

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E GENOTÍPICA DO SNP C-11377G DO GENE DA ADIPONECTINA EM INDIVÍDUOS DA COORTE DE 1982

**LOPES, Patrícia Tassinari<sup>1</sup>; SILVA, Liziane Pereira<sup>2</sup>; WAGNER, Mônica<sup>1</sup>; NUNES, Ana Paula<sup>3</sup>; MINTEN, Gicele da Costa<sup>3</sup>; GIGANTE, Denise Petrucci<sup>3</sup>; HORTA, Bernardo Lessa<sup>3</sup>; OLIVEIRA, Isabel Oliveira<sup>4</sup>**

1- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Acadêmica de Ciências Biológicas, Laboratório de Fisiologia Molecular, DFF, Pelotas, RS-Brasil. 2- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Bióloga, Laboratório de Fisiologia Molecular, DFF, Pelotas, RS-Brasil. 3- Universidade Federal de Pelotas, Centro de Pesquisas Epidemiológicas. 4- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Professor adjunto, Laboratório de Fisiologia Molecular, DFF, Pelotas, RS-Brasil.  
tassinari.patricia@gmail.com

### 1) INTRODUÇÃO

A adiponectina é uma proteína secretada em abundância pelo tecido adiposo, sendo também conhecida como Acrp30, Apm1, AdipoQ ou GBP28 (Kadowaki *et al.*, 2006). A adiponectina promove maior sensibilidade à insulina, além de possuir ação antiinflamatória, anti-aterogênica, e ter um importante papel no metabolismo lipídico e glicídico (Ferrarezi *et al.*, 2007). Trata-se de uma proteína de aproximadamente 30 KDa cuja concentração plasmática em indivíduos saudáveis se encontra na faixa de 1,9 a 17 µg/mL (Berg *et al.*, 2002). O gene da adiponectina humana é bastante polimórfico (Pollin *et al.*, 2005) e está localizado no cromossomo 3q27, locus ligado à suscetibilidade à Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Kissebah *et al.*, 2000), Síndrome Metabólica (SM) e doenças cardiovasculares (Kyriakou *et al.*, 2008).

A coorte de 1982 representa um estudo de Ciclo Vital incluindo os indivíduos nascidos nos hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1982, num total de 5.914 crianças nascidas vivas (Victoria *et al.*, 2003). A importância de se realizar estudos de coorte reside no fato de que tal metodologia permite estudar a influência de exposições precoces sobre a determinação das doenças da vida adulta.

Vários polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism\_SNP) do gene que codifica a adiponectina, têm sido descritos e associados à obesidade abdominal (Fumeron *et al.*, 2004), à DM2 (Hara *et al.*, 2002), à resistência insulínica e SM (Vasseur *et al.*, 2002). Em relação ao SNP C-11377G (rs 266729) da região promotora do gene da adiponectina,

onde ocorre a troca de uma base C por uma G, alguns estudos demonstraram associação do alelo C com maior índice de massa corporal (IMC) (Gu *et al.*, 2004) e maior risco à obesidade (Bouatia-Naji *et al.*, 2006), enquanto outros relacionaram o alelo G com baixos níveis de adiponectina (Jang *et al.*, 2008).

## 2) MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Fisiologia Molecular, localizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

A população-alvo de estudo compreende 2.221 indivíduos pertencentes à coorte de 1982, onde todos os participantes assinaram o termo de consentimento de coleta de sangue, no qual estava salientada a utilização das amostras em estudos científicos. O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo o protocolo de Miller e colaboradores (1988). A região de interesse do gene foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, sendo a seguir feita a restrição enzimática para a avaliação de polimorfismos no comprimento de fragmentos (PCR-RFLP *Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) a fim de analisar o polimorfismo de nucleotídeo único -11377 (C/G) da região promotora do gene da adiponectina. A reação foi padronizada em 35 ciclos com a temperatura de anelamento de 57°C para amplificação de uma sequência de 251 pb, utilizando os *primers forward* (ACTTGCCCTGCCTCTGTCTG) e *reverse* (GCCTGGAGAACTGGAACGTG). A reação de restrição com a enzima *HhaI* (5'...GCG<sup>□</sup>C...3') da empresa *New England Biolabs* foi padronizada a 37°C durante 2 h, seguida de uma etapa de inativação enzimática a 65°C por 20 minutos. A corrida eletroforética, na voltagem de 125 mV durante 1h 20 min, foi realizada em gel de agarose 4% usando Gel Red® como corante intercalante. Através de um sistema de captação de imagem acoplado a um transiluminador foram visualizadas as bandas no gel. A genotipagem foi feita da seguinte forma: uma banda de 251 pb correspondente ao homocigoto 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 CG.

A genotipagem foi realizada por dois investigadores em separado. Da mesma forma, foi realizada a digitação dupla do banco de dados sendo feita, a seguir, uma comparação (*merge*) dos bancos e obtenção de um banco final corrigido. Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste do Qui-quadrado, usando o programa SPSS.

### 3) RESULTADOS E DISCUSSÕES

A população em estudo apresentou uma frequência alélica de 0,77 para o alelo C e de 0,23 para o alelo G. A frequência genotípica da população é de 59% para o genótipo CC, 36% para o genótipo CG e 5% para o genótipo GG. Não foram identificadas diferenças significativas na frequência alélica e genotípica quando comparados os gêneros feminino e masculino. De um total de 2.221 indivíduos estudados encontramos 1.308 indivíduos com genótipo CC (620 homens e 688 mulheres), 798 com genótipo CG (393 homens e 405 mulheres) e 115 indivíduos de genótipo GG (53 homens e 62 mulheres). A descrição das frequências alélicas e genotípicas do SNP C-11377G em indivíduos da coorte de 1982 constitui um dado importante a ser acrescido ao painel mundial de avaliação da distribuição dos polimorfismos do gene da adiponectina e suas contribuições aos mecanismos fisiopatológicos que levam à resistência à insulina, SM e à DM2.

### 4) CONCLUSÕES

A população em estudo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com frequência alélica de 0,77 para o alelo C e de 0,23 para o alelo G e frequência genotípica de 59% para o genótipo CC, 36% para o genótipo CG e 5% para o genótipo GG. Pretende-se dar continuidade ao estudo realizando a genotipagem de todos os indivíduos da coorte de 1982 que coletaram amostras de sangue para extração de DNA.

### 5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERG AH, COMBS TP, SCHERER PE. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinology Metabolism**, 2002, 13, p. 84-9.

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**, 2006, 55, p. 545-550.

FERRAREZI D, CHEURFA N, REIS A, FUMERON F, VELHO G. Adiponectin Gene and Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetic Patients: A Review of Evidences. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 2007 51/2, p. 153-159.

FUMERON F, AUBERT R, SIDDIQ A, BETOULLE D, PEAN F, HADJADJ S, TICHET J, WILPART E, CHESNIER MC, 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**, 2004, 53, p. 1150–1157.

GU HF, Abulaiti A, Östenson C, Humphreys K, Wahlestedt C, Brookes AJ, 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**, 2004, 53, suppl1.

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**, 2002, 51, p. 536–540.

JANG Y, Chae J, Koh SJ, Hyun YJ, Kim JY, Jeong YJ, Park S, Ahn C, Lee JH. The influence of the adiponectin gene on adiponectin concentration and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. **Clinica Chimica Acta**, 2008, 391, p. 85-90.

KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, HARA K, UEKI K, TOBE K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, 2006, 116, p. 1784-1792.

KISSEBAH AH, SONNENBERG GE, MYKLEBUST J, GOLDSTEIN M, BROMAN K, JAMES RG, MARKS JA, KRAKOWER GR, JACOB HJ, WEBER J, MARTIN L, BLANGERO J, COMUZZIE AG. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 2000, 97, p. 14478-83.

KYRIAKOU T, Collins LJ, Spencer-Jones NJ, Malcolm C, Wang X, Snider H, Swaminathan R, Burling KA, Hart DJ, Spector TD, O'Dell, Adiponectin gene *ADIPOQ* SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. **Journal of Human Genetic**, 2008, 53(8), p. 718–727.

MILLER, AS, DYKES, DD, POLESKY, HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, 1988, 6, p.1215.

POLLIN TI, TANNER K, O'CONNELL JR, OTT SH, DAMCOTT CM, SHULDINER AR, MCLENITHAN JC, MITCHELL BD. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the *ADIPOQ* gene. **Diabetes**, 2005, 54, p. 268–274.

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 *ADIPOQ* gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. **Human Molecular Genetic**, 2002, 11, p. 2607–2614.

VICTORA CG, BARROS FC, LIMA RC, BEHAGUE DP, GONÇALVES H, HORTA BL, GIGANTE DP, VAUGHAN JP. The Pelotas birth cohort study, Rio Grande do Sul, Brazil, 1982-2001. **Cadernos de Saúde Pública**, 2003, 19(5), p. 1241-56.