37. <sup>b</sup>Extracted from Dastani et al (2012) (38). <sup>c</sup>For CaPS and UKCTOCS, data on adiponectin levels were not available. Chr: chromosome; EA: effect allele; NEA: non effect allele; EAF: effect allele frequency; SE: standard error; SNP: single nucleotide polymorphism.



**Figure 1.** Association of lipoprotein traits with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization (MR) analysis.

Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. XXL: extremely large, XL: very large, L: large, M: medium, S: small, XS: very small, VLDL: very low-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, IDL: intermediate-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, B: British Women Heart and Health Study, W: Whitehall II Study, C: The Caerphilly Prospective Study, U: UKCTOCS nested case-control study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.



**Figure 2.** Association of multiple metabolic measures with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization analysis.

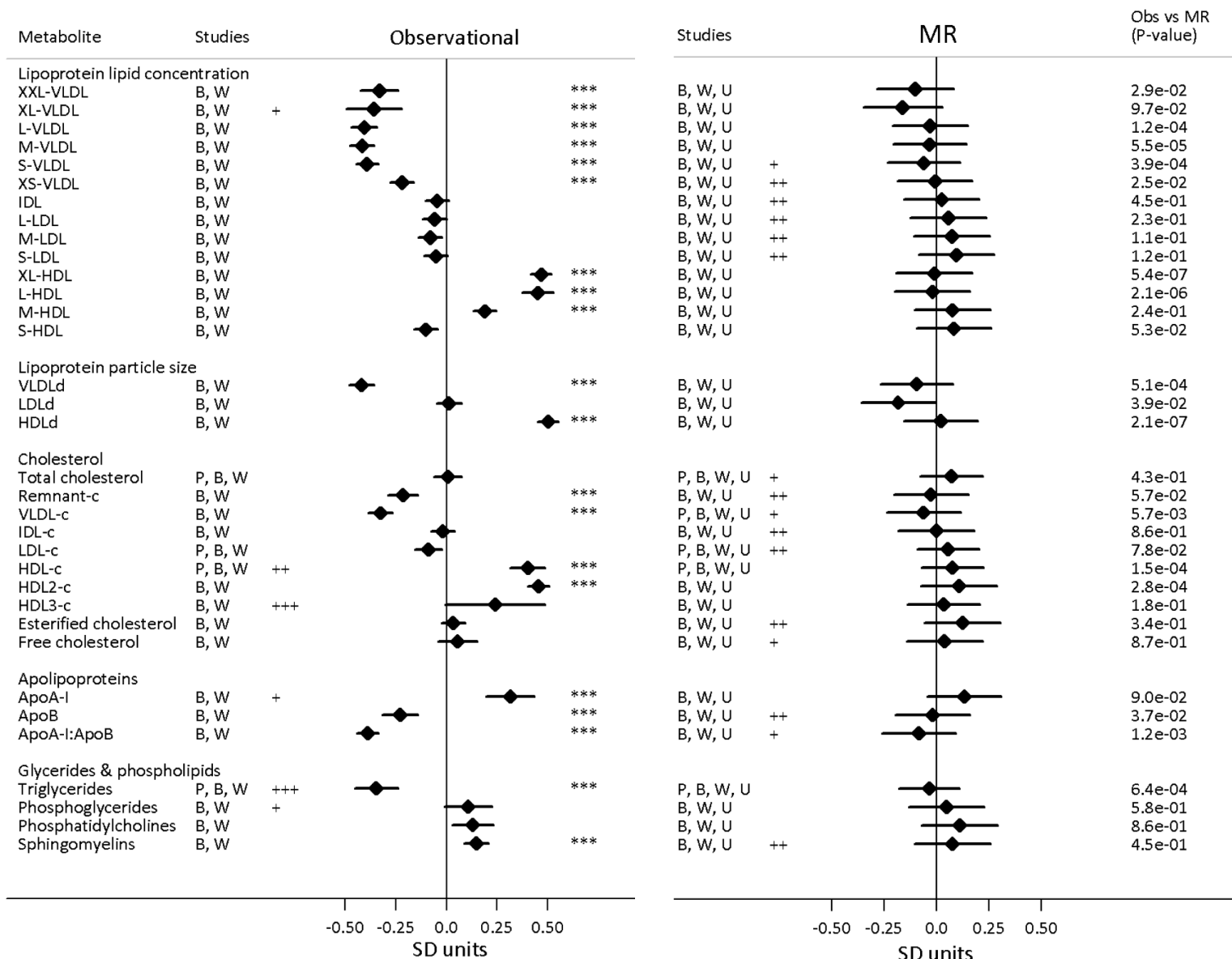
Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, FAw:6: omega-6 fatty acid, LA: linoleic acid, DHA: docosaexaenoic acid, FAw3: omega-3 fatty acid, HbA1c: glycated haemoglobin, CRP: c-reactive protein, IL-6: interleukin-6, GlycA: glycoprotein acetyls, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, B: British Women Heart and Health Study, W: Whitehall II Study, C: The Caerphilly Prospective Study, U: UKCTOCS nested case-control study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.

**Supplementary table 1.** P-values for the association of demographic and lifestyle variables with SNPs selected for Mendelian randomization analysis for each participating study

	PEL82	BWHHS	WHII	CaPS	UKCTOCS
<i>Sex (male vs female)</i>					
rs6810075	0.15	—	0.67	—	—
rs16861209	0.12	—	0.45	—	—
rs17366568	0.36	—	0.84	—	—
rs3774261	0.35	—	0.63	—	—
<i>Age group (<math>\geq 65</math> y vs <math>&lt; 65</math> y)</i>					
rs6810075	—	0.61	0.48	0.19	0.77
rs16861209	—	0.55	0.20	0.58	0.47
rs17366568	—	0.87	0.50	0.56	0.16
rs3774261	—	0.41	0.42	0.41	0.21
<i>White (yes vs no)</i>					
rs6810075	0.06	0.50	0.48	—	0.70
rs16861209	0.75	—	0.12	—	0.16
rs17366568	0.45	0.61	—	—	0.62
rs3774261	0.44	0.95	—	—	0.85
<i>Smoking (yes vs no)</i>					
rs6810075	0.64	0.22	0.77	0.48	—
rs16861209	0.57	0.37	0.87	0.48	—
rs17366568	0.45	0.62	0.44	0.77	—
rs3774261	0.52	0.08	0.90	0.37	—
<i>Body mass index (overweight/obese vs under/normal weight)</i>					
rs6810075	0.98	0.15	0.35	0.38	0.39
rs16861209	1.00	0.46	0.84	0.82	0.53
rs17366568	0.95	0.62	0.46	0.06	0.91
rs3774261	0.67	0.68	0.93	0.96	0.37

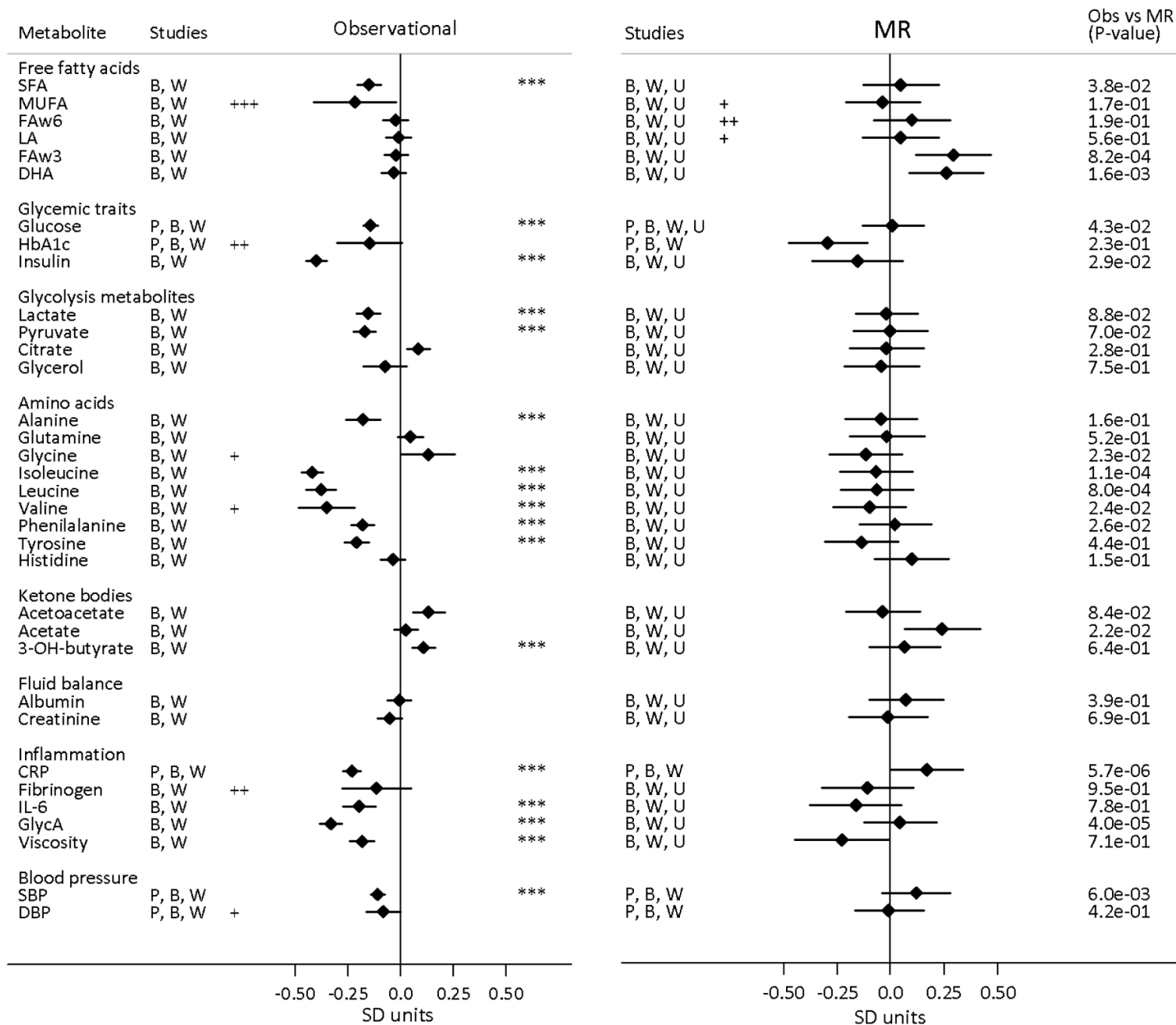
BWHHS: British Women's Heart and Health Study; CaPS: The Caerphilly Prospective Study; PEL82: 1982 Pelotas Birth Cohort; UKCTOCS: case-control study nested in The United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening; WHII: Whitehall-II Study.





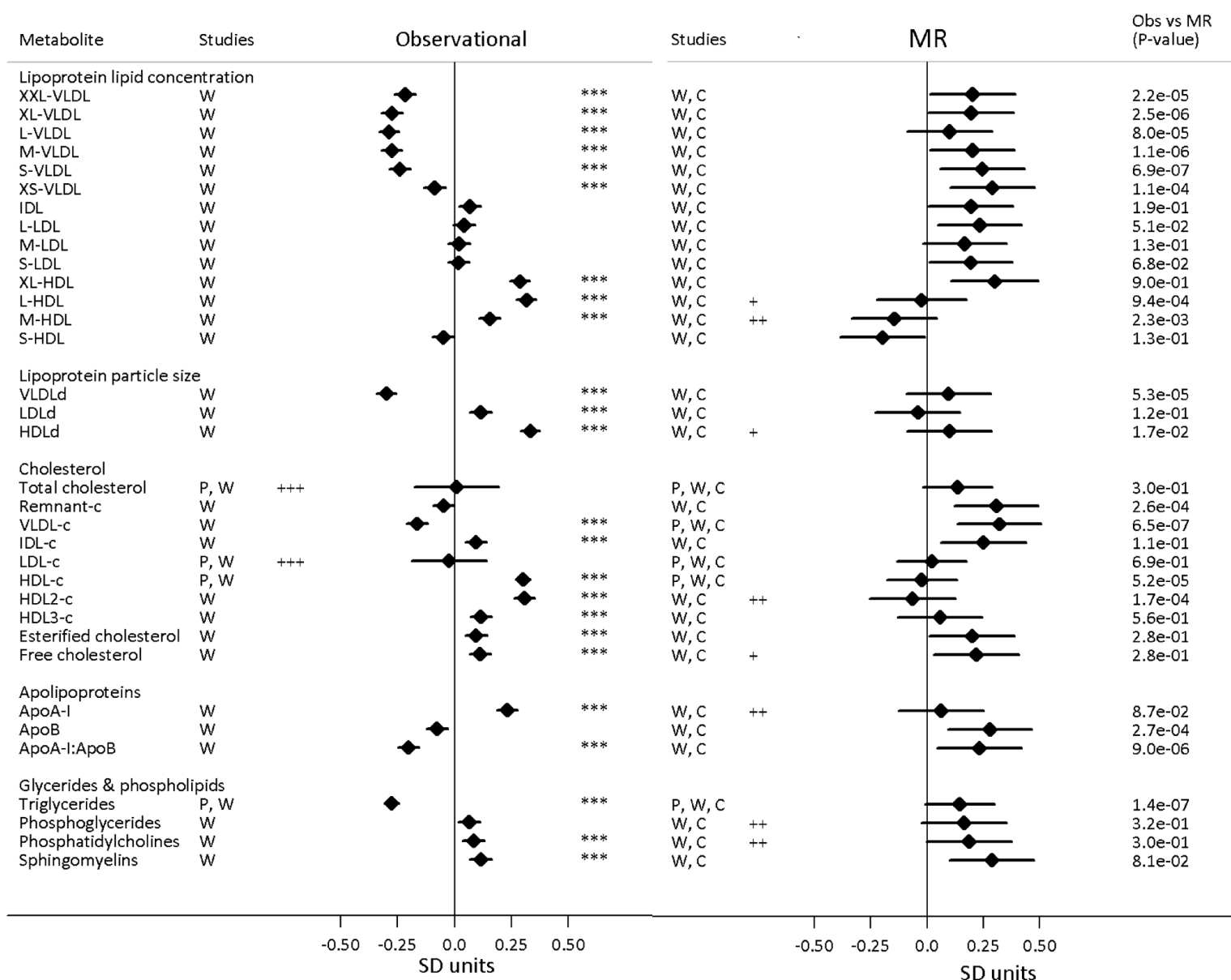
**Supplementary figure 1.** Association of lipoprotein traits with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization (MR) analysis among women.

Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. XXL: extremely large, XL: very large, L: large, M: medium, S: small, XS: very small, VLDL: very low-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, IDL: intermediate-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, B: British Women Heart and Health Study, W: Whitehall II Study, U: UKCTOCS nested case-control study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.



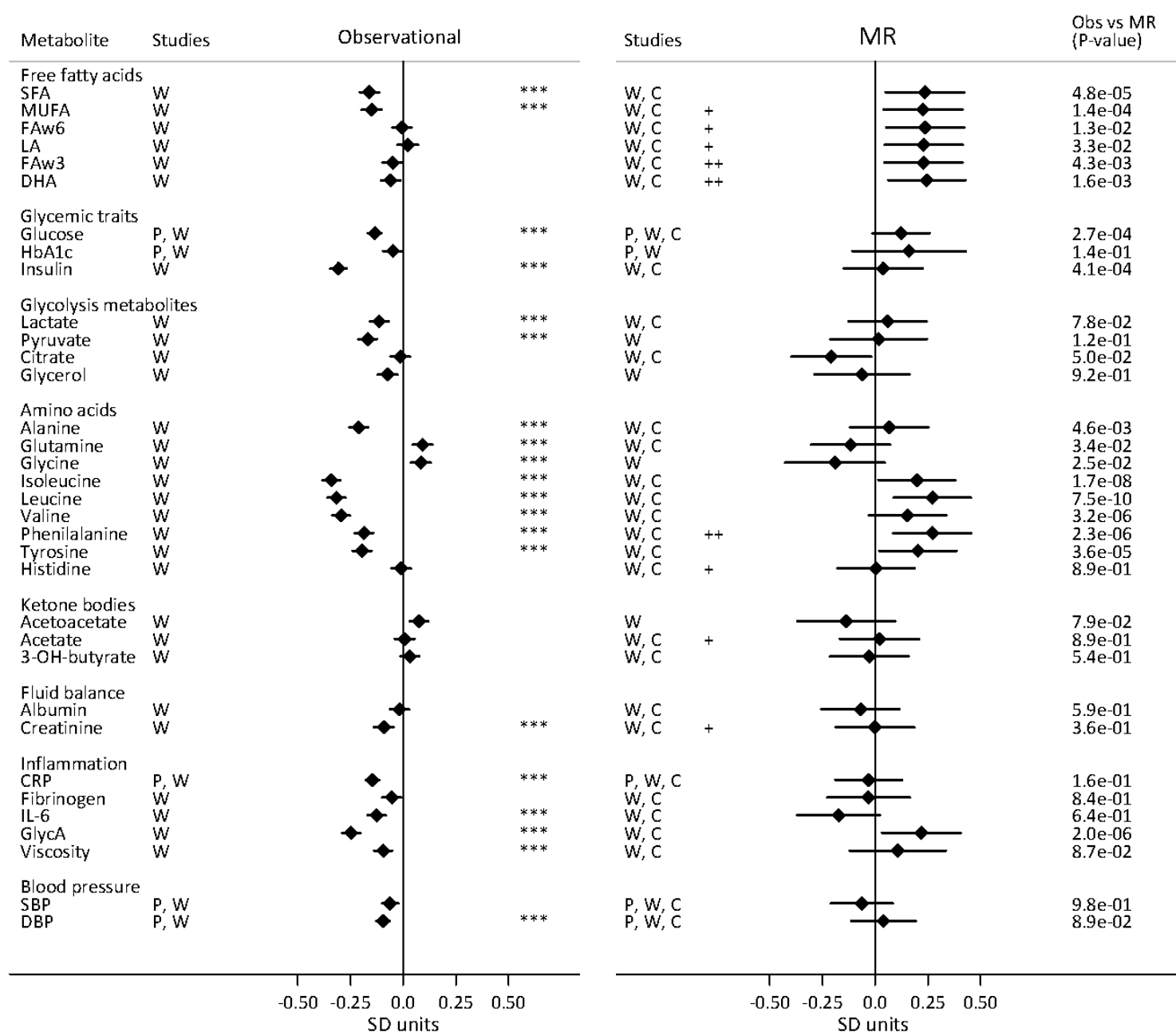
**Supplementary figure 2.** Association of multiple metabolic measures with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization analysis among women.

Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, FAw:6: omega-6 fatty acid, LA: linoleic acid, DHA: docosaenoic acid, FAw3: omega-3 fatty acid, HbA1c: glycated haemoglobin, CRP: c-reactive protein, IL-6: interleukin-6, GlycA: glycoprotein acetyls, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, B: British Women Heart and Health Study, W: Whitehall II Study, U: UKCTOCS nested case-control study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.



**Supplementary figure 3.** Association of lipoprotein traits with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization (MR) analysis among men.

Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. XXL: extremely large, XL: very large, L: large, M: medium, S: small, XS: very small, VLDL: very low-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, IDL: intermediate-density lipoprotein, HDL: high-density lipoprotein, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, W: Whitehall II Study, C: The Caerphilly Prospective Study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.



**Supplementary figure 4.** Association of multiple metabolic measures with blood adiponectin levels from observational and Mendelian randomization analysis among men. Values are expressed as units of standardized log metabolite concentration (and 95% CI) per 1 unit increment of standardized log adiponectin levels. P-values for the association between adiponectin and metabolites are indicated by three asterisks (“\*\*\*\*”) if lower than Bonferroni-adjusted threshold (P-value < 0.0007). Heterogeneity was considered if P for heterogeneity < 0.05 (“+”), < 0.01 (“++”), < 0.001 (“+++”). P-values for the comparison between observational and Mendelian randomization estimates are displayed in the column “MR vs Obs (P-value)”. SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, FAw:6: omega-6 fatty acid, LA: linoleic acid, DHA: docosaehaenoic acid, FAw3: omega-3 fatty acid, HbA1c: glycated haemoglobin, CRP: c-reactive protein, IL-6: interleukin-6, GlycA: glycoprotein acetyls, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, P: 1982 Pelotas Birth Cohort, W: Whitehall II Study, C: The Caerphilly Prospective Study, SD units: standard deviation units, CI: confidence interval.

***SEÇÃO VII - ARTIGO 3: The  
role of adiponectin in coronary  
heart disease: a Mendelian  
randomization study***

---

**The Role of Adiponectin in Coronary Heart Disease Risk:  
A Mendelian Randomization Study**

Maria Carolina Borges<sup>1</sup>, MSc, [carolina.borges.mcb@gmail.com](mailto:carolina.borges.mcb@gmail.com)

Debbie A Lawlor<sup>2,3</sup>, MD, PhD, [D.A.Lawlor@bristol.ac.uk](mailto:D.A.Lawlor@bristol.ac.uk)

Cesar de Oliveira<sup>4</sup>, PhD, [c.oliveira@ucl.ac.uk](mailto:c.oliveira@ucl.ac.uk)

Jon White<sup>5</sup>, PhD, [jon.white@ucl.ac.uk](mailto:jon.white@ucl.ac.uk)

Bernardo Lessa Horta<sup>1</sup>, MD, PhD, [blhorta@gmail.com](mailto:blhorta@gmail.com)

Aluísio J D Barros<sup>1</sup>, MD, PhD, [abarros.epi@gmail.com](mailto:abarros.epi@gmail.com)

Short title: Adiponectin and coronary heart disease risk

Names for Pubmed indexing: Borges MC, Lawlor DA, De Oliveira C, White J, Horta BL, Barros AJD

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

<sup>2</sup> MRC Integrative Epidemiology Unit at the University of Bristol, Bristol, UK

<sup>3</sup> School of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, UK

<sup>4</sup> Epidemiology & Public Health, Institute of Epidemiology and Health Care, University College London, London, UK

<sup>5</sup> UCL Genetics Institute, Division of Biosciences, Faculty of Life Sciences, University College London, London, UK

Corresponding author: Borges MC. Rua Marechal Deodoro, 1160 - 3° Piso, Centro, Pelotas, RS, Brazil. Zipcode: 96020-220. Phone: +55 (53) 3284 - 1300. Email: [carolina.borges.mcb@gmail.com](mailto:carolina.borges.mcb@gmail.com)

Subject Codes:

- Biomarkers
- Cardiovascular Disease
- Epidemiology
- Genetics
- Coronary Artery Disease

## ABSTRACT

### Rationale

Hypoadiponectinemia correlates with several coronary heart disease (CHD) risk factors. However, it is unknown whether adiponectin is causally implicated in CHD etiology.

### Objective

We aimed to investigate the causal effect of adiponectin on CHD risk.

### Methods and Results

We undertook a Mendelian randomization study using data from genome-wide association studies (GWAS) consortia. We used the ADIPOGen consortium to identify genetic variants that could be used as instrumental variables for the effect of adiponectin. Data on the association of these genetic variants with CHD risk were obtained from CARDIoGRAM (22,233 CHD cases and 64,762 controls of European ancestry) and from CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip (63,746 cases and 130,681 controls; ~ 91% of European ancestry) consortia. Data on the association of genetic variants with adiponectin levels and with CHD were combined to estimate the influence of blood adiponectin on CHD risk.

In the conservative approach (restricted to using variants within the adiponectin gene as instrumental variables), each 1 unit increase in log blood adiponectin concentration was associated with an odds ratio for CHD of 0.83 (95%CI: 0.68; 1.01) in CARDIoGRAM and 0.97 (95%CI: 0.84, 1.12) in CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip. Findings from the liberal approach (including variants in any locus across the genome) indicated a protective effect of adiponectin that was attenuated to the null following adjustment for known CHD predictors

### Conclusions

Overall, our findings do not support a causal role of adiponectin levels in CHD etiology.

**Keywords:** Adiponectin; Coronary artery disease; Cardiovascular disease; Mendelian randomization analysis; Genetic Epidemiology.



#### Non-standard Abbreviations and Acronyms:

C4: conservative instrumental variable analysis approach;  
CARDIoGRAM: Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication And Meta-analysis; CARDIoGRAMplusC4D Metabochip: CARDIoGRAMplusC4D Metabochip and GWAS meta-analysis; CEU: Utah residents with Northern and Western European ancestry; GIANT: Genetic Investigation of ANthropometric Traits; GLGC: Global *Lipids* Genetics Consortium; GWAS: genome-wide association studies; IVW method: inverse-variance weighted method; L17: liberal instrumental variable analysis approach; LD: linkage disequilibrium; MAGIC: Meta-Analyses of Glucose and Insulin-Related Traits Consortium; SNPs: single nucleotide polymorphisms.

## INTRODUCTION

Adiponectin, a 30 kDa protein produced mainly by mature adipocytes, has been implicated in a wide spectrum of biological pathways related to peripheral insulin sensitivity<sup>1</sup>, inflammatory response<sup>1,2</sup> and atherogenesis<sup>2</sup>. In contrast to most adipokines, adiponectin secretion is downregulated in obese individuals<sup>3</sup>. Observational epidemiological studies support that hypoadiponectinemia is associated with cardiovascular risk factors<sup>4,5</sup> (e.g. insulin resistance and dyslipidaemia), and type 2 diabetes risk<sup>6</sup>; inconsistent findings have been observed regarding coronary heart disease (CHD)<sup>7-10</sup> and stroke risk<sup>9,11</sup>.

Mendelian randomization studies make use of genetic variants as instrumental variables to investigate the effect of environmental exposures and biomarkers on outcomes. Since alleles are randomly allocated during gametogenesis and genotype is a fixed exposure, Mendelian randomization studies are not as vulnerable to confounding and reverse causality, and can substantially improve causal inference from observational data<sup>12</sup>. Mendelian randomization is regarded as nature's analogue of randomized controlled trials and has successfully been used in cardiovascular research to investigate potential etiological mechanisms<sup>13</sup>, validate and prioritize novel drug targets<sup>14</sup> and increase understanding of current therapies<sup>15</sup>.

There is evidence of a shared allelic architecture of circulating adiponectin with CHD risk and carotid intima-media thickness<sup>16,17</sup>; however, it remains unanswered if these findings implicate a causal effect of adiponectin on CHD risk or merely shared pleiotropic factors. Our aim was to investigate the causal effect of adiponectin on CHD risk using Mendelian randomization.

## METHODS

### Study design

We performed a two-sample Mendelian randomization analysis using summary data from genome-wide association studies (GWAS) consortia. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), previously reported to be associated with blood adiponectin levels, were used as instrumental variables for testing the causal effect of adiponectin on CHD risk. Data on the association of SNPs with (a) adiponectin levels (first samples) and (b) CHD risk (second samples) were combined to estimate the influence of blood adiponectin on CHD risk. In order to investigate the presence of potential bias (horizontal pleiotropy) or mediation of the effect of adiponectin on CHD via other CHD risk factors (vertical pleiotropy) (Online figure 1), we also analyzed data on the association of the selected adiponectin related SNPs with a range of CHD risk factors: glycated hemoglobin (Hb<sub>A1c</sub>), fasting insulin, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c), triacylglycerols (TAG), body mass index (BMI), and BMI-adjusted waist circumference (WC).

### Data sources

Summary data on the association between SNPs and the phenotypes of interest were extracted from public databases of different consortia: ADIPOGen for adiponectin <sup>18</sup>; CARDIoGRAM (Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication And Meta-analysis) <sup>19</sup> and CARDIoGRAMplusC4D Metabochip (CARDIoGRAMplusC4D Metabochip and GWAS meta-analysis) <sup>20</sup> for CHD; MAGIC (Meta-Analyses of Glucose and Insulin-Related Traits Consortium) for Hb<sub>A1c</sub> <sup>21</sup> and fasting insulin <sup>22</sup>; GLGC (Global *Lipids* Genetics Consortium) for HDL-c, LDL-c and TAG <sup>23</sup>; and GIANT (Genetic Investigation of ANthropometric Traits) for BMI <sup>24</sup> and WC <sup>25</sup>. Details about each data source are displayed in Online table 1. CARDIoGRAMplusC4D Metabochip includes data from CARDIoGRAM GWAS.

## Instrumental variables

The SNPs for our main instrumental variables analyses ( $n = 17$  SNPs) were selected from 145 SNPs strongly ( $p < 5 \cdot 10^{-8}$ ) associated with blood adiponectin levels in the European ancestry GWAS meta-analysis from the ADIPOGen consortium<sup>18</sup>. Independent SNPs were previously selected by Dastani et al (2013)<sup>16</sup> by linkage disequilibrium (LD) pruning of the genome-wide significant SNPs, retaining SNPs that explained most variance in adiponectin levels in each LD block (LD threshold:  $R^2 < 0.05$  in HapMap CEU population (Utah residents with Northern and Western European ancestry)) (Table 1).

We used two sets of instruments (Figure 1):

1. A conservative instrumental variable analysis, in which only SNPs within the *ADIPOQ* locus ( $\pm 50$  kb) were considered eligible ( $n = 4$  SNPs) (C4). *ADIPOQ* is mainly expressed in adipose tissue and encodes adiponectin. We considered this approach unlikely to be biased by horizontal pleiotropy given the functional relationship of *ADIPOQ* to adiponectin levels.
2. A liberal analysis, in which independent SNPs from any locus that had reached a genome-wide significant association ( $p < 5 \cdot 10^{-8}$ ) with adiponectin levels in the ADIPOGen consortia GWAS ( $n = 17$  SNPs) were included (L17), as previously reported by Dastani et al.<sup>16</sup>. These 17 SNPs included the four SNPs within the *ADIPOQ* locus.

Ten of the 17 selected SNPs could be found in CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip data, three of which were proxy SNPs ( $R^2 > 0.95$  for CEU population). For the remaining seven SNPs, data from CARDIoGRAM GWAS was used. One of the 17 selected SNPs could not be found in GLGC data rs1108842, a proxy SNP (rs13083798), in perfect LD, was used instead ( $R^2 = 1.0$  for CEU population).

## Validation of instrumental variable assumptions

Validity of Mendelian randomization analyses results can be compromised if the instrumental variable assumptions are violated. In Online table II, we described the three core assumptions of instrumental variable analysis and the strategies used to address these.

## Estimation of causal effect

For both liberal and conservative approaches, the beta coefficient (log odds ratio of CHD per one natural log greater adiponectin level) and its standard error were calculated using the inverse-variance weighted (IVW) method as described by Burgess et al.<sup>26</sup> (See Web-supplemental methods).

For the liberal approach, we also used the IVW method to estimate the combined effect of adiponectin levels on cardiovascular risk factors (Hb<sub>A1c</sub>, fasting insulin levels, HDL-c, LDL-c, TAG, BMI, and WC). Where we found evidence of an effect of the SNPs on these risk factors, estimates of the association between adiponectin and CHD were adjusted for these risk factors to reduce the possibility that horizontal pleiotropy biased our findings<sup>27</sup> (See Web-supplemental methods).

## Sensitivity analyses

Assuming that all valid instrumental variables identify the same causal parameter, substantial heterogeneity would be suggestive of pleiotropic SNPs. We evaluated heterogeneity in our IVW estimates using standard tools from the meta-analysis literature: forest plot of per SNP ratio estimate, Cochran's Q test, and  $I^2$  values.<sup>28-30</sup> In addition, in order to identify overly influential SNPs, additional meta-analyses were carried out by removing one SNP at a time and recalculating the overall instrumental variable estimates.

Even after adjusting for cardiovascular risk factors associated with our instrument, the liberal approach estimates could still be biased by unknown horizontal pleiotropic pathways that link the adiponectin genetic instrumental variable to CHD independently of path through adiponectin. To explore the

presence of this possible bias, the MR-Egger regression method was used.<sup>31</sup>. See Web-supplemental methods for a description of this method.

We also undertook a positive control analysis that consisted of a Mendelian randomization analysis in which LDL-c was the biomarker of interest and CHD risk was the outcome (using the IVW and MR-Egger method), due to its established causal role in CHD development (see Web-supplemental methods).

## RESULTS

### Association of the genetic instrument with adiponectin and CHD risk

Figure 2 shows the associations of SNPs, used as instrumental variables in the conservative (n = 4 SNPs within *ADIPOQ* gene) and liberal analyses (n = 17 SNPs across the genome), with adiponectin levels and CHD risk. For the conservative approach, each adiponectin increasing allele was associated with 2.3% reduction in CHD risk (95% CI: -4.1; -0.4%) in CARDIoGRAM data and 0.6% reduction in CHD risk (95% CI: -1.9; 1.0%) in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip. For the liberal approach, each adiponectin increasing allele was associated with 2.3% reduction in CHD risk (95% CI: -3.2; -1.5%) in CARDIoGRAM data and 1.7% reduction in CHD risk (95% CI: -2.3; -1.1%) in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip. Of the 17 SNPs, there was some evidence of heterogeneity ( $p < 0.05$ ) between studies that contributed to each consortium for three SNPs: two SNPs in CARDIoGRAM (rs1108842 and rs6488898) and one SNP in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip (rs3774261).

### Association of the genetic instruments with CHD risk factors

Over 50% of individual SNPs were associated with one or more CHD risk factor (Hb<sub>A1c</sub>, fasting insulin levels, HDL-c, LDL-c, TAG, BMI, and WC), none of these SNPs were located within *ADIPOQ* gene ( $\pm 50$  kb) (Table 2). In general, adiponectin increasing variants were not associated with CHD risk factors in the conservative approach but were related to lower fasting insulin, higher HDL-c, lower TAG, lower WC, and higher BMI in the liberal approach (Figure 3).

### Effect of blood adiponectin concentration on CHD risk

Figure 4 shows the results of all Mendelian randomization analyses assessing the association of genetically-predicted adiponectin with CHD risk. Using the conservative approach (including only the four SNPs within *ADIPOQ* gene), each unit increase in log adiponectin concentration was associated with an odds ratio for CHD of 0.83 (95% CI: 0.68; 1.01) in CARDIoGRAM and 0.97 (95% CI: 0.84; 1.12) in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip dataset. Using the liberal approach (including 17 SNPs), the OR for the effect of each unit increase in log adiponectin concentration on CHD was 0.76 (95%CI: 0.65; 0.89) in CARDIoGRAM and 0.83 (95% CI: 0.74; 0.93) in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip. When we adjusted these liberal approach results for the CHD risk factors associated with the genetic instrument (fasting insulin, HDL-c, TAG, WC, and BMI) the OR was 0.88 (95%CI: 0.75; 1.03) in CARDIoGRAM and 1.00 (95% CI: 0.90; 1.12) in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip.

### Sensitivity analyses

There was substantial heterogeneity in IVW estimates among the 17 SNPs from the liberal approach in both CARDIoGRAM ( $I^2 = 65.2$ ;  $P = 1 \times 10^{-4}$ ) and CARDIoGRAMplusC4D Metabochip ( $I^2 = 72.4$ ;  $P = 2 \times 10^{-6}$ ) data (Online figure II). The effect of removing one SNP at a time on the overall estimate showed that no single SNP could explain the observed protective effect in the liberal analysis. Though, the inclusion of the SNPs rs17366568 and rs8047711 slightly underestimated findings from the IVW method in CARDIoGRAM dataset (Online figure III).

By using the MR-Egger method with our liberal instrument, we observed further evidence of directional pleiotropy, i.e. the instrument was associated with a decreased log odds of CHD independently of its effect on adiponectin in CARDIoGRAM (log OR: -0.03; 95%CI: -0.05; -0.02 for the intercept) and in CARDIoGRAMplusC4D Metabochip (log OR: -0.03; 95%CI: -0.05; -0.02 for the intercept) (Online figure IV). According to Mendelian randomization estimates using the MR-Egger method, each unit increase in log adiponectin concentration was associated with an odds ratio for CHD of 1.25 (95% CI: 0.96; 1.63) in CARDIoGRAM and 1.30 (95% CI: 1.06; 1.58) in



CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip dataset (Figure 4). In the influence meta-analysis, in which we removed one of the 17 SNPs at a time from the pooled estimates, all of the results for the remaining 16 SNPs were in the same (positive) direction but the magnitude of this varied somewhat (Online figure III).

To investigate any differences between CARDIoGRAM and CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip, we compared Mendelian randomization results of the effect of LDL-c on CHD risk (positive control analysis). The OR for CHD for each standardized unit increase in LDL-c was 1.70 (95% CI: 1.54; 1.88) in CARDIoGRAM and 1.57 (95% CI: 1.47; 1.67) in CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip. After accounting for unknown confounding (MR-Egger method), estimates were: 1.96 (95% CI: 1.59; 2.33) for CARDIoGRAM and 1.92 (95% CI: 1.65; 2.17) for CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip.

## DISCUSSION

Taken together, our results are not supportive of a protective causal effect of adiponectin on CHD risk. First, we found no consistent evidence that genetic predisposition to elevated blood adiponectin levels is associated to reduced risk of CHD in the analysis restricted to *ADIPOQ* SNPs (conservative approach). Secondly, in the more liberal analysis, using variants associated with adiponectin across the genome, there was evidence of a protective effect, but this was due to horizontal pleiotropy. This conclusion regarding horizontal pleiotropy resulting in a biased apparent protective effect with our liberal approach is supported by both multivariable Mendelian randomization and MR-Egger. Some of the variants strongly associated with circulating adiponectin, in our liberal analysis, are related to loci of potential importance for LDL-c signalling in endothelial cells (*CDH13*) and for vascular biology (e.g. *TRIB1* and *VEGFA*), which might explain their pleiotropic effects regarding CHD aetiology<sup>18</sup>. Lastly, our results are strengthened by the consistent strong positive associations of LDL-c with CHD when we use the same methods used for adiponectin to test this known causal effect.

Few previous studies have conducted Mendelian randomization analysis to investigate the effect of adiponectin on metabolic diseases. Two smaller studies found evidence that genetically raised adiponectin levels were positively associated with insulin sensitivity<sup>32, 33</sup>. However, a larger study did not provide evidence of a causal role of adiponectin in insulin resistance or type 2 diabetes<sup>34</sup>, but found that genetically raised insulin levels are associated with lower adiponectin levels, suggesting that the association was possibly because higher insulin levels caused lower adiponectin, rather than the other way round.

We have undertaken the first large Mendelian randomization study of the causal effect of adiponectin on cardiovascular disease risk using GWAS consortia data from CARDIoGRAM (22,233 CHD cases and 64,762 controls) and CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip (60,801 cases and 123,504 controls) with detailed phenotyping of coronary artery disease, myocardial infarction, or both. We applied a rigorous analyses plan to assess the validity and consistency of our findings. This included **(I)** adopting a systematic prespecified approach to selecting SNPs for our instrumental variables; **(II)** exploring

different scenarios from the plausibly valid (but less well powered) conservative MR approach (restricted to SNPs within adiponectin locus) to the well-powered (but vulnerable to horizontal pleiotropy) liberal MR approach (using SNPs across the genome); **(III)** extensively investigating the presence of bias due to horizontal pleiotropy by using data from other CHD-related phenotypes (e.g. glycaemic, lipid and anthropometric traits) and methods to account for it (adjusted IVW method and MR-Egger method); **(IV)** testing our hypotheses in two datasets (CARDIoGRAM and CARDIoGRAMplusC4D Metabochip); **(V)** using a very large sample size which provides us with 100% power to detect an odds ratio of 0.80 and 81% to detect and odds ratio of 0.90 with a 0.05% type 1 error rate (Online table III) **(VI)** checking the consistency of our findings by performing influence metanalysis and a positive control analysis and **(VII)** using two-sample Mendelian randomization to avoid statistical overfitting in comparison to Mendelian randomization where all analyses are conducted in the same participants<sup>35</sup> (in a one-sample setting, results could be biased in the presence of weak instruments due to genetic variants correlating with confounders by chance).

Some limitations of this study should be considered. First, we were not able to test for effect modification by sex, age or previous disease due to the use of summary data only. In observational studies, the association between adiponectin levels and CHD outcomes is modified by factors such as the type of event (incident vs. prevalent)<sup>10</sup> and age of the participant<sup>36</sup>. Surprisingly, we did find a positive association between circulating adiponectin and CHD risk in the MR-Egger analysis with CARDIoGRAMplusC4D Metabochip dataset, which is likely to be reflecting a false positive finding since it was generally inconsistent with results from the conservative approach. We aimed to estimate the causal effect of total adiponectin concentrations, but high molecular weight adiponectin is thought to be the biologically active fraction and we are not able to specifically assess its effect. Whilst we have explored possible violation of the assumptions of Mendelian randomization (Online table II) we cannot rule out bias due to possible compensatory mechanisms, known as canalization (e.g. counter-regulation of adiponectin receptors expression due to variations in blood adiponectin concentration). That said we are not aware of any evidence that this might be the case.

The two-sample Mendelian randomization assumes that both samples come from comparable populations. For our discovery analyses this was the case, whereas in CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip, though the majority of the participants were of European ancestry (the same as in ADIPOGen), 9% were from other ethnic backgrounds. However, we think it is unlikely that this will have resulted in a major source of bias. First, double genomic control for ethnicity was undertaken in CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip to control for confounding by population stratification. Second, we found very little evidence of heterogeneity in the association of SNPs with CHD in the two consortia, which suggests (strong) effect modification by genomic ancestry is unlikely. Lastly, in a positive control study we showed that two-sample Mendelian randomization produced similar evidence for the expected positive causal effect of LDL-c on CHD.

Adiponectin concentration in the blood ranges from one to 30 ng/mL in healthy adults, which is approximately  $10^3$  to  $10^6$  folds higher than the concentration of many hormones and cytokines<sup>37</sup>. Blood adiponectin concentration is a modifiable risk factor that can be efficiently targeted by lifestyle modifications, mainly weight loss and dietary changes<sup>38</sup>. Our results reinforce that Mendelian randomization studies can be helpful in prioritizing potential drug or lifestyle targets, which could substantially reduce the high costs associated with the development and evaluation of large numbers of compounds or lifestyle changes that fail along the development process.

Overall, our findings are not supportive of a protective role of adiponectin in CHD and indicate that the association of genetically increased adiponectin levels and lower risk of CHD is mainly driven by horizontal pleiotropy.

## Acknowledgements

The authors thank Frank Dudbridge (London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK) and Alexandre Pereira (Heart Institute, University of Sao Paulo, Brazil) for the helpful comments on the study design and analysis.

Data on adiponectin have been contributed by ADIPOGen Consortium and have been downloaded from <https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium>. Data on coronary artery disease/myocardial infarction have been contributed by CARDIOGRAMplusC4D investigators and have been downloaded from [www.CARDIOGRAMPLUSC4D.ORG](http://www.CARDIOGRAMPLUSC4D.ORG). Data on glycaemic traits have been contributed by MAGIC investigators and have been downloaded from [www.magicinvestigators.org](http://www.magicinvestigators.org). Data on lipid traits have been contributed by Global Lipids Genetics Consortium and have been downloaded from <http://csg.sph.umich.edu/abecasis/public/lipids2013/>. Data on anthropometric traits have been contributed by Genetic Investigation of ANthropometric Traits (*GIANT*) consortium and have been downloaded from [http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT\\_consortium\\_data\\_files](http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files). All the data used is publicly available (Online table I).

Those people acknowledged here and who have made their genome-wide data available to scientist may not necessarily agree with comments made in this paper and the authors take full responsibility for the contents of this paper.

## Sources of funding

MCB receives financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) (fellowship number 144749/2014-9, 201498/2014-6 (Science Without Borders Program)) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) (fellowship number 201498/2014-6). DAL works in a Unit that receives funding from the UK Medical Research Council (MC\_UU\_12013/5) and is a UK National Institute of Health Research Senior Investigator (NF-SI-0611-10196). CO works in the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA) that receives funding from the National Institute on Aging in the United States (grant number 5 R01 AG017644-16) and a consortium of UK government departments coordinated by the Office for National Statistics. JW is a UCL core-funded researcher.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The work is of the authors and the views expressed here may not be the views of any funding bodies.

#### Disclosures

None

#### Author contributions

Study design: MCB, DAL, CO, BLH, AJDB

Analysis plan: MCB, DAL, JW, AJDB

Data acquisition (from public data basis): MCB, CO

Analyses: MCB

Writing first draft of paper: MCB

Critical comments and contributions to final writing of paper: DAL, CO, JW, BLH, AJDB

## References

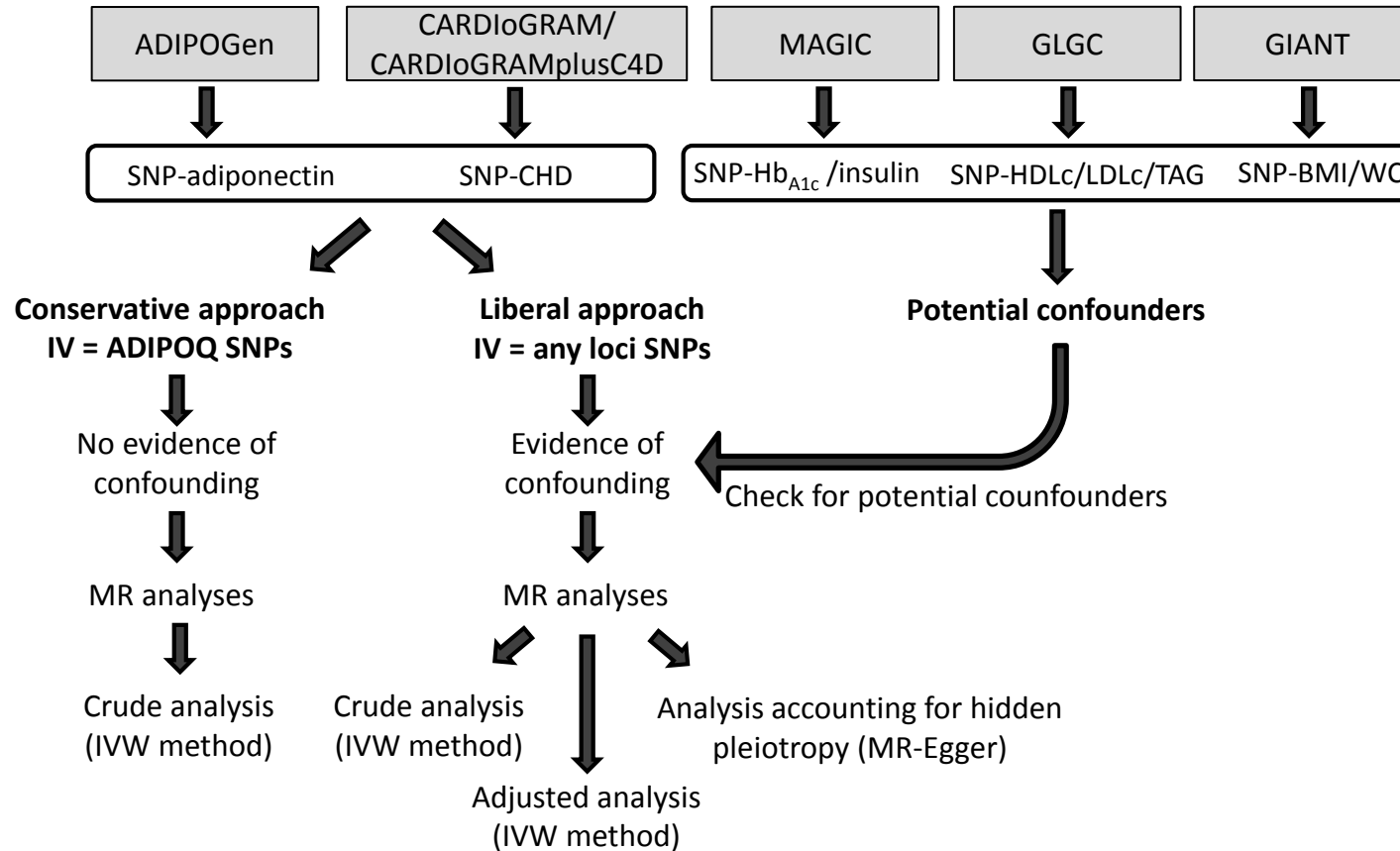
1. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of adipor1 and adipor2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 2007;13:332-339
2. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class a scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001;103:1057-1063
3. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: Mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia.* 2012;55:2319-2326
4. Wildman RP, Mancuso P, Wang C, Kim M, Scherer PE, Sowers MR. Adipocytokine and ghrelin levels in relation to cardiovascular disease risk factors in women at midlife: Longitudinal associations. *Int. J. Obes. (Lond.).* 2008;32:740-748
5. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Saruta T. Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: Two-year follow-up study in japanese population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:87-90
6. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009;302:179-188
7. Zhang H, Mo X, Hao Y, Huang J, Lu X, Cao J, Gu D. Adiponectin levels and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Med. Sci.* 2013;345:455-461
8. Zhang BC, Liu WJ, Che WL, Xu YW. Serum total adiponectin level and risk of cardiovascular disease in han chinese populations: A meta-analysis of 17 case-control studies. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 2012;77:370-378
9. Hao G, Li W, Guo R, Yang JG, Wang Y, Tian Y, Liu MY, Peng YG, Wang ZW. Serum total adiponectin level and the risk of cardiovascular disease in general population: A meta-analysis of 17 prospective studies. *Atherosclerosis.* 2013;228:29-35

10. Sook Lee E, Park SS, Kim E, Sook Yoon Y, Ahn HY, Park CY, Ho Yun Y, Woo Oh S. Association between adiponectin levels and coronary heart disease and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* 2013;42:1029-1039
11. Kanhai DA, Kranendonk ME, Uiterwaal CS, van der Graaf Y, Kappelle LJ, Visseren FL. Adiponectin and incident coronary heart disease and stroke. A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Obes. Rev.* 2013;14:555-567
12. Smith GD, Ebrahim S. 'mendelian randomization': Can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int. J. Epidemiol.* 2003;32:1-22
13. Collaboration CRPCHDG, Wensley F, Gao Pet al. Association between c reactive protein and coronary heart disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ.* 2011;342:d548
14. Collaboration IRGCERF, Sarwar N, Butterworth AS, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: A collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet.* 2012;379:1205-1213
15. Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, et al. Hmg-coenzyme a reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: Evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet.* 2015;385:351-361
16. Dastani Z, Johnson T, Kronenberg F, Nelson CP, Assimes TL, März W, Richards JB, Consortium C, Consortium A. The shared allelic architecture of adiponectin levels and coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2013;229:145-148
17. Persson J, Strawbridge RJ, McLeod O, et al. Sex-specific effects of adiponectin on carotid intima-media thickness and incident cardiovascular disease. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001853
18. Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: A multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS genetics.* 2012;8:e1002607
19. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* 2011;43:333-338



20. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45:25-33
21. Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, et al. Common variants at 10 genomic loci influence hemoglobin a(1)(c) levels via glyceimic and nonglyceimic pathways. *Diabetes.* 2010;59:3229-3239
22. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 2010;42:105-116
23. Global Lipids Genetics C, Willer CJ, Schmidt EM, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* 2013;45:1274-1283
24. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature.* 2015;518:197-206
25. Shungin D, Winkler TW, Croteau-Chonka DC, et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature.* 2015;518:187-196
26. Burgess S, Butterworth A, Thompson SG. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. *Genet. Epidemiol.* 2013;37:658-665
27. Burgess S, Dudbridge F, Thompson SG. Re: "Multivariable mendelian randomization: The use of pleiotropic genetic variants to estimate causal effects". *Am. J. Epidemiol.* 2015;181:290-291
28. Burgess S, Bowden J, Fall T, Ingelsson E, Thompson SG. Sensitivity analyses for robust causal inference from mendelian randomization analyses with multiple genetic variants. *Epidemiology (in press).* 2016
29. Greco M FD, Minelli C, Sheehan NA, Thompson JR. Detecting pleiotropy in mendelian randomisation studies with summary data and a continuous outcome. *Stat Med.* 2015;34:2926-2940
30. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997;315:629-634
31. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: Effect estimation and bias detection through egger regression. *Int. J. Epidemiol.* 2015;44:512-525

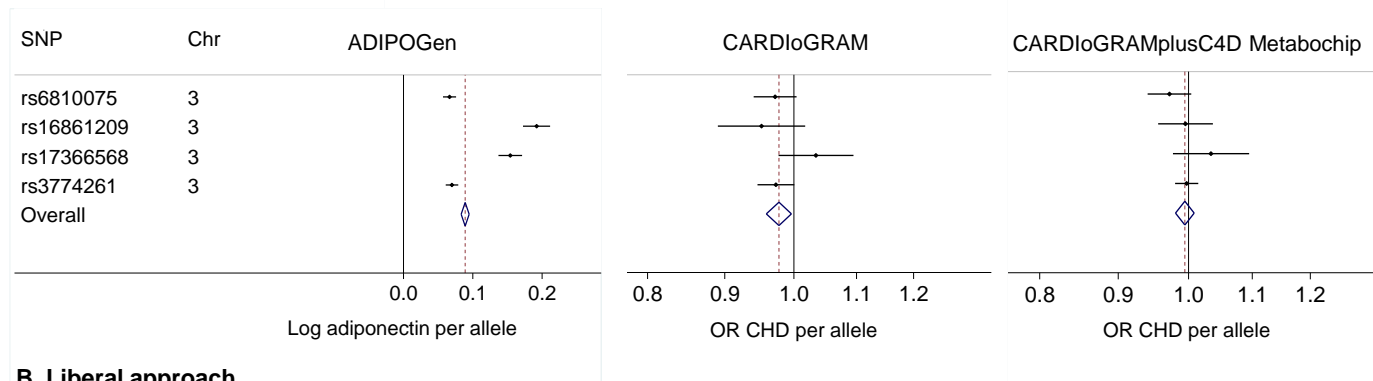
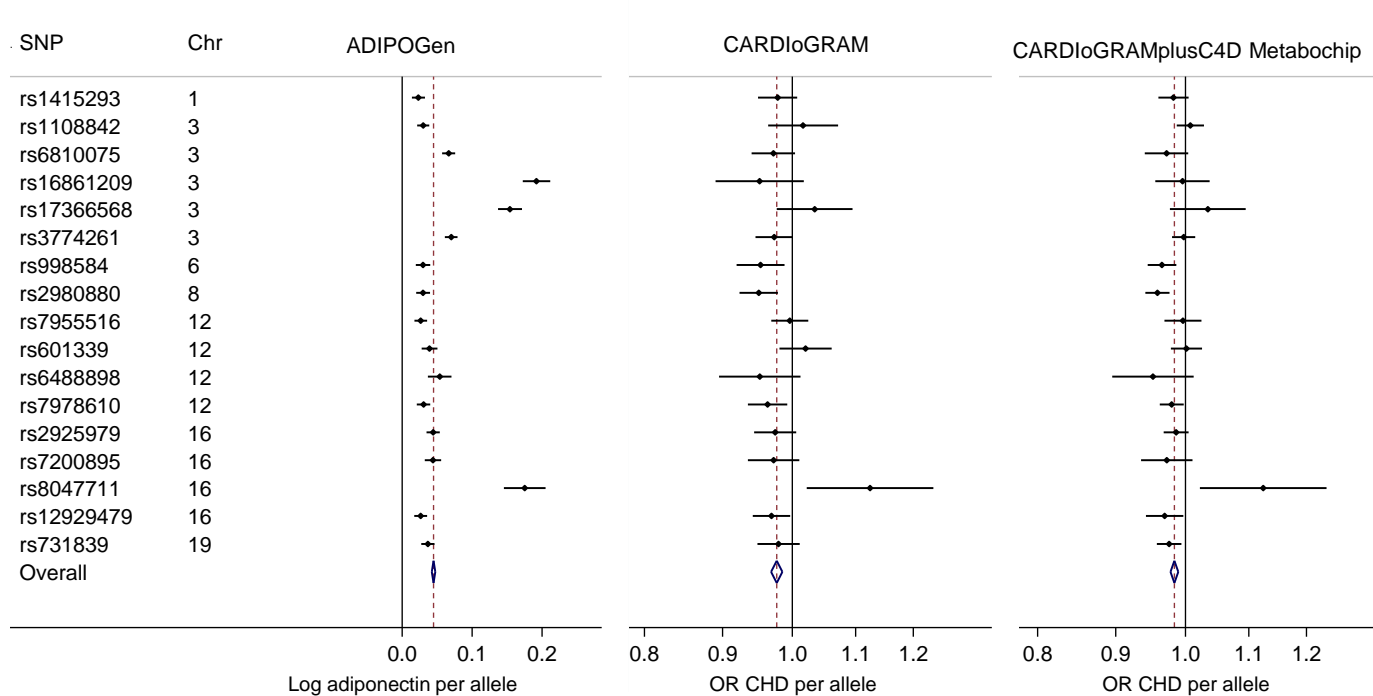
32. Gao H, Fall T, van Dam RM, Flyvbjerg A, Zethelius B, Ingelsson E, Hagg S. Evidence of a causal relationship between adiponectin levels and insulin sensitivity: A mendelian randomization study. *Diabetes*. 2013;62:1338-1344
33. Mente A, Meyre D, Lanktree MB, Heydarpour M, Davis AD, Miller R, Gerstein H, Hegele RA, Yusuf S, Anand SS, Investigators S, Investigators S-A. Causal relationship between adiponectin and metabolic traits: A mendelian randomization study in a multiethnic population. *PLoS One*. 2013;8:e66808
34. Yaghoobkar H, Lamina C, Scott RA, et al. Mendelian randomization studies do not support a causal role for reduced circulating adiponectin levels in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62:3589-3598
35. Burgess S, Scott RA, Timpson NJ, Davey Smith G, Thompson SG, Consortium E-I. Using published data in mendelian randomization: A blueprint for efficient identification of causal risk factors. *Eur. J. Epidemiol*. 2015;30:543-552
36. Wannamethee SG, Welsh P, Whincup PH, Sawar N, Thomas MC, Gudnarsson V, Sattar N. High adiponectin and increased risk of cardiovascular disease and mortality in asymptomatic older men: Does nt-probnp help to explain this association? *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil*. 2011;18:65-71
37. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999;257:79-83
38. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: A randomized trial. *JAMA*. 2003;289:1799-1804



**Figure 1. Analysis plan.**

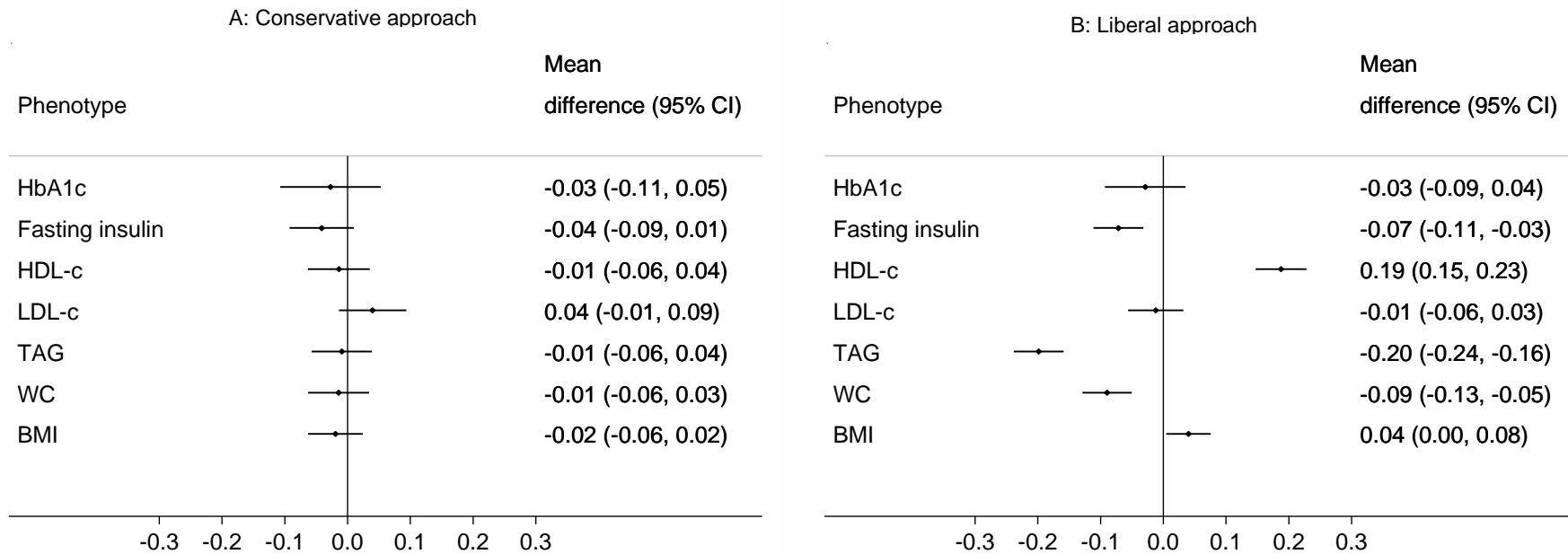
Summary data from SNP-phenotypes was extracted from GWAS consortia datasets (ADIPOGen, CARDIoGRAM, C4D, MAGIC, GLGC, and GIANT). The effect of adiponectin on CHD was estimated using a conservative Mendelian randomization approach (instrumental variable: SNPs within *ADIPOQ* locus ( $\pm 50$  kb)) and a liberal approach (instrumental variable: SNPs in any locus). For the conservative approach, IVW method was used. For the liberal approach, IVW method was used in both crude and adjusted analysis for known pleiotropic factors and MR-Egger regression in the analysis accounting for hidden pleiotropy (sensitivity analysis). Hb<sub>A1c</sub>: glycated hemoglobin; BMI: body mass index; CARDIoGRAM: Coronary Artery Disease Genomewide Replication and Meta-

analysis; CARDIoGRAMplusC4D Metabochip: CARDIoGRAMplusC4D Metabochip meta-analysis; CHD: coronary heart disease; GIANT: Genetic Investigation of Anthropometric Traits; GLGC: Global Lipids Genetics Consortium; HDL: high density lipoprotein; IV: instrumental variable; IVW method: inverse-variance weighted method; LDL: low density lipoprotein; MAGIC: Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium; MR: Mendelian randomization; SNPs: single nucleotide polymorphisms; TAG: triacylglycerol; WC: waist circumference.

**A. Conservative approach****B. Liberal approach**

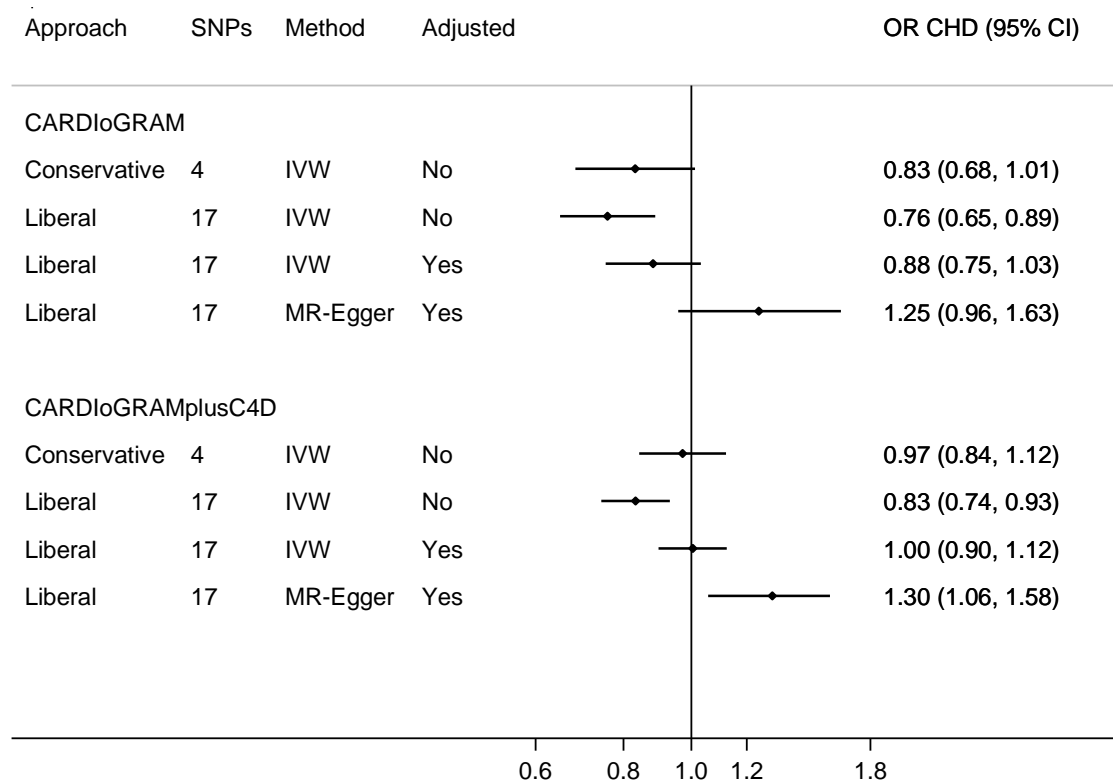
**Figure 2. Forest plots of mean difference in log adiponectin levels and odds ratio of coronary heart disease per allele of SNPs according to the conservative (A) and liberal (B) approaches. A: Conservative approach including 4 SNPs within *ADIPOQ* gene associated with adiponectin at genome-**

wide significant levels ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) (C4); B: liberal approach including 17 SNPs across the genome associated with adiponectin at genome-wide significant levels ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) (L17). CHD: coronary heart disease; Chr: chromosome; OR: odds ratio; SNP: single nucleotide polymorphism . Results for log adiponectin included 29,347 individuals from ADIPOGen consortium and for CHD risk included 86,995 individuals (22,233 CHD cases) from CARDIoGRAM and 194,427 individuals (63,746 CHD cases) from CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip consortium.



**Figure 3. Standardized mean difference (and 95%CI) in cardiovascular risk biomarkers per 1 unit increase in genetically instrumented log adiponectin levels.**

A: Conservative approach including 4 SNPs within *ADIPOQ* gene associated with adiponectin at genome-wide significant levels ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) (C4); B: liberal approach including 17 SNPs across the genome associated with adiponectin at genome-wide significant levels ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) (L17). BMI: body mass index; CI: confidence interval; Hb<sub>A1c</sub>: glycated hemoglobin; HDL-c: high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-c: low-density lipoprotein-cholesterol; SNP: single nucleotide polymorphism; TAG: triacylglycerols; WC: waist circumference.



**Figure 4. Mendelian randomization estimates of odds ratio (and 95%CI) of coronary heart disease risk per 1 unit increase in genetically instrumented log adiponectin levels.**

CHD: coronary heart disease; OR: odds ratio; IVW: inverse variance weighted method; MR-Egger: Mendelian randomization-Egger method; SNP: single nucleotide polymorphism.



**Table 1. Characteristics of SNPs selected for each analytical approach**

SNP	Chr	Position*	Closest gene	EA	NEA	EAF†	C4	L17
rs1415293	1	219730006	<i>ZC3H11B</i>	T	A	0.25		√
rs1108842	3	52720080	<i>GNL3</i>	C	A	0.49		√
rs6810075	3	186548565	<i>ADIPOQ</i>	T	C	0.61	√	√
rs16861209	3	186563114	<i>ADIPOQ</i>	A	C	0.08	√	√
rs17366568	3	186570453	<i>ADIPOQ-AS1, ADIPOQ</i>	G	A	0.93	√	√
rs3774261	3	186571559	<i>ADIPOQ-AS1, ADIPOQ</i>	A	G	0.50	√	√
rs998584	6	43757896	<i>VEGFA</i>	C	A	0.54		√
rs2980880	8	126480972	<i>TRIB1</i>	A	G	0.71		√
rs7955516	12	20498036	<i>PDE3A</i>	C	A	0.28		√
rs601339	12	123174743	<i>HCAR2</i>	G	A	0.25		√
rs6488898	12	124203832	<i>ATP6V0A2</i>	A	G	0.98		√
rs7978610	12	124468572	<i>ZNF664, FAM101A</i>	C	G	0.27		√
rs2925979	16	81534790	<i>CMIP</i>	C	T	0.71		√
rs7200895	16	82644606	<i>CDH13</i>	T	C	0.69		√
rs8047711	16	82667671	<i>CDH13</i>	G	A	0.92		√
rs12929479	16	82997853	<i>CDH13</i>	G	A	0.42		√
rs731839	19	33899065	<i>PEPD</i>	A	G	0.54		√

Chr: chromosome; EA: effect allele; NEA: non effect allele; EAF: effect allele frequency; C4: the four SNPs used in the conservative analyses; L17: 17 SNPs used in the liberal analyses (SNPs selected on the basis of reaching genome-wide significant levels in association with adiponectin -  $p < 5 \times 10^{-8}$ ). \*Genome Reference Consortium Human Build 37; †1000 Genomes.

**Table 2.** Standardized mean difference (and p-values) of cardiovascular risk factors per allele of SNPs used in Mendelian randomization analyses

	Hb <sub>A1c</sub>		Insulin		HDL-c		LDL-c		TAG		WC		BMI	
	β	p	β	p	β	p	β	p	B	p	β	p	β	p
rs1415293	0.004	0.513	-0.016	<b>1*10<sup>-4</sup></b>	0.015	0.009	-0.012	0.063	-0.014	0.019	-0.006	0.200	0.004	0.283
rs1108842	-0.003	0.586	-0.009	0.027	0.008	0.077	0.010	0.024	-0.009	0.037	-0.020	<b>2*10<sup>-8</sup></b>	0.011	0.001
rs6810075*	-0.011	0.123	-0.005	0.214	-0.003	0.813	0.005	0.562	-0.004	0.350	0.003	0.530	-0.001	0.884
rs16861209*	-0.002	0.888	-0.009	0.321	0.000	0.813	0.009	0.245	-0.001	0.610	-0.004	0.570	0.000	0.995
rs17366568*	0.000	0.984	-0.005	0.478	0.009	0.292	0.012	0.343	-0.004	0.587	-0.007	0.400	0.000	1.000
rs3774261*	0.001	0.932	-0.001	0.781	-0.006	0.108	-0.001	0.863	0.001	0.707	0.000	0.910	-0.005	0.100
rs998584	-0.014	0.045	-0.002	0.657	0.026	<b>2*10<sup>-11</sup></b>	-0.001	0.936	-0.029	<b>3*10<sup>-15</sup></b>	-0.029	<b>6*10<sup>-15</sup></b>	0.017	<b>9*10<sup>-7</sup></b>
rs2980880	0.014	0.030	0.000	0.967	0.043	<b>1*10<sup>-26</sup></b>	-0.040	<b>6*10<sup>-22</sup></b>	-0.067	<b>2*10<sup>-82</sup></b>	0.001	0.790	0.007	0.026
rs7955516	-0.013	0.051	0.001	0.910	0.019	0.001	-0.003	0.650	-0.007	0.096	0.006	0.210	0.007	0.069
rs601339	0.005	0.528	-0.011	0.036	0.030	<b>3*10<sup>-6</sup></b>	0.007	0.284	-0.016	0.013	-0.017	0.003	0.004	0.414
rs6488898	0.027	0.050	-0.004	0.642	0.026	0.007	0.016	0.198	-0.023	0.048	-0.007	0.430	0.021	0.005
rs7978610	0.000	0.959	-0.003	0.432	0.032	<b>2*10<sup>-9</sup></b>	-0.020	0.001	-0.029	<b>2*10<sup>-8</sup></b>	-0.021	<b>3*10<sup>-6</sup></b>	0.013	0.002
rs2925979	-0.001	0.853	-0.005	0.236	0.035	<b>1*10<sup>-19</sup></b>	0.003	0.630	-0.021	<b>2*10<sup>-7</sup></b>	-0.011	0.003	0.001	0.721
rs7200895	0.000	0.966	0.005	0.347	0.006	0.278	-0.002	0.985	0.005	0.720	-0.001	0.850	-0.002	0.697
rs8047711	-0.020	0.329	-0.005	0.649	0.010	0.887	-0.011	0.482	-0.001	0.678	-0.006	0.700	0.000	0.982
rs12929479	0.002	0.764	-0.006	0.141	-0.008	0.530	-0.010	0.088	-0.004	0.380	-0.011	0.013	-0.016	<b>1*10<sup>-4</sup></b>
rs731839	-0.007	0.288	-0.011	0.009	0.022	<b>3*10<sup>-9</sup></b>	0.002	0.517	-0.022	<b>3*10<sup>-9</sup></b>	0.007	0.059	0.007	0.038

SNPs within *ADIPOQ* gene ( $\pm$  50kb) are identified by an asterisk (\*). After Bonferroni correction, only p-values lower than  $4.2*10^{-4}$  ( $0.05 \div 17$  SNPs  $\div$  7 phenotypes) were considered statistically significant (values in bold).

## Novelty and significance

### *What is known?*

- Adiponectin is a protein produced mainly by mature adipose cells
- Higher circulating adiponectin is associated with lower cardiometabolic risk
- There is evidence that some genetic variants are associated with both circulating adiponectin and coronary heart disease risk

### *What new information does this article contribute?*

- Our findings do not support that higher circulating adiponectin lowers the risk of coronary heart disease (CHD)
- Genetic variants that are associated with both circulating adiponectin and CHD have pleiotropic effects and do not reflect a direct role of circulating adiponectin in CHD development

### *Summary paragraph*

Higher circulating adiponectin is associated with better cardiometabolic profile; however, it is unknown whether this association reflects causation or merely correlation due to confounding factors. We used genetic variants associated with circulating adiponectin to test whether adiponectin is likely to be causally involved in CHD development, a technique known as Mendelian randomization. Overall, our findings were not supportive of a causal effect of adiponectin on CHD risk, indicating that primary perturbation of circulating adiponectin is unlikely to be a major cause of CHD. Interventions targeting total circulating adiponectin should not be prioritized as a therapeutic strategy for primary CHD prevention.

**SUPPLEMENTAL MATERIAL**

## Supplemental Methods

### *Inverse variance weighted (IVW) method*

For unadjusted and adjusted Mendelian randomization analyses, the inverse variance weighted (IVW) method was used to derive the beta coefficient (log odds ratio of CHD per 1 natural log greater adiponectin level) and its standard error by using the following formulas:

$$\hat{\beta}_{IVW} = \frac{\sum_{k=1}^K X_k Y_k \sigma_{yk}^{-2}}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}} \quad SE_{\hat{\beta}_{IVW}} = \sqrt{\frac{1}{\sum_{k=1}^K X_k^2 \sigma_{yk}^{-2}}}$$

Where  $X_k$  is the mean change in log adiponectin level per additional effect allele of SNP  $k$  and  $Y_k$  is the mean change in log odds of CHD per additional effect allele of SNP  $k$  with standard error  $\sigma_{Y_k}$ .

The IVW method was also used to estimate the effect of adiponectin on cardiovascular risk factors (HbA1c, fasting insulin levels, HDL-c, LDL-c, TAG, BMI, and WC) ( $X_k$ : mean change in log adiponectin level per additional effect allele of SNP  $k$ ,  $Y_k$ : mean change in the risk factor per additional effect allele of SNP  $k$ ;  $\sigma_{Y_k}$ : standard error of  $Y_k$ ).

To estimate the association of genetically raised adiponectin and CHD in the model adjusted for cardiovascular risk factors, we used betas for SNP-CHD association as the dependent variable, betas for SNP-adiponectin and SNP-cardiovascular risk factors as independent variables and inverse variance weights (with no intercept). This method is equivalent to IVW method when there is only one independent variable<sup>1</sup>.

### *MR-Egger regression method*

The Egger regression has been used for almost two decades to detect small study bias (which may be due to publication bias) in meta-analyses of randomized clinical trials<sup>2</sup>. In this method, the ratio of the effect estimate by its standard error is regressed against the estimate's precision (the inverse of the standard error). Bowden et al.<sup>3</sup> recently proposed an adaptation of the Egger

regression to test for bias from horizontal pleiotropy in Mendelian randomization studies.

While the IVW estimate is equivalent to the slope of the best fitting line through the observations that pass through the origin, the MR-Egger estimate would be the best fitting line through the observations in a model that allows the intercept to vary. In this method, the intercept will reflect the average pleiotropic effect across genetic variants (e.g. log odds CHD per allele when difference in adiponectin per allele is zero) and the slope coefficient will provide an estimate of the causal effect provided that the InSIDE (Instrument Strength Independent of Direct Effect) assumption holds, which requires that there is no correlation between SNP-exposure association and direct effects of SNP on outcome.

Bootstrapping (10,000 iterations) was used to derive corrected 95% confidence intervals for MR-Egger intercept and slope using the percentile method<sup>3</sup>.

#### *Positive control analysis*

The positive control consisted of a Mendelian randomization analysis in which LDL-c was the biomarker of interest and CHD risk was the outcome. 58 SNPs were reported as strongly associated with LDL-c in GLGC consortium<sup>4</sup>. Of these, 38 could be found in both Cardiogram and CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip dataset and, thus, were used as the instrumental variable for LDL-c. The crude IVW method was used to estimate the association of LDL-c with CHD risk. Since many SNPs were also associated with other lipid traits (ex: HDL-c, TAG and total cholesterol), the MR-Egger method was also used.

## Online Tables

Online Table I. Characteristics of the data sources

Consortium	Use	Studies	Study population	Imputation	QC criteria†	Model	Adjustments	Data download
ADIPOGen	SNP-log adiponectin	16 cohort studies with GWAS data	29,347 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH, BIMBAM or Beagle (reference: Phase II CEU HapMap population)	Call rate > 0.95; MAF > 0.01; $p_{HWE} > 10^{-6}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , or proper info $\geq 0.4$ )	additive	Age, sex, BMI, principal components of genomic ancestry, study site (where appropriate), family structure (one family-based study) and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	<a href="https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium">https://www.mcgill.ca/genepi/adipogen-consortium</a>
CARDIoGRAM§	SNP-log odds CHD	14 case-control or cohort studies with GWAS data	22,233 CHD cases and 64,762 controls of European ancestry	IMPUTE, MACH or BIMBAM (reference: CEU HapMap population)	Sample call rate > 0.97-0.98; SNP call rate > 0.95-0.99; MAF > 0.01; $p_{HWE} \leq 10^{-3}$ - $10^{-6}$ ; ethnic outliers. Quality measures for imputed SNPs: NR*	additive	Age, sex and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	<a href="http://www.cardiogramplusc4d.org/downloads/">http://www.cardiogramplusc4d.org/downloads/</a>
CARDIoGRAMplus C4D MetaboChip§	SNP-log odds CHD	48 case-control or cohort studies with GWAS data	63,746 CHD cases and 130,681 controls of European (~91%) and Asian ancestry	NA, Minimac or IMPUTE (reference: HapMap 2/3 or 1000 Genomes Project phase 1)	Sample call rate > 0.98; MAF > 0.01; $p_{HWE} > 10^{-4}$ ; and other study-specific criteria	additive	Age, sex and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	<a href="http://www.cardiogramplusc4d.org/downloads/">http://www.cardiogramplusc4d.org/downloads/</a>
MAGIC	SNP-HbA <sub>1c</sub> (%)	23 cohort studies with GWAS data	35,920 individuals of European ancestry	IMPUTE or MACH (reference: CEU HapMap population)	Sample call rate > 0.95-0.97; SNP call rate > 0.90-0.95; MAF > 0.01; $p_{HWE} > 10^{-4}$ - $10^{-6}$ ; sex mismatch between genotyped and reported sex; outliers as assessed by population structure analysis; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , or proper info $\geq 0.4$ , and MAF > 0.01)	additive	Age, sex, other cohort-specific variables as applicable, and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	<a href="http://www.magicinvestigators.org/downloads/">http://www.magicinvestigators.org/downloads/</a>
	SNP-log fasting insulin	20 cohort studies with GWAS data	38,238 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH or BIMBAM (reference: CEU HapMap population)	Sample call rate > 0.94-0.99; SNP call rate > 0.90-0.95; MAF > 0.01-0.05; $p_{HWE} > 10^{-4}$ - $10^{-7}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , proper info $\geq 0.4$ or observed/expected variance ratio > 0.3)			
GLGC	SNP-HDLc SNP-LDLc SNP-TAG	60 cohort and case control studies with GWAS or MetaboChip data	188,577 European-ancestry individuals	MACH (reference: CEU HapMap population)	Quality control: NR*	additive	Age, sex, principal components of genomic ancestry (some studies), and genomic control inflation factor ( $\lambda$ ). Individuals taking lipid-lowering medications were excluded.	<a href="http://csg.sph.umich.edu/abecasis/public/lipids2013/">http://csg.sph.umich.edu/abecasis/public/lipids2013/</a>



Online Table I. Characteristics of the data sources (continued)

GIANT	SNP- BMI	114 studies of multiple designs with GWAS or Metabochip data	up to 322,154 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH or BIMBAM (reference: Phase II CEU HapMap population)	Sample cal rate > 0.80-0.98; SNP call rate > 0.90-0.99; MAF > 0.01-0.05; $p_{HWE} > 10^{-3}$ - $10^{-7}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , proper info $\geq 0.4$ , or no filtering)	Age, age2, and study specific variables (e.g. principal components of genomic ancestry), and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )	additive	<a href="http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files">http://www.broadinstitute.org/collaboration/giant/index.php/GIANT_consortium_data_files</a>
	SNP-BMI-adjusted WC	101 studies of multiple designs with GWAS or Metabochip data	up to 210,088 individuals of European ancestry	IMPUTE, MACH or Beagle (reference: Phase II CEU HapMap population)	Sample cal rate > 0.85-0.98; SNP call rate > 0.90-0.99; MAF > 0.00-0.01; $p_{HWE} > 10^{-3}$ - $10^{-7}$ ; and quality measures for imputed SNPs ( $r^2 \geq 0.3$ , proper info $\geq 0.4$ , or no filtering)	Age, age2, BMI and study specific variables (e.g. principal components of genomic ancestry), and genomic control inflation factor ( $\lambda$ )		

† Quality control criteria varied across studies; \* NR: not reported in the main consortium publication. § CHD was defined as the presence of coronary artery disease or myocardial infarction. Detailed criteria for CHD definition for each study can be found in the Supplementary material of the main publications<sup>5-7</sup>.

QC: quality control; GWAS: genome-wide association study; CEU: Centre d'Etude du Polymorphisme Humain collected in Utah; CHD: coronary heart disease; MAF: minor allele frequency; SNP: single nucleotide polymorphism; BMI: body mass index; WC: waist circumference; NR: not reported; NA: not applicable. CARDIoGRAM: Coronary ARtery DIsease Genome-wide Replication And Meta-analysis; MAGIC: Meta-Analyses of Glucose and Insulin-Related Traits Consortium; GLGC: Global Lipids Genetics Consortium; GIANT: Genetic Investigation of ANthropometric Traits.

Online Table II. Core instrumental variable assumptions and strategies to address them

Assumption	Graphical examples of assumption violation	Consequences of potential violation	Validation of assumption in the current analysis
1. IV should be (strongly) associated with the exposure		A weak association between the IV and E can reduce precision and introduce weak instrument bias, which tends to bias the causal estimate towards the OLS estimate in one-sample MR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The strength of SNPs-adiponectin association was explored using the F-statistic (<math>F &gt; 20</math> for every SNP)</li> <li>- In two-sample MR studies with non-overlapping datasets, any bias from weak instruments would be in the direction of the null and, thus, should not result in false positive findings</li> </ul>
2. IV should only affect the outcome through the exposure		Bias in MR estimate can result from horizontal pleiotropy (e.g. genetic variant itself or a correlated variant is associated with multiple pathways independent of the exposure); the direction and magnitude of this bias will depend on the direction and magnitude of the association path from IV to O that is not via E	<p>Issues of horizontal pleiotropy were addressed by three different strategies:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- The association of SNPs with known CHD risk factors was tested. In case of evidence of potential pleiotropy, this was accounted for in the analyses</li> <li>- By comparing the conservative and the liberal approach. In the conservative approach, horizontal pleiotropy is less likely given that variants in the <i>ADIPOQ</i> gene are more plausible valid instrumental variables for adiponectin levels. In the liberal approach, there is an increased likelihood of horizontal pleiotropy but also increased power, since more variants can be selected by this approach</li> <li>- Using methods that account for unknown directional pleiotropy (MR-Egger method)</li> </ul>
3. IV should be independent of exposure-outcome confounders		In cases of population stratification, there could be an spurious association between IV and phenotypes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- We cannot test for the absence of exposure-outcome confounders relating to the IV when summary-level data are used, but there is empirical evidence that this is unlikely<sup>8</sup></li> <li>- To reduce the possibility of bias due to population stratification, the analyses were restricted to only (or predominantly) European-ancestry individuals</li> <li>- All consortia adjusted for genomic control inflation factor</li> </ul>

IV: instrumental variable; E: exposure; O: outcome; U: unknown confounder; X: other phenotype:

G: other genetic variant in LD; LD: linkage disequilibrium; CHD: coronary heart disease. A dashed arrow was used to indicate weak association between IV and E. \*Adapted from Vanderweele<sup>9</sup>.

**Online Table III. Power simulations for the Mendelian randomization analyses**

Data source	Sample size	Proportion of cases	Type-I error rate ( $\alpha$ )	Original OR	Equivalent standardized OR	$R^2_{x-z}$	Power
CARDIoGRAM	86,995	25.6%	0.05	0.70	0.80	5%	100%
CARDIoGRAM	86,995	25.6%	0.05	0.80	0.87	5%	97%
CARDIoGRAM	86,995	25.6%	0.05	0.90	0.94	5%	42%
CARDIoGRAMplusC4D Metabochip	194,427	32.8%	0.05	0.70	0.80	5%	100%
CARDIoGRAMplusC4D Metabochip	194,427	32.8%	0.05	0.80	0.87	5%	100%
CARDIoGRAMplusC4D Metabochip	194,427	32.8%	0.05	0.90	0.94	5%	81%

OR: Assumed true odds ratio of CHD risk per standard deviation of the exposure variable

Conversion of original (per log adiponectin) to equivalent standardized OR (per standard unit of log adiponectin) was made using an external source of individual level data (1982 Pelotas Birth Cohort) with similar adiponectin distribution (adiponectin levels in ADIPOGen consortium: mean = 9.8  $\mu\text{g/ml}$  (SD = 5.6); adiponectin levels in 1982 Pelotas Birth Cohort: mean = 9.3  $\mu\text{g/ml}$  (SD = 5.7)).

$R^2_{x-z}$ : proportion of variance explained for the association between the genetic instrument (Z) and adiponectin levels (X). Values approximate findings from Dastani et al <sup>10</sup> and Yaghoobkar et al <sup>11</sup>.

Calculations were performed in the power calculator for Mendelian Randomization studies, available at <http://cnsgenomics.com/shiny/mRnd/>, based on the publication by Brion et al 2013 <sup>12</sup>.

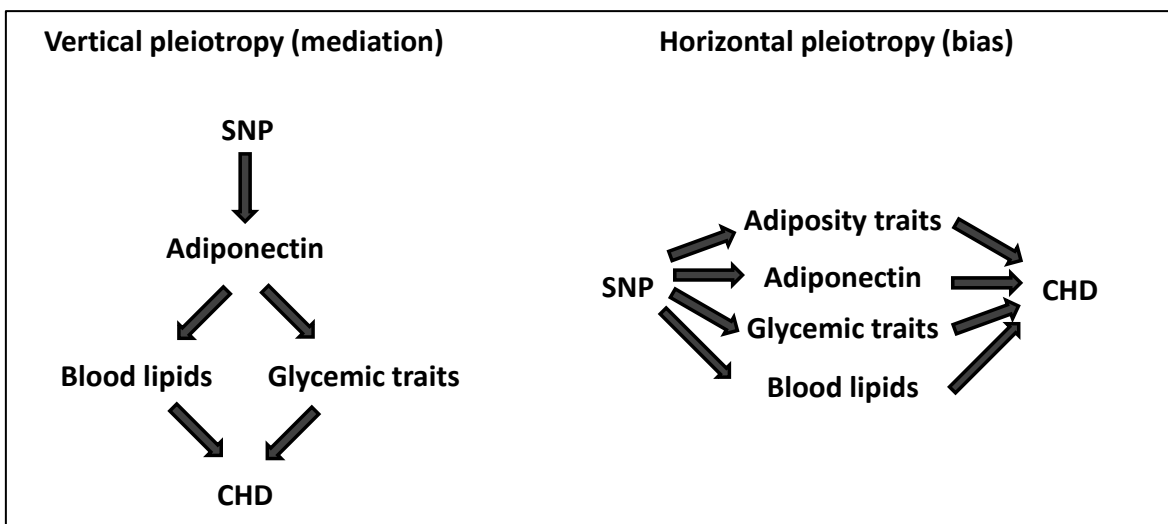
## Online Figures

**Online Figure I. Graphical illustration of scenarios of (A) vertical pleiotropy (mediation) and (B) horizontal pleiotropy (bias) by CHD risk factors in the relation among SNPs, adiponectin levels and CHD risk.** CHD: coronary heart disease; SNP: single nucleotide polymorphism.

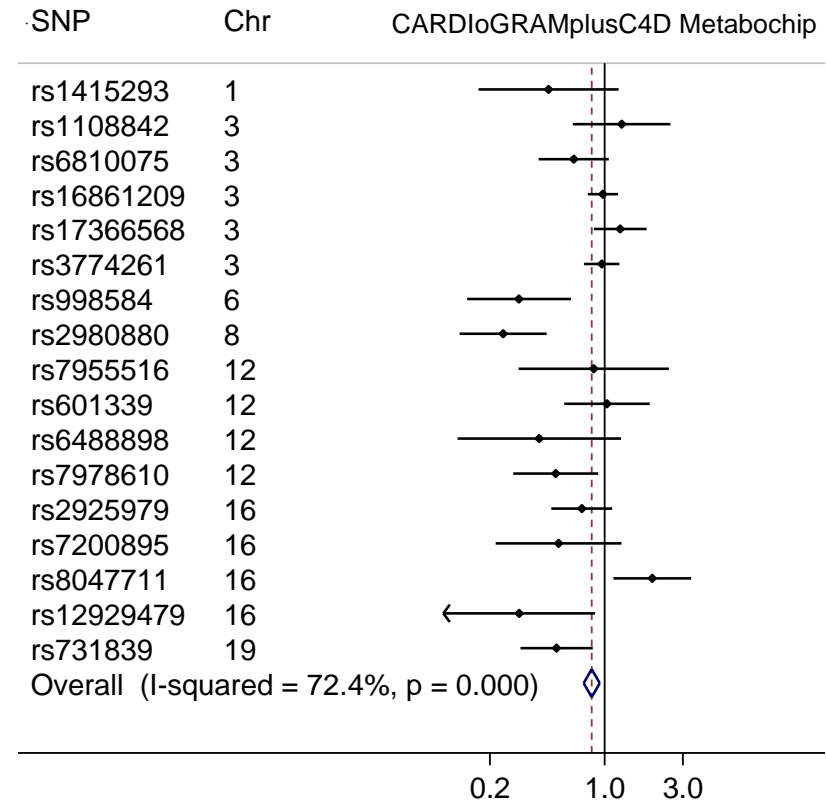
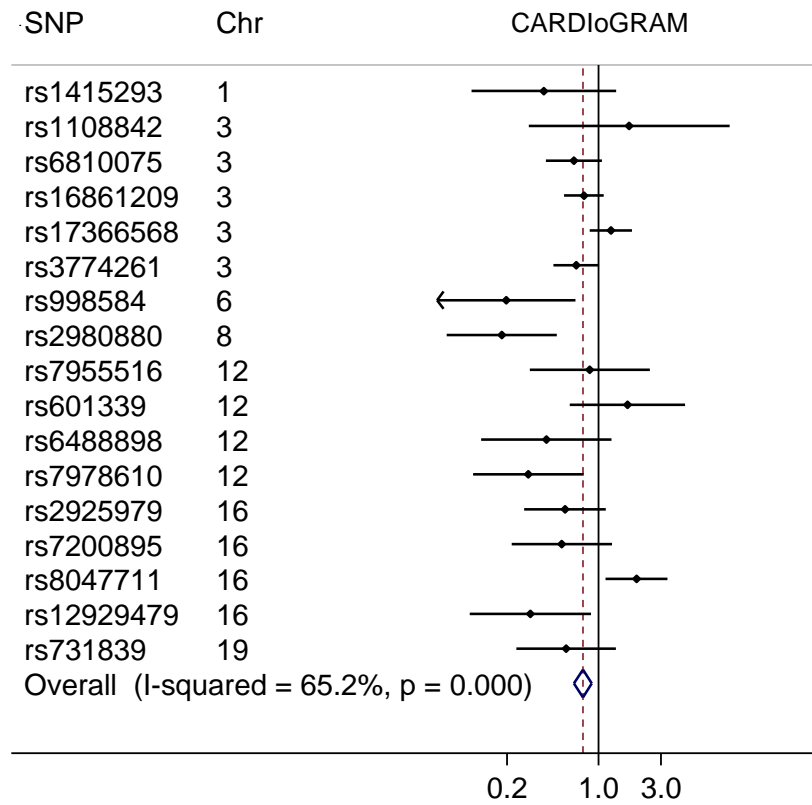
**Online Figure II. Meta-analysis and heterogeneity analysis of Mendelian randomization estimates of each SNP for the association of blood adiponectin levels with CHD risk.** CHD: coronary heart disease; SNP: single nucleotide polymorphism, Chr: chromosome.

**Online Figure III. Pooled odds ratio (and 95%CI) of coronary heart disease risk per unit increase in log adiponectin levels omitting one SNP at a time (influence meta-analysis) estimated by the IVW method and by the MR-Egger method.** CHD: coronary heart disease; IVW: inverse-variance weighted method; MR-Egger: Mendelian randomization-Egger method; OR: odds ratio; SNP: single nucleotide polymorphism.

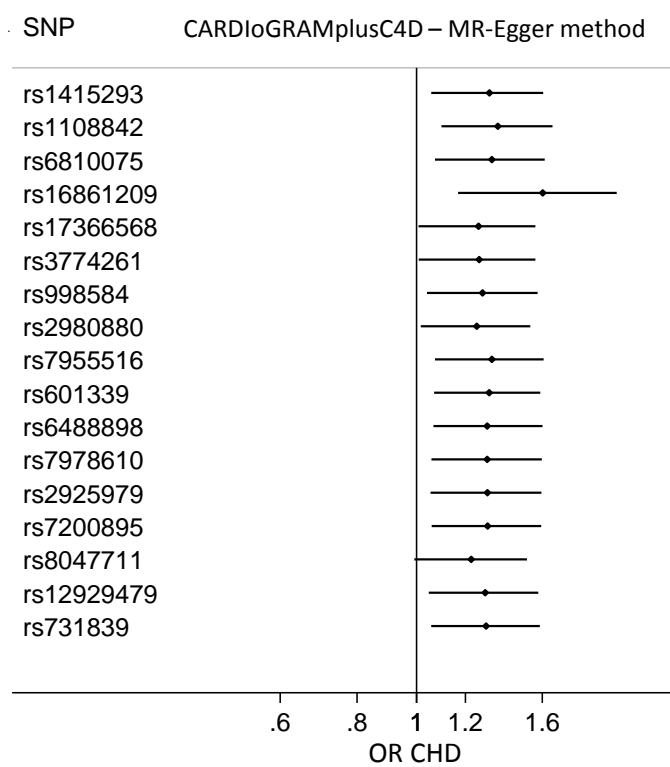
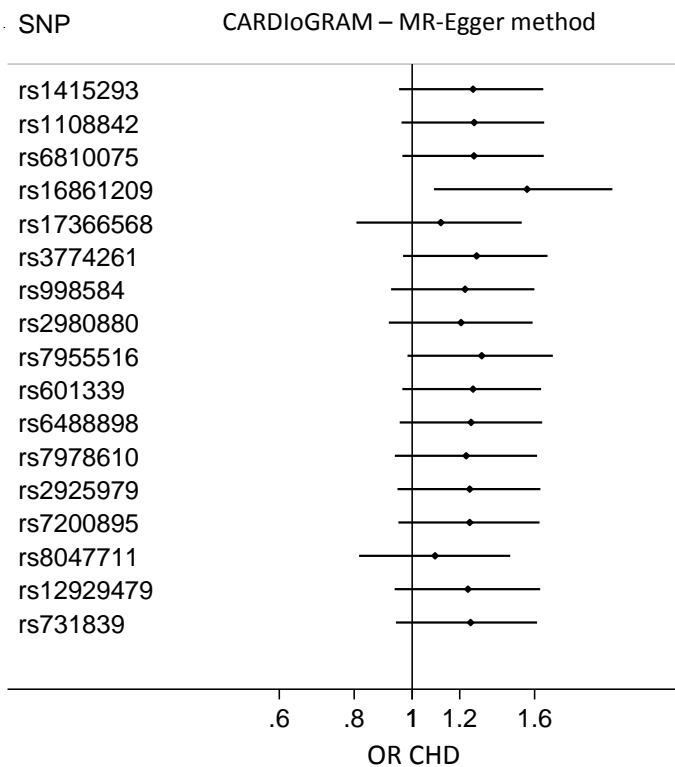
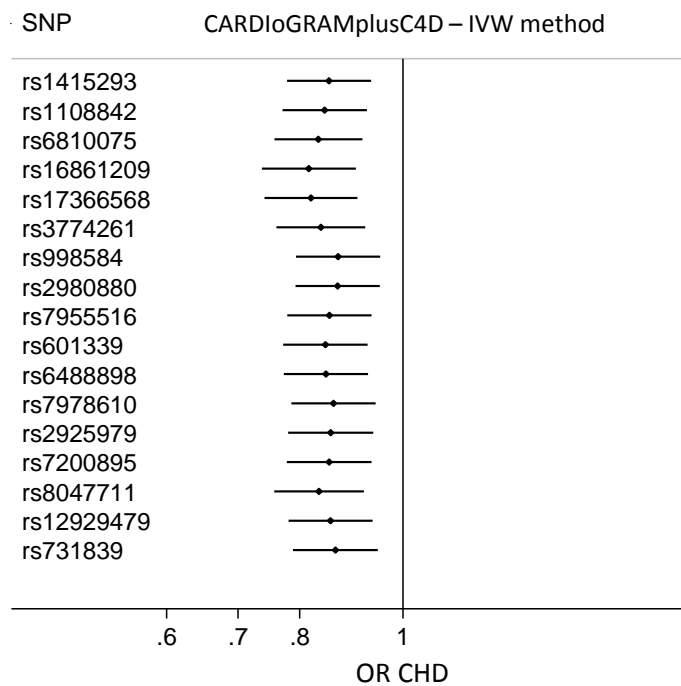
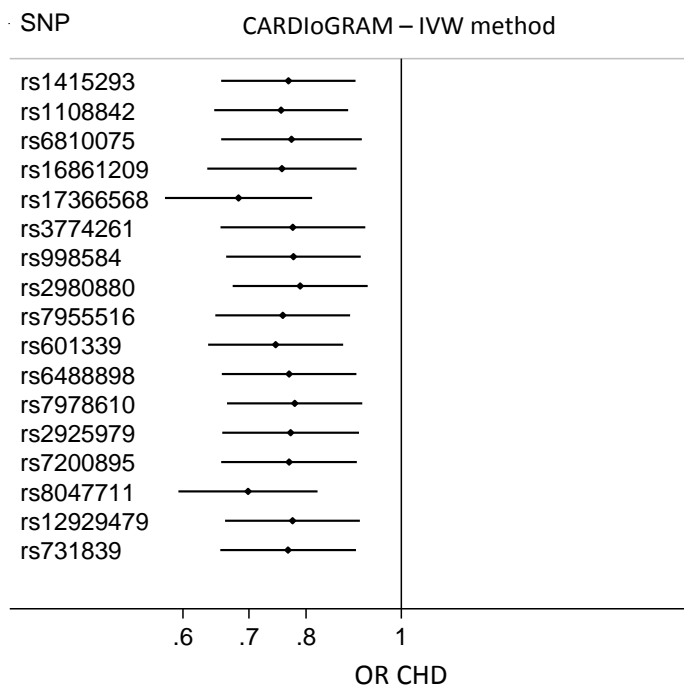
**Online Figure IV. Log odds ratio of coronary heart disease and mean increase in log adiponectin levels per adiponectin raising allele in CARDIoGRAM and CARDIoGRAMplusC4D MetaboChip. Each data point represents betas for SNP-log OR CHD (Y axis) and SNP-adiponectin (X axis) association (N = 17 SNPs).** CHD: coronary heart disease; IVW: inverse-variance weighted method; MR-Egger: Mendelian randomization-Egger method; OR: odds ratio; SNP: single nucleotide polymorphism



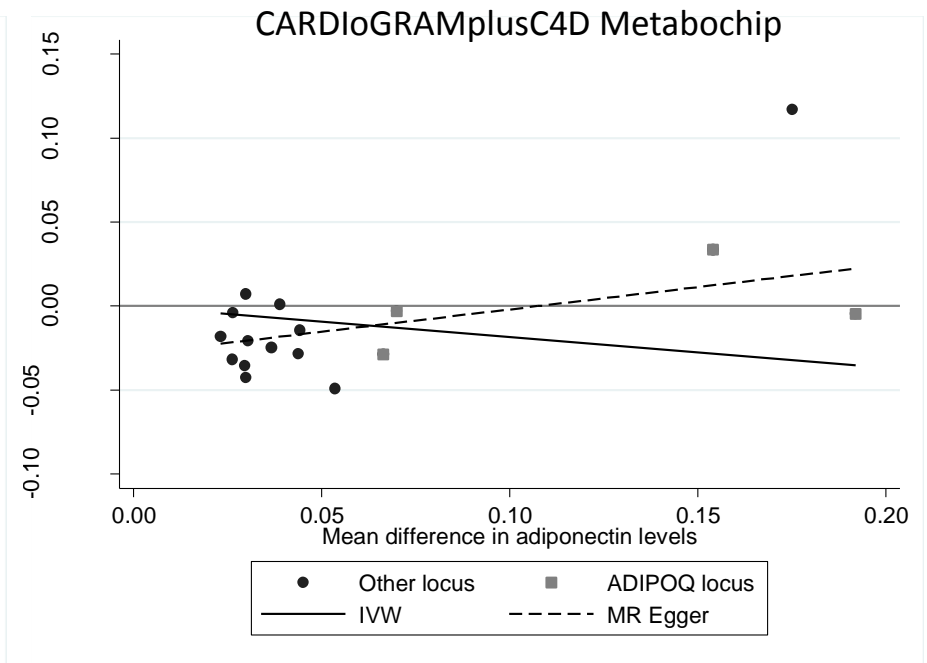
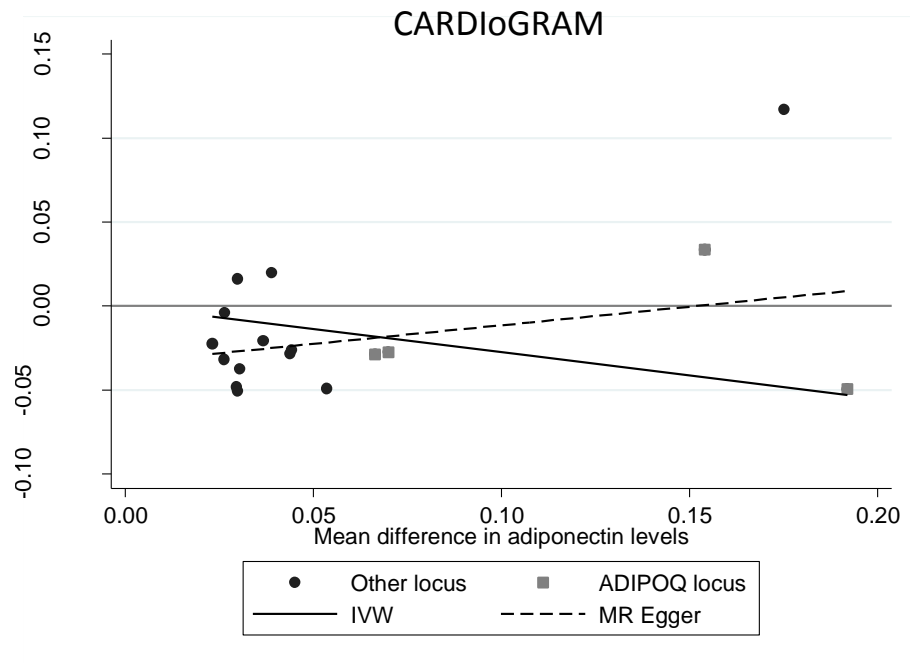
Online Figure I.



Online Figure II.



Online Figure III.



Online Figure IV.



## Supplemental References

1. Burgess S, Dudbridge F, Thompson SG. Re: "Multivariable mendelian randomization: The use of pleiotropic genetic variants to estimate causal effects". *Am. J. Epidemiol.* 2015;181:290-291
2. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997;315:629-634
3. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: Effect estimation and bias detection through egger regression. *Int. J. Epidemiol.* 2015;44:512-525
4. Global Lipids Genetics C, Willer CJ, Schmidt EM, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* 2013;45:1274-1283
5. Preuss M, Koenig IR, Thompson JR, et al. Design of the coronary artery disease genome-wide replication and meta-analysis (cardiogram) study a genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circulation-Cardiovascular Genetics.* 2010;3:475-U186
6. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45:25-33
7. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2011;43:333-338
8. Smith GD, Lawlor DA, Harbord R, Timpson N, Day I, Ebrahim S. Clustered environments and randomized genes: A fundamental distinction between conventional and genetic epidemiology. *PLoS Med.* 2007;4:e352
9. VanderWeele TJ, Tchetgen Tchetgen EJ, Cornelis M, Kraft P. Methodological challenges in mendelian randomization. *Epidemiology.* 2014;25:427-435
10. Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: A multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002607

11. Yaghootkar H, Lamina C, Scott RA, et al. Mendelian randomization studies do not support a causal role for reduced circulating adiponectin levels in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62:3589-3598
12. Brion MJ, Shakhbazov K, Visscher PM. Calculating statistical power in mendelian randomization studies. *Int J Epidemiol*. 2013;42:1497-1501

***SEÇÃO VIII - COMUNICADO À  
IMPrensa***

---

## Comunicado à Imprensa

### **Estudo nega que o hormônio adiponectina ajude a prevenir doenças do coração**

Um estudo da Universidade Federal de Pelotas revela que o hormônio adiponectina não parece atuar na prevenção de doenças cardiovasculares em seres humanos, ao contrário do que sugeriam testes realizados em animais e em culturas de células em laboratório.

Produzida pelo tecido adiposo, a adiponectina tem níveis drasticamente reduzidos em pessoas obesas. “Atualmente, muitos pesquisadores defendem a ideia de que a adiponectina seja um dos mecanismos pelos quais a obesidade aumenta a chance de desenvolver doenças cardiovasculares. Nosso estudo contraria esta hipótese”, afirma a nutricionista Maria Carolina Borges, autora da pesquisa publicada em tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia do UFPel, sob orientação de Aluisio Jardim Dornellas Barros. O trabalho teve a contribuição de pesquisadores da *University College of London*, Universidade de Bristol e Universidade de Cambridge.

O estudo incluiu dados genéticos e de ocorrência de doenças cardiovasculares de mais de mais de 194.000 indivíduos e dados de indicadores metabólicos de mais de 10.000 indivíduos. Foram comparadas pessoas geneticamente predispostas a produzir mais adiponectina a pessoas geneticamente predispostas a produzir menos adiponectina.

De acordo com os resultados, não houve diferenças entre esses grupos em relação à chance de desenvolver doenças cardiovasculares ou de apresentar as alterações metabólicas que precedem essas doenças. Além disso, o estudo apontou que a redução da produção de adiponectina está relacionada ao acúmulo de gordura abdominal e não ao acúmulo de gordura na região dos quadris.

“Nossas conclusões apontam que a aposta em novos medicamentos que aumentem a produção de adiponectina não deve se converter em avanços na prevenção de doenças cardiovasculares”, explica a autora.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo e no Brasil, e a obesidade é um dos principais fatores de risco para essas

doenças. “Compreender os mecanismos que levam às doenças cardiovasculares em seres humanos pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de terapias voltadas à prevenção e ao tratamento dessas doenças”, conclui a autora.

***APÊNDICE A – RELATÓRIO DE  
TRABALHO DE CAMPO DO  
ACOMPANHAMENTO PRÉ-  
NATAL DA COORTE DE  
NASCIMENTOS DE PELOTAS  
DE 2015***

---

**COORTE 2015**  
**ACOMPANHAMENTO PRÉ-NATAL**  
**RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO**

### **1. Apresentação**

A coorte de Nascimentos Pelotas 2015 caracterizou-se pelo acompanhamento das mães ainda durante a gestação, diferenciando-se assim das demais coortes. Para tanto, todas as gestantes com data provável de parto (DPP) entre 15 de dezembro de 2014 e 16 de maio de 2016 foram consideradas elegíveis para responder ao questionário da Coorte 2015. Estas datas foram estimadas contemplando duas possíveis situações: em primeiro lugar, a possível margem de erro no cálculo da IG e, conseqüentemente na DPP; e em segundo lugar, considerando a possível ocorrência de nascimentos pré-termo.

A localização e recrutamento das gestantes elegíveis consistiu em um grande desafio, tendo em vista se tratar de um elemento novo na já bem consolidada metodologia das Coortes de Nascimentos de Pelotas (1982-1993-2004). Todas as etapas do trabalho de campo, desde sua preparação, são descritas a seguir.

Além da coleta de dados via entrevistas face a face, outras duas estratégias de coleta de dados foram utilizadas: acelerometria e saúde bucal, as quais foram conduzidas como estudos a parte, mas que ocorreram paralelamente ao acompanhamento pré-natal. Tanto a colocação do acelerômetro quanto o exame de saúde bucal realizado por um dentista eram conduzidos ao final da entrevista com aquelas gestantes que se encontravam entre a 16<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semana de gestação.

### **2. Preparação para o trabalho de campo**

A partir de março de 2013 a equipe de pesquisadores responsáveis pela Coorte de 2015 e alguns doutorandos passaram a realizar reuniões mensais para discutir todos os aspectos da preparação para o trabalho de campo dos acompanhamentos previstos para a Coorte 2015. Durante essas reuniões eram discutidos em detalhes aspectos da logística de cada acompanhamento e construção dos questionários, os quais eram apresentados a todos os

participantes, a cada reunião. Eram discutidos, prioritariamente, aspectos do acompanhamento pré-natal, o qual seria o primeiro a iniciar.

A equipe de trabalho do acompanhamento pré-natal iniciou em outubro de 2013 a organização e preparação do trabalho de campo, modificações e a testagem dos questionários. Semanalmente ou quinzenalmente, ocorriam reuniões para a definição de estratégias de captação de gestantes e de coleta dos dados.

## **2.1 Estratégia para captação de gestantes**

Na preparação deste acompanhamento e durante o campo diversas estratégias foram utilizadas com objetivo de localizar as gestantes elegíveis. Primeiramente foi elaborada uma lista de todos os estabelecimentos de saúde que atendessem a gestantes e constituíssem, portanto, um possível local de captação. Esta lista foi elaborada com base em estratégia de captação semelhante, utilizada pelo Intergrowth 21st, estudo que avaliou o crescimento intrauterino através da realização de ultrassom nas gestantes de Pelotas no período de 2010 a 2013. As listas contavam com nome, endereço e telefone de clínicas de ultrassonografia, laboratórios de análises clínicas, consultórios médicos, unidades básicas de saúde, hospitais, ambulatórios e policlínicas da cidade de Pelotas.

A segunda etapa da preparação para o campo ocorreu entre outubro de 2013 e março de 2014, e consistiu na visitação de todos os locais constantes na lista. De maneira geral, as visitas a clínicas de ultrassom, laboratórios, policlínicas e UBS eram realizadas pelas doutorandas e pós-doutoranda e as visitas a hospitais e ambulatórios eram realizadas pelos coordenadores. As visitas a consultórios particulares eram realizadas por acadêmicos do curso de medicina. Quando havia alguma dificuldade de contato com algum dos estabelecimentos, a coordenadora Mariangela Freitas da Silveira era comunicada e tentava contato com os locais. As visitas tinham como objetivo estabelecer uma pessoa responsável pelo contato com o estabelecimento, obter informações sobre o número de gestantes atendidas por mês em cada local e disponibilidade de sala para realização de entrevistas, informar o responsável pelo estabelecimento sobre a realização do estudo e solicitar colaboração do estabelecimento para a realização do mesmo. Na ocasião era



entregue uma carta de apresentação da Coorte 2015 assinada pelos coordenadores. Ao fim da visita era informado ao responsável que, assim que fosse definida a estratégia de captação para aquele local, a equipe da coorte entraria em contato novamente, para acertar maiores detalhes.

Com a informação sobre o fluxo de gestantes por mês em cada local em mãos iniciou-se a definição de estratégias de captação para cada local.

Nos ambulatórios do Hospital Escola UFPEL, da Faculdade de Medicina UFPEL e da UCPEL, bem como as UBS PAM Fragata e FRAGET foi identificado grande fluxo de gestantes e disponibilidade de sala para realização de entrevistas. Nestes locais foi definido que seria designada uma entrevistadora, denominada “fixa com sala”, para ficar em tempo integral, abordando as gestantes, convidando-as a participar do estudo e realizando a entrevista.

Em algumas clínicas de ultrassom identificou-se grande fluxo de gestantes, entretanto, em nenhuma delas havia sala disponível para entrevistas. Nestes locais estipulou-se que uma entrevistadora, denominada “fixa sem sala”, faria a abordagem das gestantes na sala de espera/recepção, a convidaria a participar do estudo e agendaria a entrevista imediatamente. Como as clínicas de ultrassom localizam-se na região central da cidade, foi definido que uma mesma entrevistadora ficaria responsável pela captação em mais de uma clínica. As clínicas sob responsabilidade de cada entrevistadora fixa foram definidas por proximidade geográfica.

Nos demais locais, os quais foram identificados com menor fluxo de gestantes a estratégia de captação adotada foi a “autorização de contato”. Esta estratégia consistia em deixar em local visível uma folha explicando o estudo e solicitando a gestante o preenchimento dos dados de contato, para posterior agendamento. Foi solicitado também que o responsável pelo atendimento direto à gestante apresentasse brevemente o estudo e entregasse a autorização de contato para que a gestante devolvesse preenchida. Periodicamente, uma entrevistadora fixa sem sala visitava esses locais para obter as autorizações de contato preenchidas e entregar mais material. No caso específico das UBS, o recolhimento/entrega de material era realizado por um motoboy, especialmente designado para a função.

## 2.2 Divulgação

Com o objetivo de divulgar a Coorte 2015, em todos os locais de captação de gestantes foram disponibilizados folders e cartazes sobre o estudo, destacando a sua relevância, na tentativa de estimular a gestante a entrar em contato com a equipe do estudo para agendar a sua entrevista.

Os folders também foram distribuídos em locais onde gestantes e mulheres em idade fértil costumam frequentar, como salões de beleza e lojas de produtos para bebês. Além disso, foram realizadas ações junto à mídia.

### *Divulgação na imprensa local e em redes sociais*

Com o objetivo de divulgar o acompanhamento pré-natal foram publicadas e divulgadas matérias nas rádios e jornais locais.

Ao início do campo, duas entrevistas foram dadas, uma pelo coordenador Fernando Cesar Wehrmeister e outra pela coordenadora Prof. Mariangela Freitas da Silveira, respectivamente. Uma foi realizada na Rádio Universidade no dia 08 de agosto de 2014, enquanto a outra foi para o jornal Diário Popular no dia 19 de julho de 2014.

Também, foi criado o perfil da Coorte 2015 na rede social Facebook (<https://www.facebook.com/coorte2015?fref=ts>).

### *Participação de reuniões de gestantes*

Outra estratégia utilizada para a divulgação foi a participação de reuniões de gestantes realizadas periodicamente pelo convênio médico UNIMED. A professora Dra. Mariangela Freitas da Silveira, assistiu a reunião do mês de agosto. Nesta ocasião, as gestantes eram convidadas a participar da coorte e eram entregues folders e termos de autorização que logo eram recolhidos por entrevistadoras da equipe.

### *Participação de reuniões de equipe em UBS*

Nas UBS de maior fluxo de gestantes, foram realizadas visitas nas quais as supervisoras de trabalho de campo e/ou coordenadores, explicavam o estudo solicitando a colaboração da equipe de trabalho correspondente a cada unidade. Na ocasião da visita, foram entregues termos de autorização, folders e cartazes.

### 2.3 Desenvolvimento e testagem dos questionários

Os questionários foram elaborados pela doutoranda Marília Arndt Mesenburg com base nas discussões realizadas durante as reuniões com os coordenadores. O questionário baseou-se no questionário perinatal da Coorte de Nascimentos Pelotas 2004, no questionário do estudo Intergrowth 21st e incluiu ainda outros temas julgados relevantes.

Foram elaborados três tipos de questionários: contato inicial, janela e completo. A idade gestacional no momento da captação da gestante determinava a qual questionário a mesma responderia. As gestantes captadas com até 16 semanas de gestação respondiam primeiro ao contato inicial (aplicado até 16 semanas de gestação). Durante a entrevista do contato inicial a entrevistadora já agendava a entrevista da janela, realizada entre 17<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas de gestação, preferencialmente na 20<sup>a</sup> semana. Aquelas gestantes que eram captadas a partir da 17<sup>a</sup> semana de gestação respondiam ao questionário completo, que consistia na junção dos questionários contato inicial e janela em um único questionário.

Os questionários foram elaborados na versão papel e, posteriormente, inseridos no formato digital para serem aplicados através do uso de *tablets*. A doutoranda Maria Carolina Borges, juntamente com a empresa Inove e o grupo da informática do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE), foi responsável por esta tarefa.

Em março de 2014 os questionários foram testados pelos doutorandos em gestantes não elegíveis para a Coorte 2015. O teste foi realizado com o objetivo de avaliar o tempo de aplicação, a compreensão por parte das entrevistadas e o funcionamento do *tablet*.

Os questionários utilizados no acompanhamento pré-natal da Coorte de Nascimentos Pelotas 2015 podem ser obtidos no endereço eletrônico: [http://www.epidemiologia-ufpel.org.br/site/content/coorte\\_2015/questionarios.php](http://www.epidemiologia-ufpel.org.br/site/content/coorte_2015/questionarios.php).

No Quadro 1 são apresentados os blocos temáticos contemplados em cada questionário.

**Quadro 1** – Blocos do questionário presentes em cada acompanhamento

Blocos	Questionários		
	Contato inicial	Janela	Completo
CRITERIOS DE ELEGIBILIDADE	X	X	X
BLOCO IDENTIFICACAO	X	X	X
BLOCO CARACTERISTICAS DA MÃE	X		X
BLOCO PRÉ NATAL	X	X	X
BLOCO MORBIDADE PRÉ-GESTACIONAIS	X		X
BLOCO USO DE MEDICAMENTOS	X	X	X
BLOCO CARACTERISTICAS DO PAI	X		X
BLOCO ATIVIDADE FISICA		X	X
BLOCO FELICIDADE		X	X
BLOCO USO DE ÁLCOOL		X	X
BLOCO TABAGISMO	X	X	X
BLOCO USO DE DROGAS		X	X
BLOCO SAUDE BUCAL		X	X
BLOCO DADOS PARA CONTATO	X	X	X
QUESTIONARIO EDIMBURGO*		X	X
CARTEIRA GESTANTE**	X	X	X

\*Teste psicológico Edimburgo

\*\*Para completar o bloco CARTEIRA DA GESTANTE, eram tiradas fotos da carteira da gestante e/ou resultados de exames e ultrassonografia, que logo eram transcritos para o questionário em papel e finalmente digitados num banco de dados específico (para mais detalhes ver seção Carteira da gestante).

## 2.4 Manual de instruções

O manual de instruções do estudo servia como guia e apoio para os entrevistadores e supervisores de campo. Ele era utilizado no caso de dúvidas, tanto no registro de informações no *tablet*, quanto para esclarecer questões relacionadas ao tipo de resposta. Um exemplar impresso fazia parte do material de cada entrevistadora.

## 2.5 Seleção e treinamento de entrevistadoras

Nos meses de março e abril de 2014 ocorreu a seleção e recrutamento de pessoal para trabalhar no acompanhamento. A seleção não teve divulgação, pois a secretária da coorte de 2015 contava com uma lista de pessoas que trabalharam nos acompanhamentos das outras coortes, para as quais foi enviada uma ficha de inscrição convidando-as para formar parte da equipe de entrevistadoras do acompanhamento pré-natal. Os requisitos para trabalhar no estudo eram ser de sexo feminino, maior de 18 anos de idade, possuir ensino médio completo e disponibilidade de horário para cumprimento de jornada de trabalho de 44 horas semanais. Após análise das fichas de inscrição, foram selecionadas 30 pessoas para participaram do treinamento dos questionários.

Sob responsabilidade das doutorandas e pós-doutoranda da equipe pré-natal, foi realizado um treinamento teórico-prático entre os dias 28 e 30 de março de 2014. A secretária da coorte (Mariana Haertel) auxiliou na organização das atividades. O treinamento incluiu: (a) apresentação geral da coorte e instruções gerais a respeito do trabalho e postura adequada da entrevistadora; (b) leitura de cada bloco do questionário geral e do manual de instruções com o objetivo de fornecer as instruções específicas de cada questão; (c) aplicações simuladas entre as próprias candidatas; (d) treinamento de uso do *tablet*.

Ao final de cada dia, dramatizações eram realizadas com a intenção de desenvolver a capacidade de manejo do *tablet* das candidatas e como uma forma das doutorandas avaliarem o desempenho de cada uma. Ao final do treinamento, foi cedido um turno para as entrevistadoras estudarem o manual de instruções. Por fim, foi realizada a prova escrita.

As candidatas treinadas foram avaliadas através de uma prova teórica. A seleção levou em consideração também aspectos como pontualidade, postura e desempenho durante o treinamento, avaliado pelas doutorandas e pela secretária.

Um total de 16 candidatas foram aprovadas, sendo 15 selecionadas como entrevistadoras e uma como responsável pela Central de Agendamento (CA).

Todas as candidatas aprovadas participaram de estudo piloto, realizado nos dias 07 e 08 de maio de 2014, no ambulatório da Faculdade de Medicina e no

estudo Interbio 21st, no qual as candidatas realizavam uma entrevista com gestante não elegível para a Coorte 2015, sendo assistida por uma doutoranda e pela pós-doutoranda. Cada candidata realizou pelo menos duas entrevistas, uma em papel e uma no *tablet*. A partir do desempenho durante o treinamento e o estudo piloto, as candidatas foram alocadas em três grupos com diferentes funções. Este ponto será detalhado no tópico trabalho de campo.

Durante o treinamento e o estudo piloto surgiram situações até então não previstas, respostas não contempladas e não presentes no manual de instruções ou ainda, problemas com o manejo do *tablet*. As orientações para estas situações foram inseridas no manual de instruções, o qual era atualizado em tempo real, ainda durante o treinamento.

Antes de irem a campo, as entrevistadoras selecionadas recebiam um treinamento sobre o exame de saúde bucal. Tal treinamento era realizado pela equipe responsável pela saúde bucal, da Faculdade de Odontologia UFPEL.

Houve desistências por parte das entrevistadoras durante o trabalho de campo e, portanto, surgiu a necessidade de realização de novos processos seletivos para preenchimento das vagas. Ao todo foram realizados dois treinamentos, sempre no modelo descrito acima.

## **2.6 Equipe de trabalho**

Após a seleção da equipe de entrevistadoras, o trabalho de campo do acompanhamento pré-natal da Coorte 2015 iniciou com a seguinte equipe:

- Dois coordenadores - Mariangela Freitas da Silveira e Fernando Cesar Wehrmeister
- Quatro supervisoras de campo: doutorandas Marília Arndt Mesenburg, Maria Carolina Borges e Romina Buffarini e pós-doutoranda Ludmila Entiauspe
- Um responsável pela resolução das inconsistências: Marília Arndt Mesenburg
- Dois responsáveis pelo banco de dados: Marília Arndt Mesenburg e Cauane Blumberg
- Uma secretária, a qual era responsável por auxiliar as supervisoras de campo e por questões administrativas e relativas a pagamento, distribuição de vales transporte, compra e reposição de material, contato com fornecedores, etc.

- Uma responsável pela central de agendamento: encarregada de agendar as entrevistas com as gestantes captadas e repassar a agenda para as entrevistadoras.
- Cinco entrevistadoras fixas com sala: lotadas em serviços de saúde com grande afluência de gestantes que possuíam a função de captar e realizar a entrevista imediatamente
- Cinco entrevistadoras fixas sem sala: lotadas em clínicas de ultrassom com grande afluência de gestantes, tinham como função realizar a captação da gestante e entrar em contato com a central de agendamento para marcar a entrevista.
- Cinco entrevistadoras itinerantes: tinham a função de realizar as entrevistas agendadas pelas fixas sem sala, via central de agendamento.
- Bolsistas de iniciação científica: realizavam atividades diversas, tais como digitação do controle de qualidade, transcrição das imagens das carteiras da gestante e exames, ligações para controle de qualidade e para confirmação de entrevistas.
- Em março de 2015 foi designada uma entrevistadora exclusivamente para a função de resolução de pendências, as quais eram aquelas entrevistas que não eram realizadas por motivo de ausência da gestante no dia e horário combinado.

No decorrer do trabalho de campo, a equipe sofreu modificações. As doutorandas Maria Carolina e Romina Buffarini fizeram parte da equipe até o mês de setembro de 2014, quando se ausentaram por ocasião do doutorado sanduíche no exterior. A partir de março de 2015 foram incorporadas a equipe as doutorandas do PPGE Keila Mascarello e Gloria Isabel Niño Cruz, e a doutoranda da ESEF Maria Laura Resem Brizio. Por ocasião do afastamento por licença maternidade da doutoranda Marília Arndt Mesenburg, em julho de 2015, a doutoranda Maria Laura Resem Brizio assumiu o download de entrevistas, a resolução de inconsistências e pendências com entrevistadoras e a doutoranda Gloria Isabel Niño Cruz assumiu a responsabilidade sobre o banco de dados, juntamente com o doutorando Cauane Blumberg. A doutoranda Keila Mascarello assumiu a responsabilidade sobre a transcrição das imagens da carteira da gestante.

### 3. Logística relacionada à coleta dos dados

O trabalho de campo teve início em 13 de maio de 2014.

Como mencionado no item “preparação para o trabalho de campo”, a captação das gestantes se deu, principalmente via entrevistadoras fixas com sala e fixas sem sala, nos estabelecimentos de saúde com grande fluxo de gestantes. Com o decorrer do campo surgiram outras formas de captação: contato espontâneo via telefone ou pelo Facebook e indicação.

A captação de gestantes em clínicas de ultrassom com grande fluxo de gestantes era realizada por um grupo de cinco entrevistadoras denominadas “fixas sem sala”, uma vez que ficavam locais fixos, mas não realizavam entrevistas por não haver sala ou local adequado disponível. Cada entrevistadora fixa sem sala era responsável por um grupo de estabelecimentos, definido segundo organização espacial e horários de maior fluxo de gestantes. O número de locais sob responsabilidade de cada entrevistadora variava de acordo com a demanda de gestantes do local. A entrevistadora ficava na sala de espera de cada local e abordava cada gestante que chegava ao estabelecimento, convidando-a para participar do estudo e fornecendo os esclarecimentos necessários. Diante de uma resposta positiva, a entrevistadora entrava em contato com a central de agendamento e, levando em conta a disponibilidade da gestante, agendava dia, horário e local para realização da entrevista. Caso a gestante negasse a participação no estudo, a entrevistadora fixa sem sala tentava obter o máximo de informações possíveis, para que a central de agendamento tentasse novamente convencer a gestante a participar do estudo. Uma vez por semana a equipe de entrevistadoras fixas sem sala comparecia ao CPE para relatar o andamento das atividades, possíveis problemas nos locais e buscar material.

#### *Captação e realização de entrevistas nos serviços de saúde de grande afluência de gestantes*

Alguns serviços de saúde foram identificados como sendo de grande fluxo de gestantes. São eles: ambulatório do Hospital Escola da UFPEL, ambulatório da UCPEL, ambulatório da Faculdade de Medicina da UFPEL, PAM Fragata, FRAGET e UBS Dunas. Para cada um destes locais, os quais havia sala disponível para realização de entrevistas, foi designada uma entrevistadora, denominada “fixa com sala”. Nestes locais o trabalho da entrevistadora fixa



com sala consistia em abordar a gestante, convidando-a a participar do estudo e realizar a entrevista imediatamente. Caso a gestante não pudesse naquele momento, mas se dispusesse a fazer a entrevista outro dia, a entrevistadora fixa com sala entrava em contato com a central de agendamento, que imediatamente agendava dia, horário e local, de acordo com a disponibilidade da gestante. Caso a gestante recusasse participar do estudo, a entrevistadora fixa com sala tentava obter o máximo de informações possíveis (no mínimo nome e telefone) para que a central de agendamento tentasse novamente convencer a gestante a participar do estudo. A equipe de entrevistadoras fixas com sala comparecia ao QG da Coorte 2015 uma vez por semana para descarregar as entrevistas realizadas, relatar o andamento no trabalho e possíveis problemas e buscar material.

#### *Entrevistas domiciliares ou no local de preferência da gestante*

As entrevistas agendadas pelas fixas sem sala, pelas fixas com sala e por aquelas gestantes que entravam em contato espontaneamente com a Coorte 2015, eram distribuídas pela responsável pela central de agendamento para a equipe de “entrevistadoras itinerantes”, assim denominadas por não ficarem em um local fixo, se deslocando aos locais determinados pelas gestantes para realização das entrevistas. A grande maioria das entrevistas era feita no domicílio da gestante, entretanto algumas preferiam fazer a entrevista em outros locais como o local de trabalho ou o CPE.

A responsável pela central de agendamento (CA) Caroline Barragan constituiu peça fundamental durante todo o trabalho de campo. Era de sua responsabilidade o repasse das entrevistas agendadas para as entrevistadoras itinerantes. Cada entrevistadora itinerante recebia no dia anterior a agenda de trabalho do dia seguinte, onde constava o nome da gestante, informações de endereço e telefone para contato e, sempre que possível, outras informações relevantes para o direcionamento do questionário como idade gestacional, data da última menstruação e data provável do parto. De posse dessas informações a entrevistadora itinerante se deslocava até a casa da gestante. Chegando à casa da gestante, a entrevistadora se apresentava e se certificava que a gestante havia compreendido sua participação no estudo e que não tinha mais dúvidas sobre o mesmo. Ao final de cada dia, cada entrevistadora enviava, por

email, para a central de agendamento um relatório sobre as entrevistas realizadas.

#### *Locais de baixo fluxo de gestantes e unidades básicas de saúde*

Em locais com volume pequeno de atendimentos como laboratórios de análises clínicas e consultórios médicos, e nas unidades básicas de saúde, os funcionários responsáveis pelo contato com as gestantes eram solicitados a convidar a gestante a participar do estudo e entregar uma autorização de contato, a qual a gestante preenchia com informações de identificação e contato. Essa autorização era recolhida semanalmente e encaminhada para a central de agendamento, que contatava a gestante e procedia ao agendamento da entrevista. O recolhimento das autorizações nos laboratórios e consultórios médicos era realizado pelas entrevistadoras fixas sem sala e o recolhimento nas UBS era realizado por um *motoboy*, especialmente designado para a função.

#### *Demanda espontânea*

Algumas gestantes entravam em contato espontaneamente com a central de agendamento para obter informações sobre como participar do estudo. A maioria relatava ter visto alguma reportagem sobre o estudo ou ter pego o folder de divulgação distribuído em um dos locais citados anteriormente. Ainda, algumas gestantes referiam ter visitado a página da Coorte 2015 no Facebook ou ter recebido indicação de algum conhecido para participar. Sempre que alguma gestante entrava em contato espontaneamente com a equipe, a responsável pela central de agendamento explicava todos os aspectos da participação no estudo e agendava a entrevista, que era repassada às entrevistadoras itinerantes.

### **3.1 Central de agendamento**

A central de agendamento (CA), sob responsabilidade da auxiliar de pesquisa Caroline Barragan, consistiu em um ponto chave para a realização de todo o trabalho de campo do acompanhamento pré-natal. Era de responsabilidade da CA a marcação de todas as entrevistas com gestantes captadas pelas entrevistadoras fixas e pela demanda espontânea. Além disso,

a CA entrava em contato com a gestante um dia antes da entrevista com o objetivo de confirmá-la. Inicialmente, uma única pessoa realizava este trabalho. Com o decorrer do trabalho de campo e o aumento do número de entrevistas, uma entrevistadora utilizava o turno da manhã para auxiliar o trabalho.

### **3.2 Uniforme**

Todas as entrevistadoras receberam um kit de trabalho que incluía duas camisetas e dois moletons identificados com o logotipo das coortes de nascimentos de Pelotas (Figura 1). As entrevistadoras foram orientadas a se deslocar para o trabalho e realizar entrevistas somente vestindo o uniforme.

Figura 1: Uniforme das entrevistadoras do acompanhamento pré-natal da Coorte de Nascimentos Pelotas 2015.

### **3.3 Plantões**

Inicialmente, nos dias úteis, plantões diários eram realizados pelas supervisoras de campo. Durante todo o dia estava presente no QG da Coorte 2015 pelo menos uma supervisora. Com o afastamento de duas doutorandas em setembro de 2014, os plantões passaram a ser realizados por telefone quando alguma outra atividade impedia o comparecimento das supervisoras ao QG. Durante os fins de semana, as entrevistadoras eram orientadas a, diante de qualquer problema sério, entrar em contato com as supervisoras por telefone, via Facebook (grupo fechado do acompanhamento pré-natal Coorte 2015) ou por whatsapp.

### **3.4 Brinde**

Como forma de agradecimento pela participação no estudo, a cada entrevista era entregue para a gestante um creme hidratante personalizado com o logotipo da coorte 2015 (Figura 2).

Figura 2: Brinde entregue as gestantes entrevistadas no acompanhamento pré-natal da Coorte de Nascimentos Pelotas 2015.

### **3.5 Controle de qualidade**

O controle de qualidade era de responsabilidade da pós-doutoranda Ludmila Entiauspe e funcionava da seguinte maneira: semanalmente, 10% das

gestantes entrevistadas eram sorteadas aleatoriamente. Estas recebiam uma ligação telefônica, realizada por um bolsista de iniciação científica, na qual respondiam a uma versão reduzida do questionário e também a questões sobre a percepção e satisfação relativa ao trabalho da entrevistadora. Essa versão reduzida do questionário era então duplamente digitada no programa Epidata para posterior checagem das inconsistências.

Outra forma de controle de qualidade era a percepção de gestantes conhecidas de algum dos membros da equipe da Coorte 2015. Essa comunicação podia ser espontânea, quando a gestante ficava insatisfeita com algum aspecto da entrevista e entrava em contato, ou ainda o membro da equipe, sabendo a ocorrência da entrevista, entrava em contato com a gestante para perguntar sobre a sua percepção a respeito da entrevista e do trabalho da entrevistadora.

O controle de qualidade era realizado ainda através da percepção dos dentistas, os quais realizavam o exame de saúde bucal ao final da entrevista, sobre o trabalho das entrevistadoras. Sempre que percebiam algum problema ou atitude que prejudicasse a coleta de dados e o andamento da entrevista, as supervisoras e coordenação era comunicada, sempre no sentido de crítica construtiva, visando manter a qualidade do trabalho.

### **3.6 Reversão de recusas**

Todas as recusas identificadas durante o trabalho de campo eram encaminhadas para a central de agendamento que, imediatamente, repassava a informação para os coordenadores e para a pós-doutoranda Ludmila Entiauspe, responsáveis pela reversão das mesmas. Eram realizadas cinco tentativas de contato. Era considerada recusa quando a gestante declarava claramente não querer participar do estudo ou quando não era obtido contato após cinco tentativas.

É importante ressaltar que muitas das recusas não eram passíveis de tentativa de contato para reversão, pois ocorriam no momento da captação das gestantes, que muitas vezes recusavam até mesmo fornecer dados de identificação e contato.

### 3.7 Reuniões

Semanalmente eram realizadas reuniões de equipe para discussão de eventuais problemas no trabalho de campo e definição das medidas a serem tomadas para solucioná-los. Destas reuniões participavam coordenadores, supervisoras de campo, secretária, responsável pela central de agendamento, responsável pela acelerometria e responsável pela parte de saúde bucal.

Reuniões com as entrevistadoras eram realizadas semanalmente, mas separadamente do restante da equipe. As entrevistadoras fixas sem sala reuniam-se com a pós doutoranda Ludmila Entiauspe uma vez por semana, todas no mesmo horário.

Já as entrevistadoras fixas com sala e itinerantes reuniam-se com a supervisora Marília Arndt Mesenburg e, logo após seu afastamento por licença maternidade com a supervisora Maria Laura Resem Brizio, às quintas-feiras, por ocasião da sincronização dos *tablets* para *download* das entrevistas realizadas. Por haver uma grande demanda de entrevistas, cada entrevistadora tinha seu horário de reunião. A sincronização era feita as quintas-feiras pela manhã, turno no qual era marcada apenas uma entrevista para cada entrevistadora, permitindo assim seu comparecimento ao QG da coorte. Nessa ocasião eram discutidos problemas no campo e eventuais solicitações das entrevistadoras.

Reuniões gerais com a equipe completa de entrevistadoras eram realizadas mediante necessidade.

### 4. Banco de dados (descarrego e inconsistências)

Como mencionado no tópico acima, a sincronização dos *tablets* para *download* das entrevistas era realizada semanalmente, as quintas feiras. Na ocasião também era realizado o download das fotos da carteira da gestante ou exames, obtidas durante a entrevista.

Neste dia, cada entrevistadora que tinha realizado entrevista desde a quinta-feira da semana anterior comparecia ao QG da coorte. A doutoranda responsável pelo banco de dados e resolução de inconsistências Marília Arndt Mesenburg realizava a sincronização dos *tablets*, *download* das fotos, ouvia as dúvidas e pendências sobre o trabalho de campo e orientava as entrevistadoras sobre a conduta correta em cada caso.

Após a sincronização de todos os *tablets*, o responsável pela extração dos bancos, doutorando Cauane Blumberg era avisado sobre o término e procedia então a extração dos dados para um banco em formato “.dta”. Neste banco era rodado o script para detecção de inconsistências, previamente elaborado pela doutoranda Marília Arndt Mesenburg. Um relatório de inconsistências era disponibilizado para a doutoranda responsável, via drop box. As inconsistências apontadas no relatório eram transferidas para uma planilha de Excel e então solucionadas. O prazo para resolução das inconsistências era de uma semana após o *download* da entrevista. Logo, uma entrevista realizada em um domingo e sincronizada na quinta-feira, deveria ser “limpa” até a quinta-feira da semana seguinte. As alterações necessárias no banco eram feitas pelo doutorando Cauane Blumberg, após o recebimento da planilha com as inconsistências resolvidas. A planilha com a resolução era enviada, geralmente, as sextas-feiras e no mesmo dia o banco de dados final, já com as alterações, era disponibilizado.

As fotos das carteiras ou exames eram salvas no computador pessoal da doutoranda e, posteriormente em um pen drive, que era por sua vez entregue ao doutorando Cauane Blumberg, que salvava as imagens em um Dropbox específico para armazenamento das imagens.

A partir de junho de 2015, a sincronização para *download* de entrevistas, *download* de fotos e resolução de inconsistências ficou sob responsabilidade da doutoranda Maria Laura Resem Brizio.

## **5. Transcrição das imagens da carteira da gestante e exames**

As imagens oriundas das fotografias realizadas durante as entrevistas e descarregadas semanalmente eram disponibilizadas através do servidor do centro de pesquisas para a doutoranda Keila Mascarello que distribuía as imagens aos cinco transcritores semanalmente, as sextas-feiras, sendo aproximadamente 200 imagens para cada um.

Os transcritores transcreviam as imagens em formulário específico e entregavam semanalmente, as terças-feiras, para digitação. Além de contato direto com a doutoranda responsável pela transcrição, os transcritores tinham disponível um manual de orientações para caso de dúvidas.

Durante a transcrição as imagens eram renomeadas com o ID de identificação de cada gestante, mantendo-se ainda cópias das imagens com a identificação original.

## **6. Número de entrevistas**

Como citado anteriormente, foram elaborados três tipos de questionários: contato inicial, janela e completo. A idade gestacional no momento da captação da gestante determinava a qual questionário a mesma responderia. As gestantes captadas com até 16 semanas de gestação respondiam primeiro ao contato inicial (aplicado até 16 semanas de gestação). Durante a entrevista do contato inicial a entrevistadora já agendava a entrevista da janela, realizada entre 17<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas de gestação, preferencialmente na 20<sup>a</sup> semana. Aquelas gestantes que eram captadas a partir da 17<sup>a</sup> semana de gestação respondiam ao questionário completo, que consistia na junção dos questionários contato inicial e janela em um único questionário.

Durante o período de 13 de maio de 2014 a 31 de dezembro de 2015, período do trabalho de campo, foram realizadas 2414 entrevistas no questionário contato inicial, 2123 entrevistas no questionário janela e 2014 entrevistas no questionário completo.

## **7. Principais resultados**

Ao todo participaram do acompanhamento pré-natal 4426 gestantes. O principal local de captação das gestantes para a participação do acompanhamento foram as clínicas de ultrassom (47,4%).

Sobre as características das gestantes, a média de idade foi de 27 anos, 83,4% moravam com o companheiro e 70,4% eram brancas. A respeito da escolaridade das mesmas, 53% completaram o ensino médio, destas 65% completaram a faculdade e 53,7% fizeram pós-graduação. A maior parte da amostra apresentou comportamento sedentário, ou seja, não realizavam exercícios físicos regularmente (91,1%).

No bloco pré-natal pode-se observar que 97,5% das mulheres no momento da realização da entrevista estavam fazendo o pré-natal, sendo o principal lugar o consultório médico (36,7%), 46,3% planejaram a gravidez, 1,7% engravidaram através de fertilização artificial, 1,6% estavam grávidas de

gêmeos, 54,6% já tinham engravidado anteriormente, 16,7% relataram algum parto prematuro e 32,2% algum aborto. A média de peso pré-gestacional e atual foi de 67,4 e 72 kg, respectivamente. A média de altura da amostra foi de 161,8 cm. Em relação às vacinas durante o pré-natal, 81,7% das gestantes não se vacinaram contra o tétano, 76,3% não se vacinaram contra a hepatite-B, 63,4% não se vacinaram contra a gripe e 94% não se vacinaram contra a coqueluche, sendo que destas, 43,6%, 47,7%, 64,1% e 76,8%, respectivamente, não se vacinaram por falta de indicação médica. A respeito da amamentação, 98,6% das gestantes pretendiam amamentar, sendo que 26,5% gostariam de amamentar até quando o bebê quisesse. O tipo de parto de preferência das gestantes foi o parto normal (65,8%).

As morbidades pré-gestacionais mais prevalentes na amostra foram anemia (32,8%), depressão (18%), asma ou bronquite (16%) e hipertensão (12,6%). Em relação às morbidades gestacionais, 11,6% das gestantes apresentavam hipertensão, 6,3% alguma incapacidade física, 5,7% sangramento, 4,3% diabetes e 1,1% doença cardíaca.

No bloco características do pai, observou-se que a média de idade foi de 30 anos, 70,1% dos pais eram brancos, 46,9% completaram o ensino médio, destes 60,2% completaram a faculdade e 46,1% fizeram pós-graduação. Sobre a prevalência de morbidades, 16,2% tinham asma ou bronquite.

Sobre o comportamento sedentário, 89,6% das gestantes assistiam televisão todos os dias, sendo a média/dia de aproximadamente 4 horas. 47,2% usavam computador na sua casa, sendo a média/dia de aproximadamente 2 horas. 52,7% das mulheres não trabalhavam fora de casa, sendo a média/dia que a mesma permanecia sentada no trabalho era de aproximadamente 4 horas. A respeito do deslocamento, 63,5% se deslocavam utilizando carro, moto ou ônibus.

As atividades físicas preferidas pelas gestantes foram a caminhada (55,7%), alongamento (27,6%), musculação (15,7%), ginástica (11,3%) e yoga/pilates (5,5%). 59,7% não praticavam atividades físicas antes da gestação, 38% mudaram seus hábitos após a gestação, sendo que 83,9% mudaram seus hábitos para menos. As principais razões das gestantes não realizarem atividades físicas foram por ter medo ou achar perigoso para o bebê (66%), sentir-se cansada (57,2%) e sentir desconforto (57,2%).



No bloco álcool, 55,4% relataram não ter tomado álcool desde que engravidaram. Das 28,5% que tomaram alguma bebida alcoólica nos últimos trinta dias, a bebida mais citada foi cerveja (79%).

Em relação ao fumo, apenas 17,9% das gestantes tinham fumado nos últimos três meses, 11,3% fumavam atualmente e 21,5% dos seus companheiros fumavam. No bloco uso de drogas, pode-se observar que 98,9% das gestantes não usaram drogas durante a gestação.

No bloco saúde bucal 43% das gestantes relataram considerar a saúde dos seus dentes boa, 78,1% escovavam os dentes três vezes por dia, 40% usavam fio dental às vezes, 56,8% não tinham sangramento durante a escovação, no último ano 60,8% das gestantes tinham consultado um dentista, sendo que destes 61,3% foram em um consultório particular e a principal razão foi consulta de rotina (52,2%). Apenas 13,3% das gestantes tinham recebido orientação sobre como cuidar de seus dentes e dos dentes do seu filho, sendo esta orientação dada na maioria dos casos por um dentista (76,6%).

## **8. Descrição dos resultados do controle de qualidade pré-natal Coorte 2015**

O controle de qualidade (CQ) era realizado a cada 15 dias com os bancos completos e parciais de cada questionário (contato inicial, janela e completo).

Cada um dos bancos contém variáveis de identificação da gestante como o nome completo, o código de identificação da gestante e da entrevistadora. Além disso, foram incluídas outras variáveis com opção de resposta sim ou não como: morar com um companheiro, gravidez prévia, assistir televisão quase ou todos os dias, hipertensão antes da gravidez, uso de computador em casa, mudança de hábitos de atividade física após saber que estava grávida e se o acelerômetro foi colocado no pulso.

***APÊNDICE B – PROTOCOLO  
DE DOSAGEM DA  
ADIPONECTINA***

---

## PROCOLODE DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ADIPONECTINA

### ANTES DE COMEÇAR

- Separar materiais e reagentes

Reagentes/soluções*	Materiais
1. Anticorpo conjugado (892518) 2. Padrão para a curva (892519) 3. Reagente RD1W (895117) 4. Diluente de amostra RD6-39 (895824) 5. Tampão de lavagem (895003) 6. Reagente A (895000) 7. Reagente B (895001) 8. Solução STOP (895032) 9. Amostras  * Os reagentes devem estar em temperatura ambiente quando forem usados	1. Placa 2. Adesivo para fechar a placa 3. Pipetas 4. Ponteiras 5. Água tridestilada 6. Berço para multicanal (5) 7. Provetas de 500 mL e 50 mL 8. Microtubos 1,5 mL (tipo Eppendorf) 9. Luvas sem talco 10. Papel alumínio 11. Garrafa de 1 L 12. Caneta permanente 13. Cronômetro

PS: aproveitar esse momento para retirar as amostras do freezer, desenhar o mapa da placa e limpar a bancada com álcool e papel

➤ Preparar reagentes

*Padrão para a curva:*

Pipetar 2 mL do diluente de amostra RD6-39 (895824) no frasco do padrão para curva (892519), homogeneizar bem com o auxílio da pipeta e deixar descansar por 15 minutos.

*Tampão de lavagem (1:25):*

Para preparar 1 litro de tampão (suficiente para três placas), diluir 40 mL de tampão concentrado (895003) em 960 mL de água tridestilada. Usar as provetas para medir os volumes e armazenar em frasco de vidro.

PS: se houver cristais no tampão, esperar atingir temperatura ambiente para dissolvê-los.

➤ Preparar curva padrão (diluição seriada)

- Separar 6 microtubos e identificar como B, C, D, E, F e G
- Pipetar 200 µL de diluente RD6-39 (895824) nos microtubos B a G
- Homogeneizar levemente a solução do padrão e pipetar 200 µL no tubo B
- Homogeneizar bem a solução do tubo B e passar 200 µL para o tubo C
- Fazer o mesmo do tubo C para o D e assim por diante até o tubo G
- Separar outro tubo, identificar como H e pipetar 120 uL de diluente de amostra RD6-39 (branco)

➤ Preparar as amostras

- Separar um microtubo por amostra
- Identificar cada tubo com caneta permanente
- Pipetar **10 µL** de amostra
- Pipetar **990 µL** do reagente RD6-39 (895824) em todos os microtubos
- Homogeneizar amostras no vortex sem deixar formar espuma

## DURANTE O ENSAIO

1. Marcar o número da placa
2. Pipetar 100 µL de reagente RD1W (895117) em todos os poços
3. Pipetar 50 µL dos padrões (tubos A a G), do branco (tubo H) e das amostras diluídas, seguindo o mapa da placa
4. Cobrir com o adesivo e marcar o horário de início da próxima etapa (item 6). Dar leves “tapinhas” na placa para misturar bem.
5. Incubar por 2 horas
6. Despejar o conteúdo da placa e pipetar 400 µL de tampão de lavagem em cada poço. Desprezar o tampão, secar o excesso “batendo” a placa em papel toalha e colocar novamente 400 µL de tampão de lavagem. Repetir esse processo até completar 4 lavagens. Na última lavagem, “bater” bastante a placa no papel toalha para remover bem o líquido e estourar as bolhas com o auxílio de uma ponteira
7. Adicionar 200 µL de anticorpo conjugado (892518) em cada poço
8. Cobrir com o adesivo, marcar o horário da próxima etapa (item 10)
9. Incubar por duas horas
10. Fazer quatro lavagens (idem item 6)
11. Preparar a solução substrato:

- **Deve ser preparada logo antes de usar (no máximo 15 min antes) e deve ser protegida da luz (papel alumínio)**
- Misturar 1 parte do reagente A (895000) com 1 parte do reagente B (895001):

	1 placa	2 placas	3 placas	4 placas
Reagente A	20 mL	40 mL	60 mL	80 mL
Reagente B	20 mL	40 mL	60 mL	80 mL

12. Pipetar 200 µL de solução substrato em cada poço
13. Proteger placa da luz (papel alumínio) e incubar por 30 minutos (ir para o lab do Jean)
14. Ligar o equipamento

15. Adicionar 50  $\mu$ L de solução STOP (895032) em cada poço na mesma ordem em que foi colocada a solução substrato, bater na placa suavemente para homogeneizar

PS: espera-se que os poços fiquem azuis. Se ficar verde, homogeneizar melhor.

16. Medir a absorbância no equipamento a 450 nm e depois a 570 nm (não esperar mais que 30 minutos)

17. Salvar as duas leituras no computador e em pen drive e enviar para Carol por *email*. Se possível, fotografar resultados com celular.

*Legenda*

Nome em Português	Nome em Inglês
1. Anticorpo conjugado (892518)	1. Conjugate (892518)
2. Padrão para a curva (892519)	2. Standard (892519)
3. Reagente RD1W (895117)	3. Assay Diluent RD1W (895117)
4. Diluente de amostra RD6-39 (895824)	4. Calibrator Diluent RD6-39 (895824)
5. Tampão de lavagem (895003)	5. Wash Buffer Concentrate (895003)
6. Reagente A (895000)	6. Color Reagent A (895000)
7. Reagente B (895001)	7. Color Reagent B (895001)
8. Solução STOP (895032)	8. Stop Solution (895032)