

# Universidade Federal de Pelotas

Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da Associação do Polimorfismo C-11377G do Gene da Adiponectina com Fatores de Risco para Síndrome Metabólica em Indivíduos da Coorte de 1982.

**Patrícia Tassinari Lopes**

Pelotas, 2009.

Patrícia Tassinari Lopes

Avaliação da Associação do Polimorfismo C-11377G do Gene da Adiponectina com Fatores de Risco para a Síndrome Metabólica em Indivíduos da Coorte de 1982

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Isabel Oliveira de Oliveira

**Banca Examinadora:**

Isabel Oliveira de Oliveira - Dr<sup>a</sup> - Universidade Federal de Pelotas;

Beatriz Helena Gomes Rocha - Dr<sup>a</sup> - Universidade Federal de Pelotas;

Betânia Rodrigues dos Santos - Mestranda - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

## **Agradecimentos**

A toda minha família pelo carinho, amor, apoio e incentivo que nunca faltaram em toda esta jornada.

Ao meu pai, Edson Mello Lopes, pelo apoio incondicional durante toda minha jornada estudantil, além do amor e da confiança que me foram primordiais nessa etapa.

À minha mãe, Ana Tereza Tassinari Lopes, pelo carinho e dedicação. Mesmo distante sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso.

À minha irmã, Suzana Tassinari Lopes, por estar sempre presente, me apoiando e fazendo companhia.

Às minhas madrinhas, Iracilda Mello Lopes e Ecilma Mello Lopes, pelo amor, apoio e dedicação, sempre me incentivando a buscar por dias melhores.

À minha avó, Orfila Mello Lopes, por toda a ajuda, carinho, apoio e compreensão.

À minha amiga Monique Cabral Hahn, pelo apoio, pelas conversas, conselhos, e risadas, mesmo longe sempre se fez presente de alguma forma.

Às minhas amigas Vanessa Soria, Carmela Rampazzo Bresolin, Caroline Godoi, Fernanda Dalmaso, Helena Barbieri de Azevedo, Mariana Barbieri de Azevedo, Andressa Hennig Silva, Fernanda Pfeifer Raguzzoni e Andréia Rocha, e ao amigo Laerson Morales Hainzenreder, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelas palavras de apoio.

À orientadora, Isabel Oliveira de Oliveira, um muitíssimo obrigado não só pela orientação, mas também pela confiança e dedicação imprescindíveis para a minha formação profissional.

Às amigas e colegas de laboratório, Betânia Rodrigues dos Santos, Liziane Pereira da Silva, Cristini Milech e Mônica Wagner, pela amizade, companheirismo, confiança e apoio concedidos nesse período de convivência.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pelotas que sempre atenderam as minhas necessidades da melhor maneira possível.

E finalmente, agradeço à Universidade Federal de Pelotas pelo apoio financeiro através de bolsas alimentação e transporte, os quais foram imprescindíveis para a minha formação profissional.

## Resumo

LOPES, Patrícia Tassinari. **Estudo da Associação do Polimorfismo C-11377G do Gene da Adiponectina com Fatores de Risco para a Síndrome Metabólica em Indivíduos da Coorte de 1982.** 2009. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

A adiponectina é uma proteína secretada em abundância pelo tecido adiposo, a qual promove maior sensibilidade tecidual à ação da insulina. O gene da adiponectina humana é bastante polimórfico estando localizado no cromossomo 3q27, em um *locus* associado à suscetibilidade ao Diabetes Mellitus tipo2 (DM2), Síndrome Metabólica (SM) e doenças cardiovasculares (DCV). O objetivo do estudo foi avaliar a associação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C-11377G do gene da adiponectina com fatores de risco para a SM em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos ocorridos em Pelotas no ano de 1982. Foram analisadas 3.832 amostras de DNA genômico da população-alvo pela técnica de PCR-RFLP usando a enzima de restrição *HhaI*. Os produtos da reação de digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4%, sendo a genotipagem feita pela leitura das bandas segundo o critério: uma banda de 251 pb correspondente ao homozigoto selvagem, genótipo CC; duas bandas de 137 pb e 114 pb correspondentes ao homozigoto mutado, genótipo GG; e três bandas de 251 pb, de 137 pb e 114 pb, correspondentes ao heterozigoto CG. Os dados genéticos foram associados a dados clínicos relacionados à SM. A análise estatística foi realizada no programa STATA versão 10.0. Os resultados obtidos no estudo demonstraram associação do genótipo GG com aumento da circunferência da cintura na população de adultos jovens da coorte de 82 ( $p = 0,042$ ). Considerando que a SM é uma desordem complexa, onde vários polimorfismos contribuem para a sua suscetibilidade, pretende-se dar continuidade na identificação de outros polimorfismos e, de seus possíveis haplótipos, envolvidos nos mecanismos etiopatogênicos de tal síndrome.

Palavras-chave: Adultos jovens. Diabetes Mellitus tipo 2. PCR-RFLP. Resistência à insulina.

## Abstract

LOPES, Patrícia Tassinari. **Estudo da Associação do Polimorfismo C-11377G do Gene da Adiponectina com Fatores de Risco para a Síndrome Metabólica em Indivíduos da Coorte de 1982.** 2009. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Adiponectin is an abundant protein secreted by adipose tissue that promotes greater sensitivity to insulin. The human adiponectin gene is very polymorphic and is located on chromosome 3q27, a susceptibility locus for type 2 diabetes mellitus (DM2), metabolic syndrome (MS) and cardiovascular diseases (CVD). The aim of this study was to investigate the association of single nucleotide polymorphism (SNP) C-11377G of the adiponectin gene with risk factors for metabolic syndrome in subjects from a 1982 Pelotas birth' cohort. Genomic DNA of 3,832 samples was processed by PCR-RFLP using the restriction enzyme *HhaI*. The reaction products were submitted to electrophoresis on 4% agarose gel. Genotyping was done as follows: a band of 251 bp corresponded to the homozygous wild genotype CC, two bands of 137 bp and 114 bp corresponded to the homozygous mutant genotype GG, and three bands of 251 bp, 137 bp and 114 bp corresponded to heterozygous. Genetic data were examined for analysis of the association with clinical, anthropometric and metabolic features related to MS. Statistical analyses were performed with STATA 10.0. Our results showed that GG genotype is associated with the increase in waist circumference ( $p=0,042$ ). Considering Metabolic Syndrome as a complex disorder where multiple polymorphisms contribute to their susceptibility, we intend to continue our investigation in order to identify other genetic variations that participate in the pathogenic mechanisms of this syndrome.

Keywords: Type 2 Diabetes Mellitus. Insulin Resistance. PCR-RFLP. Young adults.

## Lista de Figuras

- Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR, onde foram obtidas sequências amplificadas de 251 pb do gene da adiponectina (M= marcador de peso molecular ladder 100 pb) ..... 23
- Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 4% da reação de PCR-RFLP, onde são visualizados fragmentos correspondentes aos genótipos CC, CG e GG do SNP C-11377G do gene da adiponectina (M= marcador de peso molecular ladder 100 pb) ..... 24
- Figura 3 – Frequência alélica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em 3.828 indivíduos da coorte de 1982 ..... 26
- Figura 4 – Frequência genotípica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em 3.828 indivíduos da coorte de 1982 ..... 26
- Figura 5 – Análise estratificada por sexo da distribuição dos genótipos do SNP C-11377G do gene da adiponectina entre homens (n=1.921) e mulheres (n=1906) da coorte de 1982 ..... 27



## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação das médias das variáveis clínicas entre os três genótipos do SNP C-1377G em indivíduos da coorte de 1982.....	28
Tabela 2 – Comparação das médias das variáveis clínicas em homens e mulheres da coorte de 1982 distribuídos segundo os três genótipos do SNP C-11377G do gene da adiponectina .....	29

## Abreviaturas e Siglas

Acrp30 - Adipocyte complement-related protein of 30kDa

Apm1 - Adipose Most Abundant Gene Transcript 1

Conselho Coordenador de Ensino, Pesquisa e Extensão - COCEPE

Doença cardiovascular - DCV

Diabetes *Mellitus* - DM

Diabetes *Mellitus* tipo 2 - DM2

Fator de necrose tumoral-alfa - TNF- $\alpha$

GBP28 - gelatin-binding protein of 28kDa

Índice de Massa Corporal - IMC

Organização Mundial da Saúde - OMS

Pares de base - pb

*Polimerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR-RFLP

Síndrome Metabólica - SM

Single Nucleotide Polymorphism - SNP

Universidade Federal de Pelotas - UFPel

## Sumário

Folha de Rosto .....	2
Banca Examinadora .....	3
Agradecimentos .....	4
Resumo .....	6
Abstract .....	7
Lista de Figuras .....	8
Lista de Tabelas .....	9
Abreviaturas e Siglas .....	10
Sumário .....	11
1 Introdução .....	12
2 Objetivos .....	14
3 Revisão de Literatura .....	15
4 Metodologia .....	21
5 Resultados .....	25
6 Discussão .....	30
7 Conclusão .....	32
Referências .....	33
Anexos .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A adiponectina é uma proteína secretada exclusivamente pelo tecido adiposo, composta por 247 aminoácidos, apresentando peso molecular de 30kDa (ARITA et al., 1999). É uma potente sensibilizadora da ação da insulina nos músculos e no fígado, regulando a homeostase de energia e a tolerância à glicose (YAMAUCHI et al., 2001).

A concentração plasmática de adiponectina varia inversamente com o peso corporal, tendo sido observado que indivíduos obesos apresentam níveis de adiponectina inferiores em relação a indivíduos saudáveis (ARITA et al., 1999). A presença de hipoadiponectinemia também se encontra associada a componentes da Síndrome Metabólica (SM) tais como: hipertensão (IWASHIMA et al. 2004), dislipidemia (KAZUMI et al., 2004), resistência à insulina (ARITA et al., 1999), assim como, ao Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (HOTTA et al., 2000; DUNCAN et al., 2004), e a doenças cardiovasculares (DCV) (KUMADA et al., 2003).

Vários SNPs do gene que codifica a adiponectina têm sido descritos e associados à obesidade (HARA et al., 2002; STUMVOLL et al., 2002; BOUATIA-NAJI et al., 2006), a doenças cardiovasculares (QI et al., 2005), ao DM2 (VASSEUR et al., 2005; GU et al., 2004), à resistência insulínica (FILIPPI et al., 2004; VASSEUR et al., 2002) e aos níveis de adiponectina circulantes (HARA et al. 2002; MENZAGHI et al., 2002; POLLIN et al., 2005; HEID et al., 2006; QI et al., 2006).

Considerando os relatos da literatura, pode-se observar que conforme a população de estudo existe variação no alelo de risco, o que sugere que fatores ambientais e o background genético dos indivíduos interfiram nessa associação entre genes e doença (FILIPPI et al., 2004; POLLIN et al., 2005). Portanto, o presente estudo espera contribuir para a identificação de um possível alelo de risco para a SM numa amostra de indivíduos nascidos nos hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, os quais pertencem ao estudo de coorte de 1982 (VICTORA et al., 2003). A importância de ter como base um estudo do ciclo vital reside no fato de que tal metodologia permite estudar a

influência de exposições precoces sobre a determinação das doenças na vida adulta.

É importante salientar ainda que a SM, a DM2, a obesidade e as doenças cardiovasculares acometem uma parcela significativa da população mundial (aproximadamente 3%), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), comprometendo a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. É, portanto, de grande interesse para o meio científico e para a formação de políticas públicas de saúde que se realizem estudos acerca do tema, visando reconhecer precocemente os fatores que põem em risco à saúde dos indivíduos, com o objetivo de aumentar a qualidade de vida da população, e diminuir o encargo econômico para o indivíduo e para a sociedade.

## 2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi estudar o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C-11377G do gene da adiponectina em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos ocorridos em Pelotas no ano de 1982, RS, Brasil.

Objetivos específicos:

- Descrever a frequência alélica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em indivíduos da coorte de 1982;
- Descrever frequência genotípica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em indivíduos da coorte de 1982;
- Avaliar a presença de associação entre os dados genéticos encontrados com os dados clínicos disponíveis nos bancos de dados da coorte de 1982, tais como: circunferência da cintura, IMC, pressão sistólica média, pressão diastólica média, colesterol-HDL, triglicerídeos e glicemia da polpa digital.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O tecido adiposo, reconhecido como o maior depósito para armazenamento de energia, é também um importante órgão endócrino, secretando uma variedade de proteínas que influenciam o metabolismo corporal (AHIMA; FLIER, 2000).

A adiponectina (ARITA et al., 1999) é uma proteína secretada exclusivamente pelo tecido adiposo, tanto marrom quanto branco, sendo composta por 247 aminoácidos e apresentando peso molecular de 30 kDa. É também conhecida como Acrp-30 (adipocyte complement-related protein of 30kDa) (SCHERER et al., 1995), adipoQ (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 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 uma potente sensibilizadora da ação da insulina nos músculos e no fígado (OUCHI et al., 1999), regulando a homeostase de energia e a tolerância à glicose (YAMAUCHI et al., 2001), além de possuir propriedades vasodilatadoras (OUCHI et al., 2003), antiaterogênicas (BRÅKENHIELM et al., 2004) e antiinflamatórias (SCHULZE et al., 2004).

A estrutura da adiponectina consiste em uma seqüência amino-terminal, uma região variável, um domínio de colágeno, e um domínio carboxi-terminal globular. Uma vez sintetizada, a adiponectina humana sofre modificações pós-translacionais, de hidroxilação e de glicosilação, podendo se apresentar sob oito isoformas, de monômeros a oligômeros, sendo seis dessas formas glicosiladas (WANG et al., 2002). Estudos sugerem que essas modificações pós-translacionais sejam necessárias para otimizar a atividade biológica da adiponectina, sendo provável que interações envolvendo ambos os domínios, globular e de colágeno, sejam importantes para assegurar a estabilidade e atividade das formas multiméricas (CHANDRAN et al., 2003). As formas básicas da adiponectina associam-se fortemente através de seus domínios globulares, formando trímeros. Formas monoméricas não são observadas na circulação, e parecem ficar confinadas nos adipócitos. Já as formas oligoméricas, principalmente trímeros e hexâmeros associados através

de seus domínios de colágeno, são encontradas na corrente sanguínea (BERG et al., 2002).

O domínio globular da adiponectina tem se mostrado mais potente do que a forma completa em amenizar a hiperglicemia e a hiperinsulinemia em formas genéticas, ou induzidas por dieta, de obesidade em ratos (YAMAUCHI et al., 2001).

A cristalografia de raios-X do domínio globular da adiponectina também revela uma forte homologia de sua estrutura com a do TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), também secretado pelo tecido adiposo, sugerindo uma ligação evolutiva entre o TNF- $\alpha$  e adiponectina (BERG et al., 2002). O TNF- $\alpha$  diminui a atividade da tirosina-quinase nos receptores de insulina, e sua superprodução pelo tecido adiposo tem sido demonstrada no desenvolvimento de resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1994).

A concentração plasmática da maioria das proteínas produzidas pelo tecido adiposo se encontra aumentada na obesidade devido ao aumento da massa de gordura corporal. Um exemplo é a leptina, cuja concentração plasmática aumenta quando aumenta o IMC (HOSODA et al., 1996). Em relação à concentração plasmática de adiponectina, foi observado que indivíduos obesos apresentam níveis de adiponectina inferiores em relação a indivíduos saudáveis (3,7 mg/mL versus 8,9 mg/mL, respectivamente;  $p < 0,0001$ ) (ARITA et al., 1999).

Os níveis de adiponectina se encontram diminuídos também na Síndrome Metabólica (SM), no Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (HOTTA et al., 2000; DUNCAN et al., 2004), nas doenças cardiovasculares (DCV) (KUMADA et al., 2003), na hipertensão (IWASHIMA et al. 2004), e em quadros de dislipidemia (KAZUMI et al., 2004).

Em 1988, Reaven descreveu a Síndrome X a partir da observação de que vários fatores de risco para doenças cardiovasculares, por exemplo, dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia, comumente se apresentavam em conjunto. A Síndrome X também é chamada de Síndrome Metabólica. O III Painel de Tratamento do Adulto do Programa Nacional de Educação em Colesterol descreve o termo Síndrome metabólica reconhecendo o fato de que a resistência à insulina é um mecanismo central na fisiopatologia dessa



síndrome (THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM'ADULT TREATMENT PANEL III, 2002).

O diagnóstico da SM é dado pela presença de pelo menos três das seguintes características: circunferência da cintura (uma medida de obesidade abdominal) >102cm no homem e >88cm na mulher; taxa de triglicérides  $\geq 150\text{mg/dL}$ ; taxa de colesterol-HDL  $< 40\text{mg/dL}$  nos homens e  $< 50\text{mg/dL}$  nas mulheres; pressão arterial elevada ( $\geq 130/ \geq 85\text{mm Hg}$ ) e glicose de jejum  $\geq 110\text{mg/dL}$  (THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM'ADULT TREATMENT PANEL III, 2002).

A SM parece ter três categorias etiológicas potenciais: obesidade e distúrbios do tecido adiposo, resistência à insulina (uma insensibilidade tecidual à insulina) e uma constelação de fatores independentes que são mediadores de alterações específicas da SM, como por exemplo, moléculas de origem hepática, vascular e imunológica, as quais têm sido implicadas nos mecanismos patogênicos dessa síndrome. DCV são descritas como o desfecho primário da SM, mas é conhecido que o risco para o DM2 aumenta em pessoas com SM. Foi observado ainda que a maioria das pessoas que apresenta resistência insulínica tem risco aumentado para o DM2. Além disso, quando o DM2 se torna clinicamente aparente, o risco de desenvolver DCV aumenta de forma drástica (GRUNDY et al., 2004a). Em conclusão, pode-se observar que existem estreitas relações entre SM, DM2 e DCV.

O Diabetes Mellitus, segundo a Associação Americana de Diabetes (2006), é definido como uma doença de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. É caracterizado por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas devido à deficiência da ação da insulina nos tecidos alvos.

O DM2 resulta de uma combinação da resistência insulínica com uma resposta compensatória inadequada na secreção de insulina. É uma doença de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Esse é o tipo mais comum de diabetes, acometendo 90-95% dos diabéticos, e é também conhecido como diabetes do adulto ou diabetes não insulino-dependente (AMERICAN

DIABETES ASSOCIATION, 2006). Pacientes com DM2 são na maioria obesos, e essa obesidade lhes provoca um certo grau de resistência à insulina. Nos DM2 não obesos é provável que ocorra um aumento na porcentagem de massa de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal. O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, com a obesidade e com a falta de atividade física, sendo fortemente associado com fatores genéticos (hereditariedade). Frequentemente, o DM2 se estabelece de forma silenciosa por vários anos. Isso é decorrente do fato da glicemia sofrer alterações graduais e da hiperglicemia não ser tão severa nos primeiros estágios a ponto do paciente perceber os sintomas clássicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

O mecanismo central para o desenvolvimento da SM e do DM2 é apontada como sendo a resistência insulínica (GRUNDY et al., 2004b). Estudos genéticos e epidemiológicos sugerem fortemente que a resistência insulínica é, pelo menos em parte, determinada geneticamente (FILIPPI et al., 2004).

A insulina regula a secreção de várias proteínas produzidas pelo tecido adiposo. Níveis elevados de insulina em diabéticos podem ser responsáveis pelo decréscimo da concentração plasmática de adiponectina, conforme demonstrado por Hotta et al. (2000).

O gene da adiponectina consiste em três éxons e dois introns e localiza-se no cromossomo 3q27, em um locus associado ao DM2 (VIONNET et al., 2000) e à SM (KISSEBAH et al., 2000; KYRIAKOU et al., 2008).

O tipo mais comum de variação genética entre as pessoas é o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP). Trata-se da variação de apenas um nucleotídeo na seqüência de DNA do genoma de uma espécie, ou entre indivíduos (BROOKS, 1999). Variações de nucleotídeo único no gene da adiponectina podem determinar alterações nos níveis circulantes da proteína em algumas populações, mas não em outras (POLLIN et al., 2005), o que chama a atenção para diferenças na regulação gênica entre as populações (FILIPPI et al., 2004).

Vários SNPs do gene que codifica a adiponectina, têm sido descritos e associados a várias doenças.

Stumvoll et al (2002) demonstraram que o alelo G do SNP T45G, em alemães caucasianos sem história familiar de pré-disposição para DM2, aumenta o risco para obesidade, e secundariamente para a resistência insulínica. Da mesma forma foi demonstrado que o genótipo GG para o SNP T45G foi associado ao aumento do peso corporal, aumento da medida da circunferência da cintura e aumento de novos casos de hiperglicemia numa população francesa acompanhada pelo período de 3 anos (FUMERON et al., 2004). Esses resultados são concordantes com o risco aumentado para o DM2 descrito em japoneses de peso normal portadores do alelo G nos SNPs T45G e G276T (HARA et al., 2002).

Por outro lado, o alelo T para o SNP G276T foi associado à resistência insulínica em uma população italiana (FILIPPI et al., 2004), enquanto em uma população americana o mesmo alelo foi associado a um risco significativamente reduzido para doenças cardiovasculares (QI et al., 2006).

No trabalho de Vozarova de Courten et al. (2005) realizado com índios Pima, que pertencem a uma população caracterizada por alta prevalência de DM2, os polimorfismos do gene da adiponectina investigados não se mostraram associados com níveis de adiponectina, resistência à insulina, DM2 ou obesidade.

Em relação ao SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, foco de interesse do presente estudo, existem alguns dados na literatura. O alelo -11377G foi associado à baixos níveis de adiponectina, enquanto o alelo -11377C foi associado com níveis aumentados de adiponectina circulante numa população francesa (VASSEUR et al., 2005).

Em outro estudo realizado com crianças e adultos franceses, o alelo -11377C foi considerado alelo de risco tanto para obesidade infantil, como para a adulta (BOUATIA-NAJI et al., 2006). De forma concordante, a presença do alelo C foi associada com maior IMC em pacientes suecos caucasianos com DM2 (GU et al., 2004).

Em contrapartida a presença do alelo G do SNP C-11377G foi associada a taxas aumentadas de glicose de jejum, insulina de jejum, e

triglicerídeos, assim como, a baixos níveis de adiponectina em italianos (PETRONE et al., 2006). Em estudo comparando indivíduos negros sul africanos, hispânicos cubanos e brancos alemães foi observado que o genótipo GG do SNP -11377 foi associado ao aumento de risco para o DM2 somente em cubanos (SCHWARZ et al., 2009).

Conforme acima exposto, foram encontradas evidências da relação do SNP C-11377G do gene da adiponectina com características clínicas associadas a SM e DM2. Porém, são conflitantes os dados da literatura na caracterização do alelo de risco do SNP C-11377G.

O estudo da coorte de 1982 representa um estudo de Ciclo Vital, onde foram incluídos todos os indivíduos nascidos nos hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1982, num total de 5.914 crianças nascidas vivas. Até 2004-2005 foram realizados oito acompanhamentos desses indivíduos sob a coordenação geral dos professores Cesar Victora e Fernando Barros do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da Universidade Federal de Pelotas (VICTORA et al., 2003). A partir desses estudos de acompanhamento foram obtidas diferentes informações clínicas, antropométricas, demográficas, socio-econômicas, comportamentais, entre outras. Estudos do ciclo vital são importantes porque permitem acompanhamentos em diferentes etapas ao longo da vida dos indivíduos, dando condições de se investigar a influência de exposições precoces sobre a determinação de doenças crônicas que ocorrem na vida adulta.

Para concluir cabe salientar ainda que, a Síndrome Metabólica, o Diabetes Mellitus tipo 2, a obesidade e as doenças cardiovasculares acometem uma parcela significativa da população mundial, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), comprometendo a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. É, portanto, de grande interesse para o meio científico e para a geração de políticas públicas de saúde que se realizem estudos acerca do tema, visando reconhecer precocemente os fatores que põem em risco à saúde dos indivíduos, a fim de aumentar a qualidade de vida da população, e diminuir o encargo econômico para o indivíduo e para a sociedade.

#### 4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado na cidade de Pelotas, RS, Brasil, no laboratório de Fisiologia Molecular pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Biologia/Universidade Federal de Pelotas (UFPel), durante o período de Julho de 2008 a Dezembro de 2009.

Esse estudo faz parte do projeto intitulado “Associação de polimorfismos do gene da adiponectina com fatores de risco para Síndrome Metabólica em indivíduos da coorte de 1982”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, e registrado no Conselho Coordenador de Ensino, Pesquisa e Extensão (COCEPE) sob o código 4.06.01.143. Cada participante da coorte assinou um termo de consentimento livre e pré-informado autorizando as análises propostas (Anexo 1).

A população de estudo compreendeu 3.832 indivíduos pertencentes à coorte de 1982 e que participaram da última etapa de acompanhamento ocorrida em 2004-2005, onde doaram sangue para obtenção de soro e DNA. O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo o protocolo de Miller et al. (1988), e armazenado em 3 alíquotas, uma em freezer -80°C e, duas em freezer - 20°C, formando o Banco de DNA da coorte de 82.

As amostras de DNA genômico dessa população foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da avaliação de polimorfismos no comprimento do fragmento obtido após restrição enzimática (RFLP) (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), com a finalidade de analisar o polimorfismo de nucleotídeo único C-11377G da região promotora do gene da adiponectina.

A reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*), *primer forward* (ACTTGCCCTGCCTCTGTCTG) e *reverse* (GCCTGGAGAACTGGAACGTG), da empresa *Invitrogen*, foi padronizada em 35 ciclos com a temperatura de anelamento de 57°C, sendo amplificada uma sequência de 251 pb.

A reação de PCR, num volume total de 35uL por amostra, foi realizada da seguinte forma:

- 26,8uL de Água Milli-Q;
- 3,5uL de Tampão;
- 1,05uL de MgCl;
- 0,7uL de DNTPs;
- 0,7uL de Primer F;
- 0,7uL de Primer R;
- 0,55uL de Taq polimerase;
- 1,0uL de DNA.

A reação de restrição enzimática com a enzima *HhaI* (5'...GCG'C...3') da empresa *New England Biolabs* foi padronizada a 37°C durante 2h, seguida de uma etapa de inativação da enzima a 65°C por 20 minutos.

Essa reação, num volume final de 20,0uL por amostra, foi feita com os seguintes reagentes:

- 3,2uL de Água Milli-Q;
- 1,2uL de Tampão da enzima;
- 0,6uL de Enzima (*HhaI*);
- 15,0uL de produto de PCR.

Considerando que as enzimas de restrição são sensíveis à temperatura de armazenamento, em nosso laboratório tivemos o cuidado de só retirar a enzima do freezer -20°C no momento da preparação da mistura dos reagentes, sendo imediatamente devolvida para seu local de armazenamento.

As reações foram realizadas usando o tampão da enzima fornecido pelo fabricante e o tempo de digestão adotado foi sempre superior ao mínimo recomendado.

A corrida eletroforética, na voltagem de 125 mV durante 1h20min, foi realizada em gel de agarose 2% para analisar os produtos da reação de PCR e gel 4% para os produtos da reação de restrição enzimática. O corante intercalante utilizado foi o Gel Red®. As bandas foram visualizadas por um sistema de captação de imagem acoplado a um transiluminador (Fig. 1).

A genotipagem foi feita da seguinte forma: uma banda de 251 pb correspondente ao homozigoto selvagem, genótipo CC; duas bandas de 137

pb e 114 pb correspondentes ao homocigoto mutado, genótipo GG; e três bandas de 251 pb, de 137 pb e 114 pb correspondentes ao heterocigoto (Fig. 2).

Os dados genéticos foram associados às seguintes variáveis: glicemia da polpa digital, triglicerídeos, colesterol - HDL, pressão sistólica média, pressão diastólica média, circunferência da cintura e índice de massa corporal. As medidas das variáveis de interesse foram provenientes do banco de dados da coorte de 1982, onde foi registrado perdas na obtenção de medidas das variáveis, computando-se um total de 3.701 medidas de glicemia da polpa digital; 3.821 medidas de triglicerídeos e de colesterol-HDL; 3.826 medidas de pressão sistólica média e de pressão diastólica média; e 3.822 e 3.824 de medidas de circunferência da cintura e de IMC, respectivamente.

Os dados genéticos foram digitados em bancos duplicados usando o programa EPINFO STATCALC. A seguir foi feita a comparação (*merge*) dos bancos e obtenção de um banco final corrigido pelo programa EPIDATA. Na análise estatística dos dados foi usado o Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a fim de se analisar a distribuição dos genótipos na população, e a análise da variância (ANOVA) usando o programa STATA versão 10.0.



Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR, onde foram obtidas sequências amplificadas de 251 pb do gene da adiponectina (M= marcador de peso molecular ladder 100 pb).

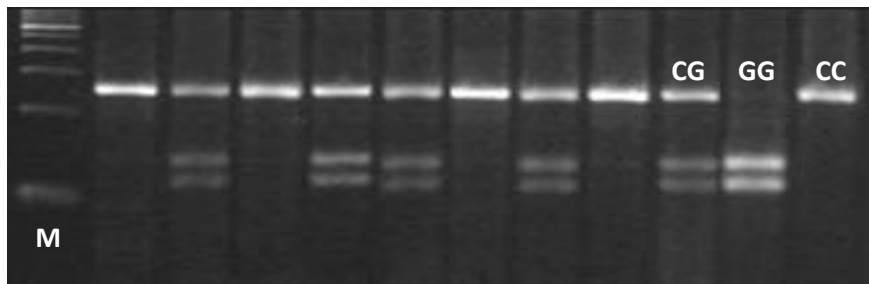


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 4% da reação de PCR-RFLP, onde são visualizados fragmentos correspondentes aos genótipos CC, CG e GG do SNP C-11377G do gene da adiponectina (M= marcador de peso molecular ladder 100 pb).



## 5 RESULTADOS

Foram processadas 3.832 amostras de DNA genômico da população-alvo, as quais foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. De todas as amostras analisadas, somente três delas apresentaram resultados negativos para a reação de amplificação, provavelmente por degradação da amostra de DNA. Uma das amostras teve de ser retirada do banco, pois foi constatado, posteriormente, que o indivíduo não pertencia à coorte de 1982. O total de amostras analisado foi, portanto, de 3.828 indivíduos.

A distribuição dos genótipos relativos ao SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, na população estudada, encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 3,314$ ;  $p < 0,05$ ), com C sendo o alelo de maior frequência (0,76%), também dito alelo selvagem e, G o alelo de menor frequência (0,24%), ou alelo mutado (Fig. 3). A frequência genotípica observada na população de estudo foi de 57,9% para o genótipo CC, de 36,9% para o genótipo CG e de 5,2% para o genótipo GG (Fig. 4).

Ainda foi feita a análise da frequência genotípica estratificada por sexo na população-alvo. De um total de 1.922 homens, observou-se que 57,3% apresentaram genótipo CC; 37,4% genótipo CG; e 5,3% genótipo GG. Dentre as mulheres 58,6% apresentaram genótipo CC; 36,5% genótipo CG; e 4,9% genótipo GG, de um total de 1.906 mulheres (Fig. 5).

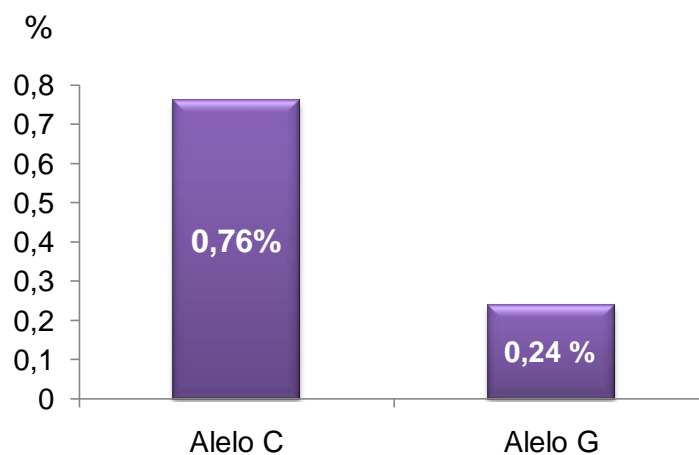


Figura 3: Frequência alélica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em 3.828 indivíduos da coorte de 1982.

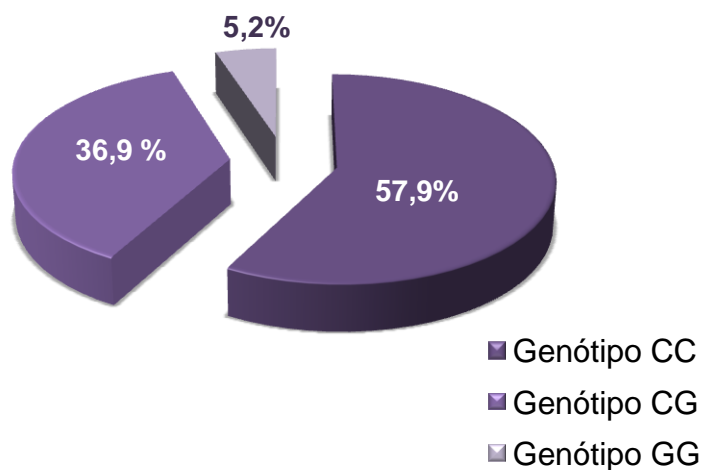


Figura 4: Frequência genotípica do SNP C-11377G do gene da adiponectina em 3.828 indivíduos da coorte de 1982.

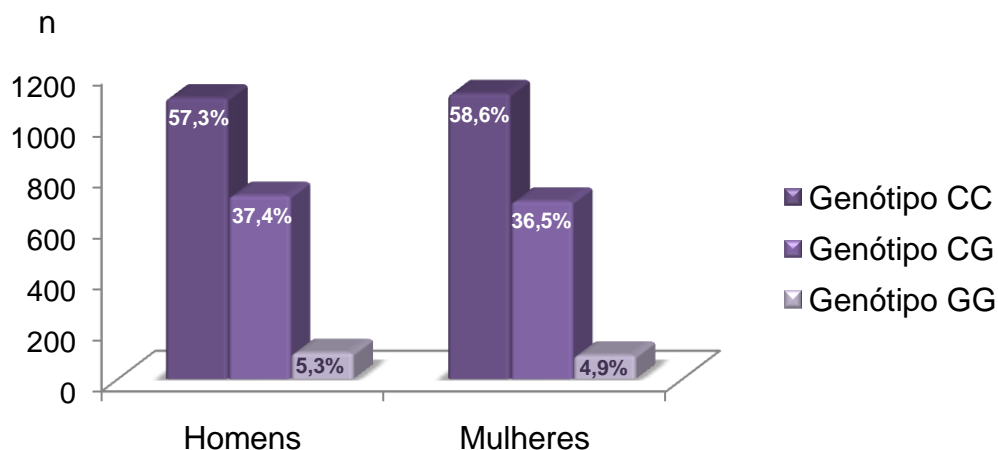


Figura 5: Análise estratificada por sexo da distribuição dos genótipos do SNP C-11377G do gene da adiponectina entre homens (n=1.922) e mulheres (n=1906) da coorte de 1982.

Dados genéticos da coorte de 1982 foram associados às seguintes variáveis clínicas: glicemia da polpa digital, triglicerídeos, colesterol-HDL, pressão sistólica, pressão diastólica, circunferência da cintura e IMC (Tab. 1).

Os resultados apontaram o genótipo GG no SNP C-11377G associado ao aumento da circunferência da cintura (CC =  $78,22 \pm 10,78$ ; CG =  $78,02 \pm 10,88$ ; GG =  $80,11 \pm 11,91$ ;  $p= 0,042$ ) nos indivíduos da coorte de 1982. Foi também observado que os níveis de triglicerídeos e o IMC dos indivíduos GG são maiores, porém sem representar uma diferença significativa entre os outros genótipos ( $p= 0,830$  e  $0,523$ , respectivamente). Por outro lado, o SNP C-11377G não foi associado a nenhuma das demais variáveis de interesse investigadas.

Na análise estratificada por sexo, não foi observada associação significativa entre o SNP C-11377G e as variáveis investigadas (Tab. 2).

Tabela 1: Comparação das médias das variáveis clínicas entre os três genótipos CC, CG e GG do SNP C-11377G do gene da adiponectina em indivíduos da coorte de 1982.

Variáveis Clínicas	Média ( $\pm$ DP)			P
	CC (n=2218)	CG (n=1414)	GG (n=196)	
Glicemia da Polpa Digital (mg/dL)	97,43 ( $\pm$ 15,45)	96,86 ( $\pm$ 14,58)	98,36 ( $\pm$ 14,83)	0,320
Triglicrídeos (mg/dL)	106,17 ( $\pm$ 68,90)	106,98 ( $\pm$ 70,00)	109,10 ( $\pm$ 74,76)	0,826
Colesterol-HDL (mg/dL)	55,66 ( $\pm$ 13,26)	55,25 ( $\pm$ 12,47)	54,98 ( $\pm$ 13,35)	0,561
Pressão Sistólica Média (mmHg)	117,60 ( $\pm$ 14,98)	117,0 ( $\pm$ 14,77)	116,60 ( $\pm$ 16,76)	0,397
Pressão Diastólica Média (mmHg)	73,49 ( $\pm$ 11,55)	73,19 ( $\pm$ 11,12)	73,21 ( $\pm$ 12,24)	0,729
Circunferência da Cintura (cm)	78,22 ( $\pm$ 10,79)	78,02 ( $\pm$ 10,89)	80,11 ( $\pm$ 11,91)	0,042
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23,70 ( $\pm$ 4,35)	23,63 ( $\pm$ 4,41)	24,01 ( $\pm$ 4,39)	0,523

Tabela 2: Comparação das médias das variáveis clínicas em homens e mulheres da coorte de 1982 distribuídos segundo os genótipos CC, CG e GG do SNP C-11377G do gene da adiponectina.

Variáveis Clínicas		Média ( $\pm$ DP)			p
		CC	CG	GG	
Glicemia da Polpa Digital (mg/dL)	Homens	100,22 ( $\pm$ 16,33)	99,25 ( $\pm$ 14,60)	99,26 ( $\pm$ 14,68)	0,418
	Mulheres	94,73 ( $\pm$ 14,02)	94,40 ( $\pm$ 14,15)	97,38 ( $\pm$ 15,01)	0,162
Triglicrídios (mg/dL)	Homens	113,82 ( $\pm$ 77,39)	119,61 ( $\pm$ 83,01)	119,04 ( $\pm$ 91,04)	0,302
	Mulheres	98,63 ( $\pm$ 58,44)	93,96 ( $\pm$ 50,22)	98,08 ( $\pm$ 49,22)	0,210
Colesterol-HDL (mg/dL)	Homens	51,61 ( $\pm$ 11,47)	51,33 ( $\pm$ 10,45)	52,72 ( $\pm$ 12,94)	0,485
	Mulheres	59,63 ( $\pm$ 13,68)	59,28 ( $\pm$ 13,08)	57,48 ( $\pm$ 13,42)	0,318
Pressão Sistólica (mmHg)	Homens	123,63 ( $\pm$ 14,26)	123,03 ( $\pm$ 14,33)	122,91 ( $\pm$ 15,98)	0,650
	Mulheres	111,65 ( $\pm$ 13,19)	110,79 ( $\pm$ 12,47)	109,59 ( $\pm$ 14,75)	0,178
Pressão Diastólica (mmHg)	Homens	75,63 ( $\pm$ 11,80)	75,23 ( $\pm$ 11,31)	75,94 ( $\pm$ 12,07)	0,744
	Mulheres	71,38 ( $\pm$ 10,90)	71,06 ( $\pm$ 10,51)	70,17 ( $\pm$ 11,75)	0,530
Circunferência da Cintura (cm)	Homens	80,72 ( $\pm$ 9,8)	80,81 ( $\pm$ 10,35)	80,63 ( $\pm$ 11,39)	0,183
	Mulheres	75,76 ( $\pm$ 11,11)	75,14 ( $\pm$ 10,67)	77,31 ( $\pm$ 11,90)	0,157
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Homens	23,76 ( $\pm$ 3,98)	23,81 ( $\pm$ 4,22)	24,04 ( $\pm$ 4,06)	0,796
	Mulheres	23,63 ( $\pm$ 4,69)	23,44 ( $\pm$ 4,59)	23,97 ( $\pm$ 4,73)	0,469

## 6 DISCUSSÃO

As frequências alélicas e genóticas para o SNP C-11377G do gene da adiponectina descritas no presente estudo foram semelhantes às descritas em outras populações (BOUATIA-NAJI et al., 2006; JANG et al., 2008).

A associação significativa do genótipo GG do SNP C-11377G com aumento da medida da circunferência da cintura sugere que os indivíduos homocigotos GG apresentam maior predisposição à obesidade abdominal, um importante fator de risco para a Síndrome Metabólica.

Nosso achado é concordante com os estudos que demonstraram ser o alelo G do SNP C-11377G associado ao aumento de risco à DM2, a baixos níveis de adiponectina, ao aumento das taxas de glicemia de jejum, de insulina de jejum e de triglicerídeos (VASSEUR et al., 2005; PETRONE et al., 2006). Entretanto, é discordante daqueles estudos que demonstraram uma associação do alelo C com fatores de risco para a SM, como o realizado por Gu et al. (2004) que identificou uma associação do alelo C com aumento do IMC, assim como, aquele realizado por Bouatia-Naji et al. (2006) que associou o alelo C com maior risco de obesidade infantil e adulta.

Pelo acima exposto, pode ser observado que, a literatura sobre o tema é escassa e, entre os poucos estudos publicados, não há reprodutibilidade de resultados. Não há uma concordância em relação ao alelo de risco presente no SNP C-11377G do gene da adiponectina. Uma das prováveis causas dessa discrepância é decorrente das diferenças no *background* genético das populações estudadas.

Outro aspecto importante a destacar é o fato de que a coorte de 1982 é constituída por adultos que, na época do último acompanhamento, tinham 22-23 anos de idade. Essa é uma população jovem comparada àquelas investigadas em outros estudos, cuja média de idade é superior a 40 anos. É possível que o maior número de associações descritas em populações mais velhas seja decorrente do fato de que fatores de risco aumentam com a idade.

Por outro lado, é preciso chamar a atenção que já foi descrita uma prevalência de Síndrome Metabólica da ordem de 7,8%, segundo os critérios

do NCEP-ATPIII, numa sub-amostra de 1.400 adultos jovens da coorte de 1982. Além disso, a obesidade foi apontada como o principal fator de risco para a SM, principalmente entre os homens com sobrepeso e obesos (SILVEIRA, 2008).

Por fim, cabe salientar que em doenças complexas estão envolvidos muitos genes, os quais contribuem com pequena fração da suscetibilidade à doença. Além disso, fatores ambientais podem modificar a interação gene-doença.

Portanto, pretendemos dar continuidade ao estudo investigando outros polimorfismos do gene da adiponectina, bem como, avaliando os seus haplótipos, com a finalidade de identificar marcadores genéticos associados à Síndrome Metabólica em uma população de adultos jovens brasileiros.

## 7 CONCLUSÕES

A frequência alélica do SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, descrita na amostra de 3.828 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS, foi demonstrada ser de 0,76 para o alelo C (selvagem) e 0,24 para o alelo G (mutado).

A frequência de distribuição dos genótipos do SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, descrita na amostra de 3.828 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS, foi demonstrada ser de: 57,9% para o homozigoto GG; 36,9% para o heterozigoto CG; e 5,2% para o homozigoto CC.

A distribuição dos genótipos do SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, na população estudada, encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A frequência de distribuição dos genótipos do SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, descrita na amostra de 1.921 homens pertencentes à coorte de 1982, Pelotas-RS, foi demonstrada ser de: 57,3% para o homozigoto CC; 37,4% para o heterozigoto CG; e 5,3% para o homozigoto GG.

A frequência de distribuição dos genótipos do SNP C-11377G da região promotora do gene da adiponectina, descrita na amostra de 1.906 mulheres pertencentes à coorte de 1982, Pelotas-RS, foi demonstrada ser de 58,6% para o homozigoto CC; 36,5% para o heterozigoto CG; e 4,9% para o homozigoto GG.

O genótipo GG do SNP C-11377G apresentou associação significativa com o aumento da circunferência da cintura ( $p= 0,042$ ) na amostra estudada que incluiu indivíduos da coorte de 1982, Pelotas, RS.



## Referências

AHIMA, R.; FLIER, J. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends of Endocrinology Metabolism** v.11, n.8, p.327–332, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care** v.29, supl.1, jan.2006.

ARITA, Y.; SHINJI, K.; OUCHI, N.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, K.; MIYAGAWA, J.; HOTTA, K.; SHIMOMURA, I.; NAKAMURA, T.; MIYAOKA, K.; KURIYAMA, H.; NISHIDA, M.; YAMASHITA, S.; OKUBO, K.; MATSUBARA, K.; MARAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein Adiponectin, in Obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.257, n.1, p.79-83, jan.1999.

BERG, A.H.; COMBS, T.P.; SCHERER, P.E. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinology Metabolism** v.13, n.8, p-84-89, ago.2002.

BOUATIA-NAJI, N.; MEYRE, D.; LOBBENS, S.; SÉRON, K.; FUMERON, F.; BALKAU, B.; HEUDE, B.; JOURET, B.; SCHERER, P.; DINA, C.; WEILL, J.; FROGUEL, P. ACDC/Adiponectin Polymorphism Are Associated With Severe Childhood and Adult Obesity. **Diabetes** v.55, p.545-550, fev.2006.

BRÅKENHJELM, E.; VEITONMÄKI, N.; CAO, R.; KIHARA, S.; MATSUZAWA, Y.; ZHIVOTOVSKY, B.; FUNAHASHI, T.; CAO, Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.101, n.8, fev.2004.

BROOKS, Anthony. The essence of SNPs. **Gene** v.234, p.177–186, mai.1999.

CHANDRAN, M.; PHILLIPS, S.; CIARALDI, T.; HENRY, R. Adiponectin: More than Just Another Cell Hormone? **Diabetes Care** v.26, n.8, ago.2003

DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I.; PANKOW, J.S.; BANG, H.; COUPER, D.; BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R.C.; HEISS, G. Adiponectin and the

development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes** v.53, p.2473–2478, set.2004.

FILIPPI, E.; SENTINELLI, F.; TRISCHITTA, V.; ROMEO, S.; ARCA, M.; LEONETTI, F.; DI MARIO, U.; BARONI, M.G. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. **European Journal of Human Genetic** v.12, p.199–205, 2004

FUMERON, F.; AUBERT, R.; SIDDIQ, A.; BETOULLE, D.; PEAN, F.; HADJADJ, S.; TICHET, J.; WILPART, E.; CHESNIER, M.C.; BALKAU, B.; FROGUEL, P.; MARRE, M. 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, p.1150–1157, abr.2004.

GRUNDY, S.M.; BREWER, H.B.; CLEEMAN, J.I.; SMITH, S.C.; LEFANT JR.C. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. **Circulation** v.109, p.433-438, 2004.

GRUNDY, S.M.; HANSEN, B.; SMITH, S.C.; CLEEMAN, J.; KAHN, R.A. Clinical Management of Metabolic Syndrome: Report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management. **Circulation** v.109, p.551-556, fev.2004.

GU, H.F.; ABULAITI, A.; ÖSTENSON, C.; HUMPHREYS, K.; WAHLESTEDT, C.; BROOKES A.J.; EFENDIC, S. Single Nucleotide Polymorphisms in the Proximal Promoter Region of the Adiponectin (*APM1*) Gene Are Associated With Type 2 Diabetes in Swedish Caucasians. **Diabetes**. v.53, supl1, fev.2004.

HARA, K.; BOUTIN, P.; MORI, Y.; TOBE, K.; DINA, C.; YASUDA, K.; YAMAUCHI, T.; OTABE, S.; OKADA, T.; ETO, K.; KADOWAKI, H.; HAGURA, R.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; NAGAI, R.; TANIYAMA, M.; MATSUBARA, K.; YODA, M.; NAKANO, Y.; KIMURA, S.; TOMITA, M.; KIMURA, S.; ITO, C.; FROGUEL, P.; KADOWAKI, T. Genetic variation in the gene encoding

adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. **Diabetes** v.51, p.536–540, fev.2002.

HEID, I.M.; WAGNER, S.A.; GOHLKE, H.; IGLSEDER, B.; MUELLER, J.C.; CIP, P.; LADURNER, G.; REITER, R.; STADLMAYR, A.; MACKEVICS, V.; ILLIG, T.; KRONENBERG, F.; PAULWEBER, B. 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, p.375–384, fev.2006.

HOSODA, K.; MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; MIYAWAKI, T.; HIRAOKA, J.; HANAOKA, I.; YASUNO, A.; NOMURA, T.; FUJISAWA, Y.; YOSHIMASA, Y.; NISHI, S.; YAMORI, Y.; NAKAO, K. Development of Radioimmunoassay for Human Leptin. **Biochemical And Biophysical Research Communications** v.221, n.2, p.234–239, 1996.

HOTAMISLIGIL, G.S.; MURRAY, D.L.; CHOY, L.N.; SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 91, p.4854-4858, mar.1994.

HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; ARITA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUDA, M.; OKAMOTO, Y.; IWAHASHI, H.; KURIYAMA, H.; OUCHI, N.; MAEDA, K.; NISHIDA, M.; KIHARA, S.; SAKAI, N.; NAKAJIMA, T.; HASEGAWA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y. Plasma concentration of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetes Patients. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology** v.20, p.1595-1599, jun.2000.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B.M. AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity. **The Journal Of Biological Chemistry** v.271, n.18, edição de 3 de maio, p.10697–10703, 1996.

IWASHIMA, Y.; KATSUYA, T.; ISHIKAWA, K.; OUCHI, N.; OHISHI, M.; SUGIMOTO, K.; FU, Y.; MOTONE, M.; YAMAMOTO, K.; MATSUO, A.; OHASHI, K.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; RAKUGI, H.; MATSUZAWA, Y.; OGIHARA, T. Hypoadiponectinemia Is an Independent Risk Factor for Hypertension. **Hypertension** v.43, p.1318-1323, mai.2004.

JANG, Y.; CHAE, J.S.; KOH, S.J.; HYUN, Y.J.; KIM, J.Y.; JEONG, Y.J.; PARK, S.; AHN, C.M.; LEE, J.H. The Influence of the adiponectin gene on adiponectin concentrations and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. **Clinica Chimica Acta** v.391, p.85-90, fev.2008.

KAZUMI, T.; KAWAGUCHI, A.; HIRANO, T.; YOSHINO, G. Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. **Metabolism** v.53, n.5, p.589–593, mai.2004.

KISSEBAH, A.H.; SONNENBERG, G.E.; MYKLEBUST, J.; GOLDSTEIN, M.; BROMAN, K.; JAMES, R.G.; MARKS, J.A.; KRAKOWER, G.R.; JACOB, H.J.; WEBER, J.; MARTIN, L.; BLANGERO, J.; COMUZZIE, A.G. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.97, n.26, p.14478-14483, dez.2000.

KUMADA, M.; KIHARA, S.; SUMITSUJI, S.; KAWAMOTO, T.; MATSUMOTO, S.; OUCHI, N.; ARITA, Y.; OKAMOTO, Y.; SHIMOMURA, I.; HIRAOKA, H.; NAKAMURA, T.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology** v.23, p.85–89, jan.2003.

KYRIAKOU, T.; COLLINS, L.J.; SPENCER-JONES, N.J.; MALCOLM, C.; WANG, X.; SNIDER, H.; SWAMINATHAN, R.; BURLING, K.A.; HART, D.J.; SPECTOR, T.D.; O'DELL, S.D. Adiponectin gene *ADIPOQ* SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. **Journal of Human Genetic** v.53, p.718–727, jun.2008.

MAEDA, K.; OKUBO, K.; SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; MATSUBARA, K. 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, p. 286–289 mar.1996.

MENZAGHI, C.; ERCOLINO, T.; DI PAOLA, R.; BERG, A.H.; WARRAM, J.H.; SCHERER, P.E.; TRISCHITTA, V.; DORIA, A. A Haplotype at the Adiponectin Locus Is Associated With Obesity and Other Features of the Insulin Resistance Syndrome. **Diabetes** v.51, p.2306–2312, jul.2002.

MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research** v.6, p.1215, 1988.

NAKANO, Y.; TOBE, T.; CHOI-MIURA, N.; MAZDA, T.; TOMITA, M. Isolation and Characterization of GBP28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma. **Journal of Biochemistry** v.120, n.4, p. 803-812, jun.1996.

Organização Mundial da Saúde. Disponível em:

<[http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/)> Acesso em: 04 fev. 2010.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; OKAMOTO, Y.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, T. Novel Modulator for Endothelial Adhesion Molecules : Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin. **Circulation** v.100, p. 2473-2476, dez.1999.

OUCHI, N.; OHISHI, M.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; NAKAMURA, T.; NAGARETANI, H.; KUMADA, M.; OHASHI, K.; OKAMOTO, Y.; NISHIZAWA, H.; KISHIDA, K.; MAEDA, N.; NAGASAWA, A.; KOBAYASHI, H.; HIRAOKA, H.; KOMAI, N.; KAIBE, M.; RAKUGI, H.; OGIHARA, T.; MATSUZAWA, Y. Association of Hypoadiponectinemia With Impaired Vasoreactivity. **Hypertension** v.42, p.231-234, set.2003.

PETRONE, A.; ZAVARELLA, S.; CAIAZZO, A.; LETO, G.; SPOLETINI, M.; POTENZIANI, S.; OSBORN, J.; VANIA, A.; BUZZETTI R. The Promoter Region

of the Adiponectin Gene is a Determinant in Modulating Insulin Sensitivity in Childhood Obesity. **Obesity** v.14, n.9, p.1498-1504, set.2006.

POLLIN, T.I.; TANNER, K.; O'CONNELL, J.R.; OTT, S.H.; DAMCOTT, C.M.; SHULDINER, A.R.; MCLENITHAN, J.C.; MITCHELL, B.D. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene. **Diabetes** v.54, p.268–274, jan.2005.

QI, L.; LI, T.; RIMM, E.; ZHANG, C.; RIFAI, N.; HUNTER, D.; DORIA, A.; HU, F.B. The 276 Polymorphism of the APM1 Gene, Plasma Adiponectin Concentration, and Cardiovascular Risk in Diabetic Men. **Diabetes** v. 54, p.1607–1610, mai.2005.

QI, L.; DORIA, A.; MANSON, J.E.; MEIGS, J.B.; HUNTER, D.; MANTZOROS, C.S.; HU, F.B. Adiponectin Genetic Variability, Plasma Adiponectin, and Cardiovascular Risk in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes** v.55, p.1512–1516, mai.2006.

REAVEN, G.M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. **Diabetes** v.37, p.1595, 1988

SCHERER, P.E, WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LODISH, H.F. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. **The Journal Of Biological Chemistry** v.270, n.45, edição de 10 de novembro, p. 26746–26749, 1995.

SCHULZE, M.B.; RIMM, B.E.; SHAI, I.; RIFAI, N.; HU, F.B. Relationship Between Adiponectin and Glycemic Control, Blood Lipids, and Inflammatory Markers in Men With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care** v.27, n.7, p.1680–1687, jul.2004.

SCHWARZ, P.E.H.; TOWERS, G.W.; VAN DER MERWE, A.; PEREZ-PEREZ, L.; RHEEDER, P.; SCHULZE, J.; BORNSTEIN, S.R.; LICINIO, J.; WONG, M.L.; SCHUTTE, A.E.; OLCKERS, A. Global meta-analysis of the C-11377G alteration in the ADIPOQ gene indicates the presence of population-specific effects: challenge for global health initiatives. **The Pharmacogenomics Journal** v.9, p.42–48, mar.2009.

SILVEIRA, Vera Maria Freitas. **Síndrome metabólica, condições de nascimento e amamentação na coorte de 1982 em Pelotas, RS, Brasil.** 2008. 115f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

STUMVOLL, M.; TSCHRITTER, O.; FRITSCHÉ, A.; STAIGER, H.; RENN, W.; WEISSER, M.; MACHICAO, F.; HÄRING, H. Association of the T-G Polymorphism in Adiponectin (Exon 2) With Obesity and Insulin Sensitivity - Interaction With Family History of Type 2 Diabetes. **Diabetes** v.51, p.37–41, jan.2002

THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. **Adult Treatment Panel III, Final Report**, 2., 2002, *Circulation* v.106, 2002. 280p.

VASSEUR, F.; HELBECQUE, N.; DINA, C.; LOBBENS, S.; DELANNOY, V.; GAGET, S.; BOUTIN, P.; VAXILLAIRE, M.; LEPRÊTRE, F.; DUPONT, S.; HARA, K.; CLÉMENT, K.; BIHAIN, B.; KADOWAKI, T.; FROGUEL, P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. **Human Molecular Genetic** v.11, n.21, p.2607–2614, 2002.

VASSEUR, F.; HELBECQUE, N.; LOBBENS, S.; VASSEUR-DELANNOY, V.; DINA, C.; CLÉMENT, K.; BOUTIN, P.; KADOWAKI, T.; SCHERER, P.E.; FROGUEL, P. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. **Diabetologia** v.48, p.892–899, abr.2005.

VICTORA, C.G.; BARROS, F.C.; LIMA, R.C.; BEHAGUE, D.P.; GONÇALVES, H.; HORTA, B.L.; GIGANTE, D.P.; VAUGHAN, J.P. The Pelotas birth cohort study, Rio Grande do Sul, Brazil, 1982-2001. **Cadernos de Saúde Pública** v.19(5), p.1241-56, set-out.2003.

VIONNET, N.; HANI, H.E.; DUPONT, S.; GALLINA, S.; FRANCKE, S.; DOTTE, S.; DE MATOS, F.; DURAND, E.; LEPRÊTRE, F.; LECOEUR, C.; GALLINA, P.; ZEKIRI, L.; DINA, C.; FROGUEL, P. 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 Genetic** v.67, p.1470–1480, 2000.

VOZAROVA DE COURTEN, B.; HANSON, R.L.; FUNAHASHI, T.; LINDSAY, R.S.; MATSUZAWA, Y.; TANAKA, S.; THAMEEM, F.; GRUBER, J.D.; FROGUEL, P.; WOLFORD, JK. Common Polymorphisms in the Adiponectin Gene ACDC Are Not Associated With Diabetes in Pima Indians. **Diabetes** v.54, p.284–289, jan.2005.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; HARA, K.; MORI, Y.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; AKANUMA, Y.; GAVRILOVA, O.; VINSON, C.; REITMAN, M.L.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K.; YODA, M.; NAKANO, Y.; TOBE, K.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; TOMITA, M.; FROGUEL, P.; KADOWAKI, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nature Medicine** v.7, n.8, p.941-946, ago.2001.

WANG, Y.; XU, A.; KNIGHT, C.; XU, L.Y.; COOPER, G.J.S. Hydroxylation and Glycosylation of the Four Conserved Lysine Residues en the Collagenous Domain of Adiponectin. **The Journal of Biological Chemistry** v.277, n.22, edição de 31 de maio, p-19521-19529, 2002.



## **Anexos**

## ANEXO 1: Termo de consentimento livre e pré-informado



Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Medicina

Departamento de Medicina Social

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-INFORMADO

Investigador responsável: Dr. Cesar Gomes Victora  
Departamento de Medicina Social-UFPeL

Concordo em participar do estudo “Saúde dos Jovens Nascidos em Pelotas, RS, em 1982”. Estou ciente de que todas as pessoas nascidas em Pelotas, em 1982, e que residam na cidade participarão voluntariamente do estudo.

**PROCEDIMENTOS:** Fui informado que será coletada uma amostra do meu sangue utilizando material estéril e descartável no procedimento de coleta. No meu sangue será medido o nível de glicose, além de ser extraído DNA das células do meu sangue. O DNA e o sangue serão armazenados em um arquivo, devidamente cadastrados e mantidos pelo Centro de Epidemiologia da UFPeL, para que no futuro possam ser analisados com o objetivo de se estudar as doenças mais comuns na nossa população. Será também verificado qual é o grupo sanguíneo do meu sangue. Fui informado que as informações referentes ao meu DNA e ao meu sangue não serão repassadas a outras pessoas sem a minha autorização.

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES À COLETA DE SANGUE:** Fui informado de que a coleta de sangue será realizada com material descartável, portanto, sem riscos de contaminação. Também fui avisado que em algumas pessoas, pode aparecer algum hematoma que desaparecerá no prazo máximo de uma semana.

**BENEFÍCIOS:** Os resultados dos exames de glicose e tipagem sanguínea serão fornecidos por escrito logo após sua realização, ainda na minha presença.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** Como já me foi dito, minha participação nesse estudo será voluntária, e poderei interrompê-la a qualquer momento.

**DESPESAS:** Eu não terei que pagar por nenhum dos procedimentos.

**CONFIDENCIALIDADE:** Estou ciente de que minha identidade permanecerá confidencial durante todas as etapas do estudo.

**CONSENTIMENTO:** Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas nesse formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam a todas as minhas perguntas até minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar o estudo. Este formulário de consentimento pré-informado será assinado por mim e arquivado pela instituição responsável pela pesquisa.

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_/\_\_\_/2005

**DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR:** Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O jovem compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

ASSINATURA DO INVESTIGADOR: