

**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
TOXICOLOGIA APLICADA**



**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS -11391 (G>A) E -11377
(C>G) DO GENE APM1 DA ADIPONECTINA
NA ADIPOSIDADE HUMANA**

ROBERTO CLAURE ARENA DE SOUZA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Toxicologia Aplicada, para
obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADORA: Dra. MARGARETE SUÑÉ MATTEVI

Canoas, julho de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Esta Dissertação foi realizada
no Laboratório de Pesquisa em
Biodiversidade Animal da ULBRA e
financiada pela ULBRA, CNPq e FAPERGS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 O tecido adiposo.....	1
	1.1.1. O adipócito.....	2
	1.1.2. O adipócito como sistema endócrino.....	3
	1.2. A insulina e a aterogenicidade.....	6
	1.3. A leptina.....	8
	1.4. A resistina.....	9
	1.5. O fator de necrose tumoral alfa.....	10
	1.6. A adiponectina.....	11
	1.7. Identificação de genes que contribuem aos sinais de adiposidade	15
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
	3.1. População de estudo.....	20
	3.1.1. Critérios de inclusão.....	20
	3.1.2. Critérios de exclusão.....	20
	3.2. Métodos.....	21
	3.2.1. Análise do DNA.....	21
	3.2.2. Análises bioquímicas.....	23
	3.2.3. Medidas antropométricas.....	24
	3.2.4. Análise estatística dos dados.....	24
	3.2.5. Aspectos éticos.....	25
4	RESULTADOS.....	26
	4.1. Caracterização geral da amostra.....	26
	4.2. Medidas antropométricas.....	28
	4.3. Perfis lipídicos.....	32
5	DISCUSSÃO.....	35
6	APÊNDICE.....	40
	6.1. Questionário e termo de consentimento.....	40
	6.2. Fluxograma de coleta.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

Um grande número de proteínas produzidas pelo tecido adiposo atua no sistema nervoso central, fígado e músculos, coordenando a homeostase energética e o metabolismo de substratos. Alterações na produção destes hormônios (adipocinas), como leptina, TNF α , resistina e adiponectina, parecem ter efeito substancial na adiposidade corporal e sensibilidade à insulina. Os processos envolvidos na regulação da homeostase energética e metabolismo de carboidratos e lipídeos estão bastante ligados à ação desses mediadores neuroendócrinos. A produção destes hormônios adipocitários parece ser regulada por estado nutricional, isto é alimentação, jejum e/ou perda de peso. Um entendimento mais completo das vias bioquímicas e moleculares de regulação da biossíntese das adipocinas pode levar a um manejo mais adequado da obesidade, dislipidemia e resistência à insulina e/ou diabetes tipo 2. Tendo sido encontradas, na literatura, associações entre os níveis de adiponectina no plasma e diferentes fenótipos relacionados à adiposidade, neste trabalho estudamos uma população brasileira com o objetivo de verificar as possíveis associações entre os genótipos dos SNPs -11391G>A e -11377C>G do gene APM1 e estes diferentes fenótipos: índice de massa corporal, e níveis plasmáticos de glicose em jejum e perfil lipídico. A amostra do presente estudo foi constituída de um total de 297 voluntários adultos residentes na cidade de Campo Bom, RS, localizada a cerca de 40 km de Porto Alegre, que compareceram ao Posto de Saúde Bella Aurora do município de Campo Bom, RS (localizado a 45 km da capital, Porto Alegre), ou ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, para realização de exames laboratoriais de rotina, dos quais 71,7% eram do sexo feminino. A genotipagem dos polimorfismos -11391G>A e -11377C>G do gene APM1 foi feita via reação de PCR usando os *primers* descritos mais adiante. Os genótipos foram

determinados pelo emprego das enzimas de restrição *Hpa*II e *Hha*I. As associações genótipo-fenótipo foram analisadas através de análise de variância e os fenótipos foram ajustados para os efeitos das covariáveis através de regressão múltipla. As freqüências dos alelos variantes observadas foram -11391 A = 0,15 e -11377 G = 0,23, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas freqüências foram semelhantes às observadas em estudos de uma população francesa. A análise de associação entre os genótipos e haplótipos para os dois polimorfismos e os fenótipos relacionados à obesidade não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Portanto, até o momento não foi possível detectar um efeito isolado dos polimorfismos APM1 - 11391G>A e -11377C>G sobre fenótipos relacionados à obesidade na população estudada.

ABSTRACT

A large number of proteins produced by the adipose tissue acts on the central nervous system, liver and muscles, directing energy homeostasis and metabolism of substrates. Changes in these hormones (adipokines) such as leptin, TNF α , resistin and adiponectin seem to exert a substantial effect on body adiposity and sensitivity to insulin. The processes involved in the regulation of energy homeostasis and carbohydrate and lipid metabolism are strongly associated to the action of these neuroendocrine mediators. The production of these adipocyte hormones seems to be regulated by nutritional status, that is, food habits, abstention and/or weight loss. A more comprehensive understanding of the biochemical and molecular paths of regulation of adipokines may lead to a more appropriate handling of obesity, dislipidemy and resistance to insulin and/or diabetes type 2. In the light of the associations between adiponectin plasma levels reported in the literature and the different phenotypes linked to adiposity, this study examines a sample of Brazilian individuals in order to verify the likely interactions between genotypes of SNPs 11391G>A and 11377C>G of gene APM1 and these different phenotypes: body mass index and glucose plasmatic levels at fast, and lipid profile. The sample consisted of a total of 297 adult volunteers residing in the city of Campo Bom, RS, Brazil, which is 40 km away from the Porto Alegre (the capital city of the state) and in Porto Alegre. Of the total number of subjects, 71.7% were females. All subjects consulted at the Bella Aurora Health Care Facility in the city of Campo Bom or at the Laboratory of Clinical Examinations of the School of Pharmaceutics, Federal University of the State of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, for routine laboratory examinations. Genotyping of polymorphisms 11391G>A and 11377C>G of the gene APM1 was conducted by PCR using the primers described in this article. Genotypes were determined by the restriction enzymes *Hpa*II e *Hha*I. The genotype/phenotype associations were carried out

by the variance analysis, and the phenotypes were adjusted for the covariance effects by means of multiple regression. The frequencies of varying alleles were observed to be -11391 A = 0.15, and -11377 G = 0.23, and lie within the Hardy-Weinberg equilibrium criteria. These frequencies were similar to those observed in the French population. The analysis of the association between genotypes and the haplotypes for two polymorphisms and the phenotypes related to obesity did not reveal any statistically significant difference. Therefore, up to the moment it has not been possible to identify an isolated effect of APM - 11391G>A and -11377C>G on the phenotypes related to obesity in the population studied.

1. INTRODUÇÃO

A epidemia mundial da obesidade é considerada um problema de saúde pública, já que o excesso e/ou depósitos ectópicos de gordura corporal constituem fator de risco potencial de resistência à insulina, dislipidemia e diabetes mérito do tipo 2 (DM2), levando a uma morbidade cardiovascular prematura e, até mesmo, à morte. Por um grande grupo de evidências, já é sabido que o tecido adiposo não é apenas um reservatório de armazenamento energético, mas também um órgão endócrino ativo, que secreta uma variedade de proteínas que exercem influência notável no metabolismo, afetando a homeostase de glicose e energia (VASSEUR *et al.*, 2002). A análise dos polimorfismos estudados visa identificar se há relação entre as alterações de codificação da proteína adiponectina e a presença de desordens do compartimento adiposo.

1.1. O tecido adiposo

O tecido adiposo é constituído por células originadas dos lipoblastos, os adipócitos, que podem estar agrupados ou isolados. Estas células são constituídas por células originadas dos lipoblastos, que derivam da célula primitiva do tecido mesenquimal (Figura 1). É um tecido conjuntivo especial em que as células não apresentam divisão mas têm diversas funções como termorregulação, reserva energética, preenchimento, proteção contra impacto, modelagem corporal, entre outras. O tecido adiposo pode ser ainda classificado em unilocular ou multilocular conforme a disposição do conteúdo gorduroso do adipócito. A característica marcante deste último reside na sua cor pardacenta, originada pela vascularização exacerbada e grande quantidade de mitocôndrias (ricas em citocromos), sendo mais comum em recém-nascidos e animais hibernantes, porém, com distribuição corporal de forma limitada e aspecto não uniforme.

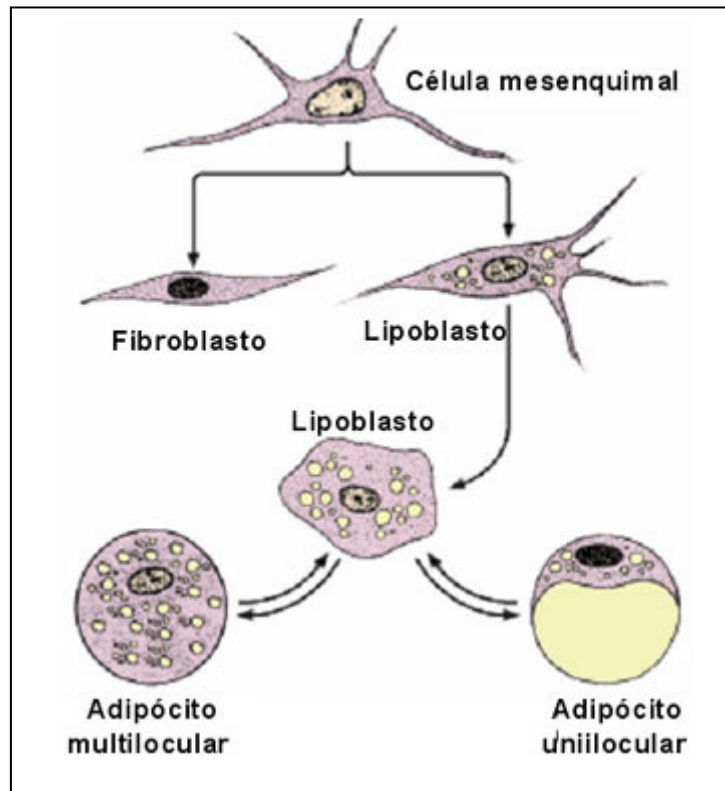


Figura 1 – O esquema mostra a diferenciação celular do adipócito, onde se vê a origem a partir do mesênquima.

1.1.1. O adipócito

No interior da célula adipocitária, há triglicerídeos, que são formados por ácidos graxos e glicerol, constituindo-se em substratos energéticos de reserva, ou seja, na ausência de glicose, estes substratos (lipídeos) são degradados para a produção da energia celular. O adipócito é unilocular ou branco quando a gordura que armazena em seu citoplasma está disposta em apenas uma gotícula, ao contrário do multilocular ou pardo, quando se notam várias gotículas citoplasmáticas. Considerando o acúmulo de lipídeos dentro da célula, independente do número de vacúolos, o adipócito, principalmente no tecido branco, tem seu núcleo comprimido e deslocado contra a parte interna da parede da membrana plasmática (Figura 2).

Os adipócitos multiloculares são menores e poligonais, e sua principal função é a produção de calor (sem produção de ATP), através da ação de uma proteína chamada termoginina. A geração de calor, ocorre pelo transporte de

íons hidrogênio por esta proteína, expressa na membrana interna das mitocôndrias adipocitárias.

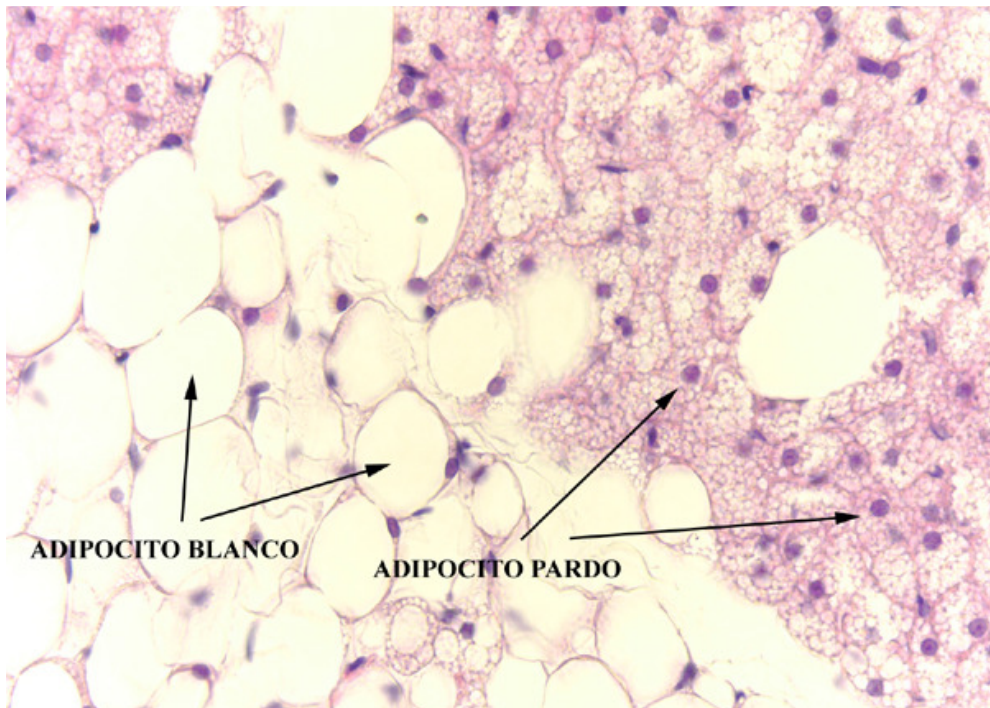


Figura 2 – A lâmina mostra o deslocamento do núcleo celular devido à ocupação pelo volume lipídico. (<http://www2.uerj.br/~micron/atlas/Adiposo/fundam.htm>; acesso em 02/12/2005).

1.1.2. O adipócito como sistema endócrino

Nos últimos anos, o estudo mais aprofundado do metabolismo adipocitário revelou aspectos de grande interesse científico. O tecido adiposo, que era tido apenas como um órgão de armazenamento energético, passou a ser considerado como uma estrutura endócrina, haja vista a produção e liberação de numerosas proteínas e substâncias. Não obstante, os comandos para desenvolvimento da ação endócrina do adipócito podem estar relacionados com a transmissão de impulsos através de terminações nervosas presentes junto à membrana celular, além de outros (Figura 3).

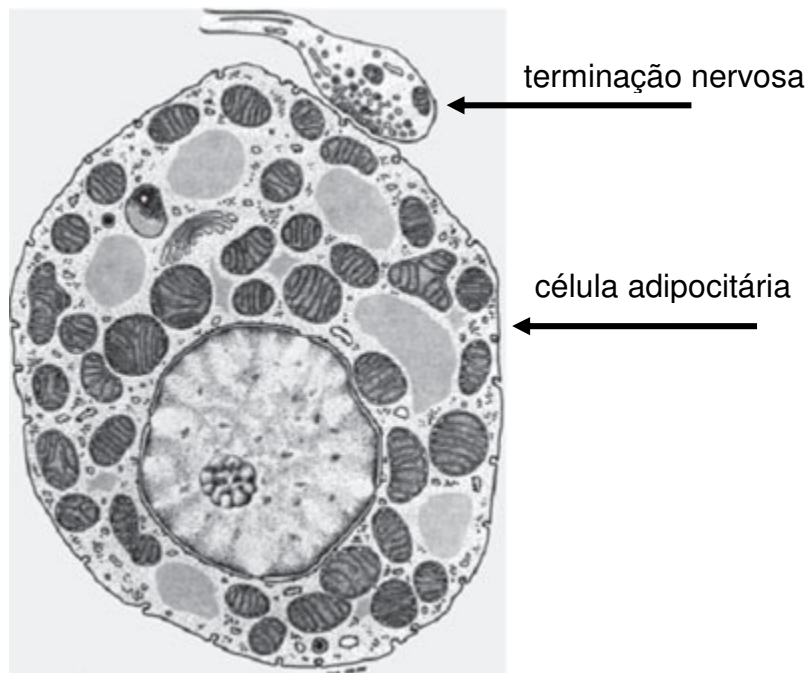


Figura 3 – Desenho mostrando a relação de proximidade e função entre o adipócito e a terminação.

As *adipocinas* parecem estar envolvidas com diversas funções biológicas tais como regulação do ingresso e do gasto energético, do metabolismo lipídico e de glicose, bem como efeitos anti e pró-inflamatórios.

As variações metabólicas e/ou quantitativas das adipocinas estão relacionadas com o desenvolvimento de aterosclerose, hipertensão arterial, dislipidemias, obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2. Tais alterações constituem o elo entre a adiposidade e a patologia. As adiposidades podem estar alteradas em seus diferentes sítios – visceral, subcutâneo (abdominal, glúteo-femural) ou muscular – o que pode demonstrar, portanto, uma associação específica entre processos metabólicos diferenciados e determinadas doenças (MATSUZAWA *et al.*, 2004)

A discussão sobre o papel endócrino e metabólico de cada compartimento adiposo pode contribuir na solução de problemas inerentes às complicações ou ao tratamento das adiposidades (CANCELLO *et al.*, 2004).

Entre as *adipocinas* secretadas pela célula adipocitária, encontram-se, entre outras,

- Leptina
- Resistina
- Fator de Necrose Tumoral
- Adiponectina

A insulina é o regulador crítico de vários aspectos da biologia dos adipócitos, sendo essas células extremamente sensíveis ao hormônio. A insulina promove aumento da síntese de triglicerídeos pelos adipócitos, estimula o transporte de glicose e a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, além de participar da captação de ácidos graxos provenientes de lipoproteínas circulantes (KAHN E FLIER , 2000).

Os efeitos metabólicos da insulina são modulados por uma gama de ações específicas para cada tecido de atuação, envolvendo rápidas mudanças na fosforilação de proteínas (OLEFSKY, 2000). O termo resistência à insulina refere-se à resistência às ações do hormônio na captação, metabolismo ou armazenamento de glicose (SHULMAN GI, 2000).

Para muitos, a resistência à insulina seria o elo entre obesidade e diabetes 2 e, portanto, o regente do “quarteto da morte” (resistência à insulina, obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial).

Na obesidade, a resistência à insulina se caracteriza por redução do transporte e metabolismo da glicose tanto nos adipócitos quanto no músculo esquelético e musculatura lisa vascular, comprometendo também a supressão da produção de glicose pelo fígado (REAVEN, 1995).

Estes defeitos funcionais resultam da sinalização deficiente da insulina nos três tecidos-alvo. Adicionalmente, parece haver, nos adipócitos de obesos, importante comprometimento da regulação do principal mecanismo transportador de glicose, aquele mediado por substâncias específicas da membrana celular (GLUT-4). A ligação da insulina ao seu receptor, a fosforilação do receptor, a atividade da tirosina-quinase e a fosforilação dos substratos de receptores de insulina, também estariam diminuídas. Um mecanismo para explicar os defeitos na sinalização da insulina na obesidade seria o da expressão e ativação de várias proteínas tirosina-fosfatase (PTPs), que desfosforilam resíduos tirosina dos receptores de insulina, interrompendo a

sinalização propagada pelos eventos de fosforilação em tais resíduos (GOLDSTEIN *et al.*, 1998).

A insulina compartilha com a leptina alvos neuroquímicos e anatômicos no hipotálamo medial, sendo considerada um sinal adipostático endógeno, induzindo redução no consumo alimentar (COURTEN *et al.*, 1997).

Tanto a insulina como a leptina parecem ser fatores de risco de moléstia cardiovascular, quando associadas à resistência à insulina. Um exemplo ilustrativo deste fato vem de um estudo populacional realizado em Samoa, onde foi registrada uma alta prevalência de diabetes não insulino-dependente e obesidade que se correlacionaram fortemente aos elevados níveis de leptina (HAYNES *et al.*, 1998).

1.2. A insulina e a aterogenicidade

Uma meta-análise publicada em 1998, que avaliou 12 estudos prospectivos, mostrou que a hiperinsulinemia é um indicador de risco cardiovascular, risco este diretamente relacionado com a formação de placas ateromatosas no endotélio vascular (aterosclerose, aterogenia). Esta relação, ainda que não tivesse sido das mais consistentes, foi mais evidente em indivíduos de meia idade que nos idosos, em brancos mais que em negros, e dependente do tipo de ensaio utilizado para se medir a insulina (RUIGE *et al.*, 1998).

Os efeitos hemodinâmicos da insulina se associam intimamente às suas ações metabólicas. O hormônio é vasodilatador e a captação de glicose depende do fluxo sanguíneo da própria musculatura esquelética (BARON *et al.*, 1993).

Scherrer *et al.* (1994) demonstraram que a vasodilatação, pelo menos em pessoas saudáveis, é dependente do óxido nítrico, sendo atenuada pela administração de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, o *L-NMMA*.

Do ponto de vista de transdução de sinal da insulina, a mediação da vasodilatação é feita pela via fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) (HSUEH, LAW, 1999). Numerosos trabalhos experimentais já evidenciaram que o óxido nítrico

tem propriedades anti-aterogênicas (BARON, 1999), diminui a migração e crescimento de células musculares lisas dos vasos (GARG, HASSID, 1989) e inibe a agregação de plaquetas (RADOMSKI, MONCADA, 1993). Outro mecanismo proposto para explicar as ações vasodilatadoras da insulina seria pela sua intervenção sobre o transporte de cálcio, reduzindo o trânsito intracelular do cátion e diminuindo o cálcio intracelular (SAITO *et al.*, 1993).

Nos estados resistentes à insulina, a vasodilatação por ela modulada estaria comprometida, possivelmente devido à síntese inadequada de óxido nítrico pelo endotélio. Petrie *et al.* (1996) descreveram uma relação direta entre a insensibilidade à insulina e a síntese de óxido nítrico em indivíduos saudáveis do sexo masculino. Baron *et al.* (1993), anteriormente, já haviam relatado relação inversa entre o aumento do fluxo sanguíneo de membros inferiores em resposta à insulina e a pressão arterial média basal.

Em 1996, foi publicado o resultado do Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS), realizado em 1.400 indivíduos, que mostrou significativa associação negativa entre a sensibilidade à insulina e a espessura mio-intimal da carótida, provável indicador da presença de coronaroesclerose (HOWARD, *et al.*, 1996).

Os mecanismos fisiopatológicos que levam a proliferação mio-intimal e aterosclerose em pacientes com excesso de adiposidade visceral e resistência à insulina, embora especulativos, têm proposições baseadas em trabalhos experimentais e epidemiológicos.

Admite-se que o papel de importante agente mitogênico da insulina, ativado pela via proteína cinase (MAPK - mitogen-activated protein kinase), resulte em proliferação das células da musculatura lisa vascular (MIKKAIL N, TUCK M, 2000). Por outro lado, a inibição seletiva da via MAPK atenua o crescimento das células musculares lisas. É possível que, em pacientes com resistência à insulina, a ação promotora da mitogênese vascular da insulina se ative, e interações entre ela e outros mediadores de crescimento vascular ocorram. Por exemplo, a indução de hiperinsulinemia, combinada a hiperglicemia e hipertrigliceridemia, aumenta os níveis de adiponectina e do

inibidor de ativação do plasminogênio (PAI-1) de indivíduos normais (CALLES-ESCADON *et al.*, 1998).

1.3. A leptina

Este hormônio protéico, produzido principalmente pelo tecido adiposo branco, está envolvido na modulação dos processos fisiológicos como regulação do consumo de alimentos, metabolismo energético e termogênese. O gene responsável pela sua produção é o *ob/ob*, identificado em 1994.

Sua ação está direcionada ao núcleo arqueado do hipotálamo (sistema nervoso central), porém também apresenta diversos efeitos periféricos, pois seus receptores estão presentes em outros tecidos (YURI *et al.*, 2005). Além dos efeitos sobre o peso corporal e homeostase metabólica, também tem ação na puberdade, maturação sexual e atividade reprodutiva (DAYI *et al.*, 2005).

Em indivíduos que apresentam índice de massa corporal elevado, foi observado um aumento dos níveis de leptina e peptídeo C e uma diminuição dos fatores de crescimento tipo insulina. Os mesmos dados podem ser encontrados em mulheres que apresentam câncer de mama, o que sugere haver uma relação entre níveis de leptinemia e atividade física, obesidade e câncer de mama (IRWIN *et al.*, 2005).

Há fortes indícios que o início da adrenarca e gonadarca, na puberdade feminina, dependem da massa corporal, especialmente da massa gordurosa. Aparentemente, a leptina estimula a maturação somática durante a gonadarca a qual termina com a menarca (BLOGOWSKA *et al.*, 2005).

A leptina é capaz de estimular a secreção estrogênica pelo aumento da atividade aromatase, no estroma da célula adiposa e tecido mamário. Receptores de leptina estão presentes em células epiteliais mamárias o que sugere o envolvimento deste hormônio no controle da proliferação tanto de células normais quanto malignas. Níveis aumentados de leptina em meninos púberes com ginecomastia podem associar a presença do hormônio à patogenia dessa entidade, através da estimulação estrogênica, nestes indivíduos (DUNDAR *et al.*, 2005).

A leptina aumenta a atividade nervosa simpática, estimula a geração de oxigênios reativos, a produção de endotelina 1 e potencializa a agregação

plaquetária. Isto pode contribuir para a hipertensão, disfunção endotelial e aterosclerose em obesos (LUO *et al.*, 2005).

1.4. A resistina

Esta substância pertence a uma família de polipeptídios ricos em cisteína, que têm, como sua principal fonte produtora humana, o macrófago (JUNG *et al.*, 2005). A placenta humana e o tecido adiposo também são capazes de produzir resistina.

Este peptídeo está relacionado com o controle do metabolismo energético, onde estudos experimentais sugerem que possa estar envolvido no desenvolvimento de resistência à insulina, em animais (MORA-JANISZEWSKA *et al.*, 2005), bem como aparecimento de obesidade e diabetes mérito tipo 2. O mecanismo pelo qual surge a doença não está claro ainda, mas fatores dietéticos e farmacológicos são capazes de determinar alterações na expressão do gene para resistina e, conseqüentemente, mudanças na captação celular de glicose.

Insulina tipo 1, ácido oléico e drogas como rosiglitazona e metformina causam diminuição na expressão genética do mRNA para resistina. O contrário também se verifica quando o hormônio diminui a taxa de captação de glicose insulino-estimulada. Porém, na ausência de insulina, a resistina aumenta a taxa de captação da glicose de uma forma dose dependente, através de uma via dependente de uma proteína-quinase ativada por mitogênio (REA & DONNELLY, 2006). Resistina também diminui a síntese de glicogênio e a fosforilação da 3 β -sintase-quinase glicogênio (PALANIVEL *et al.*, 2005).

Essa adipocina também está, provavelmente, ligada aos processos inflamatórios, principalmente aqueles relacionados com o dano de parede endotelial. Indivíduos saudáveis, com pré-hipertensão, quando comparados a normotensos, apresentaram níveis de resistina plasmática significativamente mais altos, bem como uma diminuição da adiponectinemia. Como a pré-hipertensão está relacionada com o risco aumentado de doença cardiovascular, em indivíduos saudáveis, estes achados podem contribuir para o aparecimento e/ou aceleração da aterogênese (PAPADOPOULOS *et al.*, 2005).

A produção de adipocinas pró-aterogênicas tem interesse particular haja vista a sua secreção local, como no caso dos depósitos adiposos perivascularares, onde pode haver um novo mecanismo fisiopatológico que vincule acontecimentos como obesidade e complicações vasculares associadas (JUGE-AUBRY *et al.*, 2005).

Infiltrados macrofágicos em sítios de aterosclerose ou aneurisma secretam resistina e isto afeta a função endotelial e a migração de células da musculatura lisa dos vasos, agravando mais ainda o processo inflamatório local (JUNG *et al.*, 2005).

Polimorfismos do gene para resistina podem estar associados a alterações de pressão, do metabolismo da glicose, coronariopatias, entre outras, mas também, dependendo da população estudada, os mesmos polimorfismos podem não se manifestar clinicamente (GOUNI-BERTHOLD *et al.*, 2005).

Outros fatores de “stress” oxidativo, apesar do curto tempo de exposição, também são capazes de determinar impactos significativos na expressão genética das adipocinas, favorecendo sobremaneira a aterosclerose (KAMIGAKI *et al.*, 2006).

1.5. O fator de necrose tumoral α

O tecido adiposo é um importante sítio de metabolismo de esteróides sexuais e glicocorticóides. A função endócrina adiposa pode levar a conseqüências adversas tanto pela falta como pelo excesso de produção hormonal. O fígado é um dos principais sítios de dano associado ao metabolismo lipídico, por mecanismos que envolvem ativação da apoptose através da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ativação da caspase e liberação de oxigênios reativos (estresse oxidativo; PICHARDO-BAHENA, 2004).

Em alguns distúrbios metabólicos do tecido adiposo, há aumento da fração solúvel do TNF- α com conseqüente elevação da sua atividade biológica. A ativação deste sistema causa resistência à insulina. Hipertensão e dislipidemia também podem ser desencadeadas pela desregulação do TNF- α em obesos.

Vários estudos sugerem uma forte associação de polimorfismos do gene para TNF- α e fenótipos de obesidade. Segue-se a isto a hipótese de que o polimorfismo G/A -308 está relacionado ao aumento do índice de massa corporal e das circunferências do quadril e cintura, particularmente no sexo feminino (CORBALAN *et al.*, 2004).

1.6. A adiponectina

Várias moléculas derivadas dos adipócitos participam da complexa comunicação entre órgãos envolvidos na regulação do peso corporal. Células adiposas usam hormônios polipeptídicos para influenciar processos metabólicos à distância, além do cérebro (Figura 4). A adiponectina, exclusivamente sintetizada no adipócito, é o melhor exemplo deste tipo de molécula. O gene que codifica a formação desta proteína é designado pela sigla *APM1* (**Adi**Pose **M**ost frequent gene transcript). Alguns critérios são considerados para que se diga que este hormônio é uma molécula sinalizadora de adiposidade.

As adipocinas contribuíram para a descrição do papel chave desempenhado pelo tecido adiposo na regulação hepática e muscular fina na resposta à insulina. Contrastando com as outras moléculas, a adiponectina plasmática diminui proporcionalmente com o acúmulo de tecido adiposo, especialmente no espaço visceral e com o desenvolvimento de resistência à insulina. Quando administrada a ratos, aumenta a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose bem como parece aumentar a oxidação de ácidos graxos livres no músculo. A correlação entre adiposidade visceral, adiponectina, resistência à insulina e doença inflamatória associada, tais como diabetes e arteriosclerose, têm sido amplamente referida. A adiponectina está envolvida na regulação da homeostase energética mais por sua ação em órgãos periféricos do que pela ação central. Níveis circulantes da proteína estão associados a vários componentes da síndrome metabólica (resistência à insulina), inclusive a distribuição de gordura intra-abdominal, hiperlipidemia, níveis inferiores de lipo-proteínas de baixa densidade (Low Density Lipoproteins – LDL) e diabetes tipo 2 (CANCELLO *et al.*, 2004).

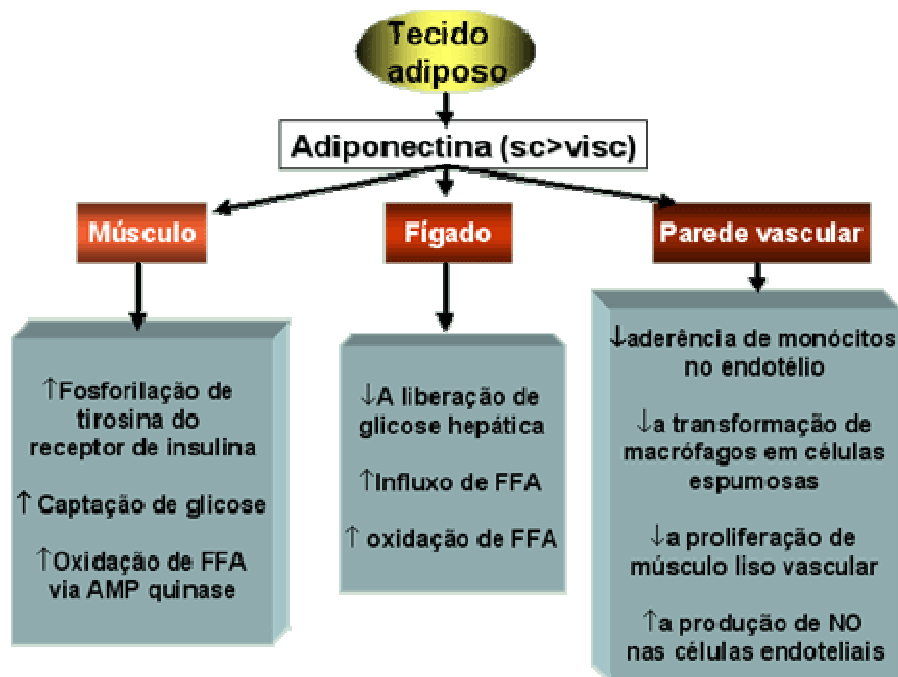


Figura 4 – O diagrama mostra as ações básicas do hormônio adiponectina em diferentes tecidos-alvo. SC: subcutâneo; Visc: visceral; FFA: ácidos graxos livres; NO: óxido nítrico.

Outros achados foram, também, observados em modelos animais. Nestes foi demonstrado que a administração de adiponectina favorece a ação da insulina, enquanto que baixos níveis da proteína contribuem com a resistência à insulina associada à obesidade. A expressão do gene da adiponectina e seus níveis circulantes estão mais baixos em diabéticos tipo 2 do que em não diabéticos. Independente da adiposidade corporal, a adiponectinemia está positivamente relacionada com a sensibilidade à insulina. A proteína também diminui com a idade, como o verificado em macacos *Rhesus* obesos, momento em que estes animais começam a exibir uma resistência insulínica e desenvolver diabetes tipo 2. A fosforilação da tirosina diminuída dos receptores insulínicos musculares está relacionada com baixa adiponectinemia, e estes níveis são sinalizadores do desenvolvimento de diabetes. Marcadores de resistência insulínica estão ligados a um locus característico quantitativo no cromossomo 3, na região que contém o gene da adiponectina. A produção de adiponectina é necessária para uma ação insulínica normal, e isto é corroborado pelo relato de que a ausência da proteína, tanto em ratos heterozigotos quanto homozigotos, leva à resistência insulínica (CANCELLO *et al.*, 2004).

Também tem sido demonstrado que, em contraste com as outras adipocinas, a adiponectina ou adipQ, ou Acrp 30 (adipocyte complement related protein) restabelece a sensibilidade à insulina e a adesão de células endoteliais bem como as alterações lipêmicas, o que protege contra o desenvolvimento da aterosclerose (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004).

Alguns pesquisadores acreditam que a adiponectina atua no fígado, fazendo com que este segregue menor quantidade de açúcar para o sangue. Outros cientistas referem que o efeito primário do hormônio ocorre no músculo esquelético, onde promove a produção de energia a partir da gordura. Esta diminuição dos níveis de gordura provoca uma redução de ácidos graxos no sangue e no fígado, o que leva a uma redução dos níveis de glicemia.

A proteína é expressa exclusivamente nos adipócitos diferenciados. Sua ação anti-inflamatória e antiaterogênica se dá pela diminuição da expressão da molécula de adesão-1 (via redução da expressão de TNF- α e atividade da resistina), diminuição da quimiotaxia ao macrófago para formação de células gordurosas e inibição da sinalização inflamatória no tecido endotelial (ARNER, 1995; FRAYN *et al.*, 2003; KAWANAMI, *et al.*, 2004). Ela aumenta a sensibilidade à insulina por meio do aumento da oxidação de ácidos graxos e da captação e utilização de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo; redução da liberação de glicose hepática, levando ao melhor controle dos níveis séricos de glicose, ácidos graxos livres e triglicerídeos (MATTISON & JESEN, 2003; RAJALA & SCHERER, 2003).

Hipóteses têm sido propostas para explicar a redução da adiponectina em obesos e/ou Diabete Mellito Tipo 2, DM2. A concentração sérica da adiponectina é inversamente proporcional ao Tecido Adiposo Visceral, TAV, bem como ao Tecido Adiposo Subcutâneo Abdominal, TASA (WAJCHENBERG, 2000), sendo que, segundo PARK *et al.* (2004) apenas o TAV é fator inverso independente para a variação de sua secreção. Em outro estudo, a concentração aumentada de TNF- α , em cultura de adipócitos do TAV de indivíduos obesos, inibiu a expressão gênica para produção deste hormônio, sendo este um possível fator determinante da secreção da adiponectina. Mesmo após a inibição da ação do TNF- α , a secreção foi reduzida, sugerindo que a expressão de mRNA para adiponectina é reduzida pela atividade do

TNF- α concomitante ao próprio TAV aumentado nos obesos (HALLEUX *et al.*, 2001). Outro fator investigado é a presença aumentada de endotelina-1 (ET-1) em obesos e DM2, que poderia resultar em menor estimulação da secreção da adiponectina nos depósitos de gordura. A exposição aguda e crônica a ET-1 reduz também o total celular do Substrato do Receptor de Insulina, IRSs, ou seja, ela tem ação negativa direta na sensibilização celular para captação de glicose via insulina, além da redução da adiponectina (CLARKE *et al.*, 2003).

Pesquisadores (KROTKIEWSKI *et al.*, 1998) descobriram que ratos com pouca ou nenhuma gordura corporal não produzem adiponectina, e esta é reduzida em ratos obesos, tornando ambos os grupos propensos a se tornarem insensíveis ou resistentes à insulina. Com surpresa os investigadores constataram que, quanto maior a quantidade de gordura, menor a quantidade de adiponectina produzida. Para um hormônio que é exclusivamente produzido pelo tecido adiposo este fato foi considerado estranho já que há muito tempo se conhece que a obesidade está associada ao desenvolvimento do diabetes.

Há crescentes evidências de que as adiponectinas seriam consideradas como protetoras contra a doença cardiovascular. É hipotetizado que concentrações reduzidas de adiponectina, observadas em pessoas obesas, estão envolvidas no desenvolvimento de aterosclerose e doença cardiovascular. Estudos recentes, em ratos, mostram que a diminuição de adiponectina leva a um aumento da resposta inflamatória ao dano vascular, e a administração do hormônio previne a aterosclerose em ratos deficientes em uma apolipoproteína (apo-E). Com relação aos lipídeos circulantes, genes associados têm efeitos pleiotrópicos nos HDL e triglicerídeos séricos. Mais ainda, dados de dois grandes estudos indicam que, depois do ajuste de sexo e adiposidade corporal, concentrações circulantes de adiponectina estão negativamente relacionadas com triglicerídeos e positivamente relacionadas com níveis de HDL plasmático (MATSUZAWA *et al.*, 2004).

1.7. Identificação de genes que contribuem aos sinais de adiposidade

O primeiro gene identificado em humanos obesos está ligado ao levantamento feito dos genes codificadores de leptina e de seus receptores. Portadores homozigotos de perda de função por uma mutação do gene da leptina ou do seu receptor, apresentam obesidade mórbida (já nos primeiros meses de vida), hipogonadismo hipogonadotrófico e hipotireoidismo central (CLEMENT E FERRI, 2003).

Obesidade mórbida é uma condição clínica de aumento significativo de peso onde se verifica o risco aumentado de que uma ou mais doenças graves relacionadas (diabete, doença cardiovascular, hipertensão) levem à deficiência física significativa ou, até mesmo, à morte.

Embora excepcionais estas situações de obesidade monogênica contribuíram grandemente para a elucidação do papel da leptina não só na regulação do peso corporal mas também no controle de diversas funções endócrinas. Mas desde que a identificação de características monogênicas parece ser modelos raros na obesidade humana e animal, esforços para identificar genes candidatos da obesidade comum têm se concentrado em genes sinalizadores de adiposidade. Os estudos no geral, portanto, direcionam-se na busca da identificação de associações entre os fenótipos da obesidade e variações genéticas diversas (especialmente polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs, por exemplo), localizados em genes codificadores de sinais de adiposidade.

Nas tabelas abaixo, vemos exemplos de tais tipos de associações/ligação. Na Tabela 1 são listados, especificamente, alguns polimorfismos nos quais foram observadas associações com os níveis de adiponectinas circulantes no plasma.

Tabela 1 - Polimorfismos genéticos, populações estudadas e fenótipos associados com os níveis de adiponectinas circulantes no plasma.

Polimorfismo	Tipo de estudo	População	Fenótipos Relac. e Associação Genética	Referências
R112C (exon 3)	Assoc.	Japoneses	Adiponectinemia (↑)	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2000
Polimorfismo G/T (exon2)			Adiponectinemia R112C (↓)	
-11391G>A, -11377C>G	Assoc.	Caucasianos	Adiponectinemia (↑)	VASSEUR <i>et al.</i> , 2002
I164T	Assoc.	Japoneses	Adiponectinemia (↑)	KISHIDA <i>et al.</i> , 2003
G+276T	Assoc.	Italianos	Adiponectinemia (↓)	FILIPPI <i>et al.</i> , 2004
I164T	Assoc.	Japoneses	Adiponectinemia (↓)	OHASHI <i>et al.</i> , 2004
Alelo 276T	Assoc.	Americanos	Adiponectinemia (↑)	QI <i>et al.</i> , 2005
Alelo 45G	Assoc.	Canadenses	Adiponectinemia (↑)	BERTHIER <i>et al.</i> , 2005
-11391G>A	Assoc.	Franceses	Adiponectinemia (↓)	JAZIRI <i>et al.</i> , 2006
-11365C>G	Assoc.	Japoneses	Adiponectinemia (↓)	QI <i>et al.</i> , 2006
Alelo 45T, Alelo 276G	Assoc.	Caucasianos	Adiponectinemia (↓)	MACKEVICS <i>et al.</i> , 2006
Alelo -11391G, Alelo -11377G	Assoc.	Italianos	Adiponectinemia (↓)	BUZZETTI <i>et al.</i> , 2007
-11377C>G	Ligaç.	Homens (angiografia coronariana)	Adiponectinemia (↓) Aterosclerose coronariana (↓) Eventos vasculares (↓)	HOEFLE <i>et al.</i> , 2007
-11391G>A	Ligaç.	Caucasianos	Adiponectinemia (↑) Sensibilidade insulina(↑) Aterosclerose coronariana (↑)	MENZAGHI <i>et al.</i> , 2007

Assoc = associação; Ligaç. = desequilíbrio de ligação.

Foram feitos estudos, também, que investigaram a associação de alguns polimorfismos do gene da adiponectina com fenótipos de adiposidade. Seus resultados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Polimorfismos genéticos, populações estudadas, fenótipos de obesidade associados e referências.

Polimorfismo ou variante gênica	População	Fenótipos associados	Referências
Haplótipos -11391 e -11377	Caucasianos	RI (↑), DM2 (↑)	VASSEUR <i>et al.</i> (2002) MENZAGHI <i>et al.</i> (2002)
T45G T276G	Japoneses	DM2 (↑) RI (↑),	HARA <i>et al.</i> (2002)
T94G	China (Taiwan)	IMC (↑)	YANG <i>et al.</i> (2003)
T45G, IVS2+G62T	Obesos suecos	IMC, Gli., Col., CA (↑)	UKKOLA <i>et al.</i> (2003)
G+276T	Italianos	IMC (↑) RI (↑), Insulinemia (↑)	FILIPPI <i>et al.</i> (2004)
Alelo -11377C	Suecos	IMC (↑)	GU <i>et al.</i> (2004)
I164T, T94G e T276G	Japoneses	DAC (↑)	OHASHI <i>et al.</i> (2004)
Alelo 276T	Norte-americanos	DCV (↓)	QI <i>et al.</i> (2005)
Alelo 276T	Canadenses	LDL (↑), HDL (↓)	BERTHIER <i>et al.</i> (2005)
Alelo 276T	Suecos	% Gordura Corporal (↑)	FREDRIKSSON <i>et al.</i> (2006)
G-11391A	Franceses	Glicemia (↑)	JAZIRI <i>et al.</i> (2006)
Alelo -4034C	Norte-americanos	DCV (↑)	QI <i>et al.</i> (2006)
Alelo +276T		DCV (↓)	
T45G	Chineses	Glicemia (↑)	TSO <i>et al.</i> (2006)
G-11391A, C-11377G	Germânicos	DM2 (↑)	SCHWARZ <i>et al.</i> (2006)
G-11391A, C-11377G	Italianos	RI (↑)	BUZZETTI <i>et al.</i> (2007)
T45G	Canadenses	IMC (↑) Peso (↑)	LOOS <i>et al.</i> (2007)

IMC = Índice de Massa Corporal; Gli.= Glicose; Col. = Colesterol; CA = Circunferência Abdominal; RI = Resistência à Insulina; DM2 = Diabetes Mellito tipo 2; DAC = Doença Arterial Coronariana; DCV = Doença Cardiovascular; LDL/HDL = Low / High Density Lipoprotein.

Na tabela 2, nota-se que, quanto aos fenótipos de obesidade (índice de massa corporal, glicemia, colesterolemia, circunferência abdominal, entre outros) associados aos polimorfismos de nucleotídeo único do gene da adiponectina, observa-se que as mais importantes associações encontradas foram com os polimorfismos designados como T94G, T45G, IVS2+G62T e -11391 e -11377 da região promotora do gene da adiponectina (APM1).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Um grande número de proteínas produzidas pelo tecido adiposo atua no sistema nervoso central, fígado e músculo, coordenando a homeostase energética e o metabolismo de substratos. Alterações na produção destes hormônios, como leptina, TNF α , resistina e adiponectina, parecem ter efeito substancial na adiposidade corporal e sensibilidade à insulina. Os processos envolvidos na regulação da homeostase energética e metabolismo de carboidratos e lipídeos estão bastante ligados à ação desses mediadores neuroendócrinos. A produção destes hormônios adipocitários parece ser regulada por estado nutricional, isto é, alimentação, jejum e/ou perda de peso. Um entendimento mais completo das vias bioquímicas e moleculares de regulação da biossíntese das adipocinas poderá levar ao manejo mais adequado da obesidade, dislipidemia e resistência à insulina e/ou diabetes do tipo 2.

Foram encontradas associações entre os níveis de adiponectinas no plasma e diferentes fenótipos da adiposidade, em algumas populações humanas (ver lista na Tabela 2), conforme combinações haplotípicas dos SNPs -11391 (G>A) e -11377 (C>G) do gene APM1. Assim sendo, pretendemos, nesta Dissertação, estudar uma população brasileira com os objetivos de:

1. verificar se, também nesta população, os alelos dos polimorfismos dos SNPs -11391 (G>A) e -11377 (C>G) do gene APM1 da adiponectina estão correlacionados com distintos fenótipos da adiposidade (glicose em jejum, índice de massa corporal, colesterol total e seus subtipos e triglicerídeos) ;
2. e, em caso positivo, investigar se as associações encontradas são significativas com os mesmos alelos variantes observados em outros estudos similares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de estudo

A amostra do presente estudo foi constituída de um total de 297 pessoas voluntárias, que compareceram ao Posto de Saúde Bella Aurora do município de Campo Bom, RS (localizado a 45 km da capital, Porto Alegre), ou ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, para realização de exames laboratoriais de rotina.

De todos os indivíduos foram coletados 10 ml de sangue e tomadas as medidas de peso, altura e circunferência da cintura e do quadril. Todos responderam a um questionário sobre hábitos de vida e assinaram termo de consentimento informado (Anexo I).

3.1.1. Critérios de inclusão

Indivíduos adultos que procuraram atendimento médico generalista, para tratamento ou acompanhamento de qualquer condição clínico-cirúrgica através do Sistema Único de Saúde em Porto Alegre e região metropolitana e que apresentaram solicitação para análise laboratorial do perfil lipídico.

3.1.2. Critérios de exclusão

Indivíduos menores de dezoito anos e aqueles incapazes de compreender o estudo e assinar o termo de consentimento.

3. 2. Métodos

A coleta de sangue total foi realizada com o indivíduo em jejum e foram obtidos dez mililitros, através de punção venosa, dispostos em dois frascos: cinco mililitros, com anticoagulante (EDTA), para a análise de DNA e cinco mililitros, sem anticoagulante, para a análise bioquímica. Os frascos destinados à análise bioquímica foram centrifugados durante dez minutos e a uma velocidade de três mil rotações por minuto. O fluxograma de coleta consta no Anexo II.

3.2.1. Análise do DNA

A identificação dos genótipos foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Biodiversidade Animal da ULBRA. O DNA foi extraído de acordo com o método de LAHIRI & NURNBERGER (1991). A genotipagem dos polimorfismos -11391(G>A) e -11377(C>G) do gene APM1 (Fig. 5) foi feita através de reação em cadeia da polimerase (PCR), com temperatura de anelamento de 57⁰C, e análise dos fragmentos em condições de amplificação e de clivagem de acordo com o método preconizado por POITOU *et al.* (2005), usando os seguintes iniciadores (*primers*):

Primer sense (A1): 5'- TGTTGAAGTTGGTGCTGGCAT -3'

Primer antisense (A2): 5'- AGCCTGGAGAACTGGAAGCT -3'

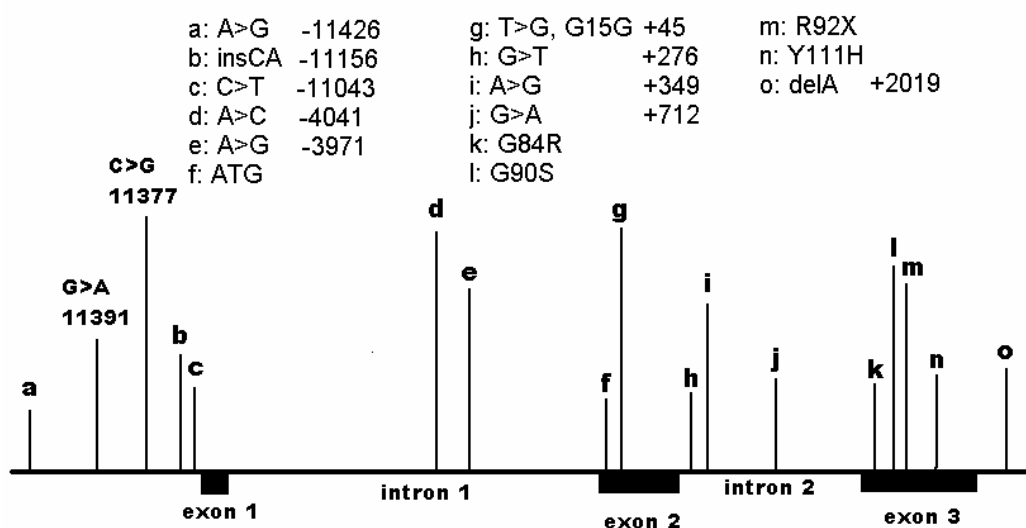


Figura 5. Posição dos SNPs -11391(G>A) e -11377(C>G) no gene APM1 (retirado de VASSEUR *et al.*, 2002).

A técnica de RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por eletroforese, dos fragmentos gerados, que correspondem a padrões de restrição específicos. Estes padrões podem ser característicos ao nível da espécie ou mesmo ao nível da estirpe.

Uma vez que estirpes distintas apresentam diferenças (ainda que, por vezes, mínimas) no nível do genoma, o que esta técnica explora é a possibilidade dessas diferenças se encontrarem no interior da seqüência de reconhecimento da(s) enzima(s) de restrição utilizada(s). Supondo que uma dada estirpe sofra uma mutação tal que, uma dada enzima deixa de reconhecer a sua seqüência de restrição nesse local, essa enzima deixa de poder cortar o DNA no dito local. Desta forma, a comparação dos perfis resultantes pode permitir detectar pequenas alterações que diferenciem as estirpes, desde que essas modificações ocorram nas seqüências de reconhecimento das enzimas usadas (<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=402>, acesso em 14/08/2007).

De modo mais detalhado, após a coleta das amostras e extração do DNA, o processo seguiu as seguintes etapas:

1 – elaboração de um *mix* de reagentes com a seguinte composição:

Tampão 10X	1X	3 µl
MgCl 50 mM	2 mM	1,2 µl
Primer A1 10 µM	0,23 µM	0,7 µl
Primer A2 10 µM	0,23 µM	0,7 µl
dNTPs 25 mM	200 µM	0,6 µl
Taq 5 U/µl	0,75 U	0,15 µl
Água miliQ qsp	30 µl	23,65 µl
Volume Total		30,0 µl;

2 – em um tubo de 200 µl, foram misturados 30 µl desse *mix* e 1 µl de DNA;

3 – cada amostra foi colocada em termociclador para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com a seguinte programação:

- 5 min a 94°C (desnaturação inicial)
- 35 repetições dos seguintes ciclos: 30 s a 94°C (desnaturação), 30s a 57°C, (anelamento) e 30 s a 72°C (extensão);
- 5 min a 72°C (extensão final);

4 – o passo seguinte foi a verificação do sucesso da reação de PCR através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A reação foi considerada bem-sucedida na presença de uma banda com migração equivalente a 209 pb.

Os polimorfismos foram analisados pelo emprego das enzimas de restrição *Hpa*II e *Hha*I, conforme esquema a seguir:

- *Genotipagem -1139(G>A)*

Clivagem com a enzima de restrição *Hpa*II (5U):

alelo G (+) = 129 + 80 pb

alelo A (-) = 209 pb

- *Genotipagem -11377(C>G)*

Clivagem com a enzima de restrição *Hha*I (4U):

alelo C (+) = 116 + 93 pb

alelo G (-) = 209 pb

5 – os produtos das clivagens foram levados à eletroforese em gel de agarose a 2,5% e genotipados conforme descrito acima.

3. 2.2. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas no Laboratório de Biomedicina do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário FEEVALE, em Novo Hamburgo, RS e no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.

As provas bioquímicas no Laboratório de Biomedicina da FEEVALE foram realizadas a cargo da Prof^a. Ms. Simone Rossetto, integrante deste projeto. Constaram de:

- Colesterol Total,
- Colesterol HDL ,
- Triglicerídeos e
- Glicose em jejum.

As dosagens bioquímicas do colesterol total, triglicerídeos e colesterol HDL foram feitas por método enzimático-colorimétrico em equipamento semi-automatizado (Labquest) e kits da marca Wiener, seguindo os protocolos dos fabricantes. O colesterol HDL foi dosado após precipitação das frações de

menor densidade e o Colesterol LDL foi calculado pela equação de Friedewald, para amostras com triglicérides até 400 mg/dl. Todas as dosagens foram acompanhadas de um soro controle comercial.

3. 2.3. Medidas antropométricas

Todos os indivíduos tiveram as seguintes medidas antropométricas avaliadas:

- Peso em kg,
- Altura em metro,
- Circunferência da cintura (em cm) e
- Circunferência do quadril (em cm).

Para tanto, foi usada balança aferida e, para a medida da altura, régua específica. A medida da cintura foi tomada na altura da cicatriz umbilical e a do quadril na parte mais saliente dos glúteos, com fita métrica.

3.2.4. Análise estatística dos dados

Foi construído um banco de dados com o programa Microsoft Excel[®] e para a análise estatística utilizou-se o software SPSS for Windows (Statistical Package for Social Sciences, versão 8.0).

As freqüências alélicas e as proporções genotípicas foram comparadas pelo teste de χ^2 .

A avaliação da obesidade foi realizada através do cálculo do índice de massa corporal (IMC), calculado como peso (em kg) dividido pela altura (em m) elevada ao quadrado. Conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998 – ver no final), indivíduos com IMC igual ou superior a 25 kg/m² foram classificados como tendo excesso de peso e aqueles com IMC igual ou superior a 30 kg/m² foram considerados obesos. A razão cintura/quadril foi calculada dividindo-se a circunferência da cintura pela circunferência do quadril. As relações entre as medidas antropométricas e bioquímicas com o sexo e a idade foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson e teste *t* e, quando significativas, as medidas foram ajustadas por sexo e idade através de regressão múltipla.

Os haplótipos derivados das combinações entre os alelos dos dois polimorfismos foram determinados através do programa MLocus (Long *et al.*,1995).

As médias das medidas antropométricas e bioquímicas foram comparadas entre os genótipos e haplótipos através da análise de variância (ANOVA).

3.2.5. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado nos Comitês de Ética das Instituições onde as coletas foram realizadas, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA, seguindo exigências e critérios próprios para esta avaliação (Protocolo No. 2006-305H).

4. RESULTADOS

Conforme relatado no capítulo Material e Métodos, as amostras analisadas nesta Dissertação foram coletadas de voluntários que compareceram ao Posto de Saúde Bella Aurora do município de Campo Bom, RS (localizado a 45 km da capital, Porto Alegre), ou ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, para realização de exames laboratoriais de rotina. Os indivíduos da amostra forneceram informações sobre suas condições de saúde e hábitos de vida. Desta forma, os dados obtidos nos exames bioquímicos e de DNA realizados foram analisados levando em conta os parâmetros informados nos questionários. Os resultados obtidos estão descritos nas próximas seções.

4. 1. Caracterização geral da amostra

A amostra está descrita na Tabela 3. A amostra, constituída só de adultos, apresentou uma idade média de 47,35 anos, considerando os dois sexos.

Tabela 3 – Caracterização da amostra investigada.

N ^o de indivíduos = 297	
N ^o homens = 84	N ^o mulheres = 213
% de homens = 28,3	% de mulheres = 71,7
Idade = 49,29	Idade = 45,40

Os dados sobre IMC (= índice de massa corporal) observados estão descritos na Tabela 4. Nela pode-se notar que mais de 60% dos indivíduos que compõem a amostra estão fora de condições ideais de peso.

Tabela 4 – Caracterização antropométrica da amostra investigada.

Índice de massa corporal (IMC)	
EUTRÓFICOS (inferior a 25 kg/m ²)	38,0%
SOBREPESO (entre 25 e 30 kg/m ²)	36,3%
OBESOS (igual ou superior a 30 kg/m ²)	25,7%

As freqüências genótípicas e dos alelos dos polimorfismos -11391(G>A) e -11377(C>G) na região promotora do gene da adiponectina estão relacionadas na Tabela 5, estando todas de acordo com aquelas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5 – Freqüências genótípicas e alélicas.

Genótipos	Alelos	
Polimorfismo -11391(G>A) (N=295)		
G/G	212	G = 0,85
G/A	76	A = 0,15
A/A	7	
$\chi^2 = 0,018$		
Polimorfismo - 11377 (C>G) (N=296)		
C/C	180	C = 0,77
C/G	96	G = 0,23
G/G	20	
$\chi^2 = 1,914$		

4. 2. Medidas antropométricas

As diferentes análises a seguir foram realizadas levando em conta os resultados dos dois polimorfismos na região promotora do gene da adiponectina investigados.

Os diferentes genótipos dos polimorfismos -11391(G>A) e -11377 (C>G) apresentaram valores similares de índices de massa corporal (IMC), conforme pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com os índices de massa corporal (IMC).

Índices de massa corporal (IMC) ¹			
Polimorfismo -11391(G>A) (N=293)			
GENÓTIPOS	N	Média IMC ¹ (kg/m ²)	DP ¹
G/G	190	27,5	±5,9
G/A	62	27,6	±5,2
A/A	6	25,8	±3,0
P ² = 0,731 ²			
Polimorfismo – 11377 (C>G) (N= 294)			
GENÓTIPOS	N	Média IMC ¹ (kg/m ²)	DP ¹
C/C	178	27,5	±6,0
C/G	96	27,3	±5,0
G/G	20	28,6	±6,4
P ² = 0,638 ²			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Os diferentes genótipos dos polimorfismos -11391(G>A) e -11377 (C>G) distribuíram-se entre os normopeso e os com sobrepeso conforme observado na Tabela 7. Nela, não se observaram diferenças entre as duas categorias.

Tabela 7 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos em indivíduos normopeso e com sobrepeso.

Índices de massa corporal (IMC) ¹		
GENÓTIPOS	IMC < 25 kg/m ²	IMC ≥ 25 kg/m ²
Polimorfismo -11391(G>A)		
G/G	71,4%	71,7%
G/A	25,0%	26,5%
A/A	3,6%	1,7%
Polimorfismo -11377 (C>G)		
C/C	58,9%	61,3%
C/G	34,8%	31,5%
G/G	6,3%	7,2%

¹ valores ajustados pela idade

Esta mesma comparação foi feita levando em conta os haplótipos de ambos os polimorfismos (Tabela 8), também não se observando diferenças entre os mesmos.

Tabela 8 – Distribuição dos haplótipos em indivíduos normopeso e com sobrepeso.

Índices de massa corporal (IMC) ¹		
HAPLÓTIPOS	IMC < 25 kg/m ²	IMC ≥ 25 kg/m ²
G C	64,8%	62,0%
G G	21,4%	23,0%
A G	13,8%	15,0%
Total	100%	100%

¹ valores ajustados pela idade

Quando estas comparações são feitas entre as mulheres (Tabela 9) não se observam diferenças entre os índices de massa corporal (IMC), nem quando se comparam os perímetros da cintura (Tabela 10).

Tabela 9 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com os índices de massa corporal (IMC) entre as mulheres.

Índices de massa corporal (IMC) – 11391 (G>A)			
GENÓTIPOS	n	Média IMC ¹ (kg/m ²)	DP ²
G/G	149	27,9	±6,4
G/A	54	28,0	±5,4
A/A	6	25,5	±3,2
P ² = 0,622			
Índices de massa corporal (IMC) – 11377 (C>G)			
C/C	128	28	6,5
C/G	69	27,5	5,1
G/G	13	29,2	7,1
P ² = 0,631			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Tabela 10 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com os perímetros da cintura entre as mulheres.

Perímetro da cintura – 11391 (G>A)			
GENÓTIPOS	n	Média cintura (cm) ¹	DP ²
G/G	151	93,2	±11,9
G/A	54	92,6	±12,4
A/A	6	85,6	±5,6
P ² = 0,302			
Perímetro da cintura – 11377 (C>G)			
C/C	130	92,8	±12,1
C/G	69	92,8	±11,3
G/G	13	95,7	±15,0
P ² = 0,710			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Achados na mesma direção são encontrados quando estas comparações são feitas entre os homens, seja em relação aos Índices de

massa corporal (Tabela 11), seja no que se refere aos perímetros da cintura (Tabela 12).

Tabela 11 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com os índices de massa corporal (IMC) entre os homens.

Índices de massa corporal (IMC) –11391(G>A)			
GENÓTIPOS	N	Média IMC ¹ (kg/m ²)	DP ²
G/G	61	26,5	±4,5
G/A	22	26,5	±4,3
A/A	1	27,8	
$P^2 = 0,961$			
Índices de massa corporal (IMC) –11377 (C>G)			
GENÓTIPOS	N	Média IMC ¹ (kg/m ²)	DP ²
C/C	50	26,2	±4,3
C/G	27	26,8	±4,6
G/G	7	27,6	±5,1
$P^2 = 0,690$			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Tabela 12 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com as médias da cintura entre os homens.

Perímetro da cintura (cm) ¹ –11391(G>A)			
GENÓTIPOS	N	Média cintura (cm)	DP ²
G/G	61	92,5	±12,1
G/A	22	93,7	±9,9
A/A	1	97,2	
$P^2 = 0,859$			
Perímetro da cintura (cm) ¹ –11377 (C>G)			
GENÓTIPOS	N	Média cintura (cm)	DP ²
C/C	50	92,4	±11,1
C/G	27	93,0	±11,1
G/G	7	95,9	±16,0
$P^2 = 0,752$			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

4. 3. Perfis lipídicos

Não se observaram diferenças quando os níveis de colesterol total (CT) foram comparados entre os homens (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de colesterol total (CT) entre os homens.

Nível de colesterol total –11391(G>A)			
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)	DP ²
G/G	56	191,4	±53,5
G/A	17	191,6	±51,4
A/A	1	174,3	
P ² = 0,950			
Nível de colesterol total –11377 (C>G)			
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)	DP ²
C/C	42	191,4	±53,4
C/G	25	193,5	±52,6
G/G	7	181,4	±51,3
P ² = 0,866			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

E também não se observaram diferenças quando os níveis de colesterol LDL e HDL (“low and high density lipoprotein”) foram comparados entre os homens (Tabela 14).

Tabela 14 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de colesterol LDL e HDL (“low e high density lipoprotein”) entre homens.

Níveis das frações de colesterol –11391(G>A)					
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)			
		LDL	DP ²	HDL	DP ²
G/G	55	120,1	±49,6	46,0	±15,8
G/A	15	109,0	±57,0	47,3	±20,8
A/A	1	112,6		47,0	
P ² =0,757			P ² =0,969		
Níveis das frações de colesterol –11377 (C>G)					
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)			
		LDL	DP ²	HDL	DP ²
C/C	40	115,3	±50,4	47,1	±18,1
C/G	25	120,5	±53,6	44,8	±16,4
G/G	6	121,3	±48,5	47,3	±7,0
P ² =0,911			P ² =0,850		

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Os níveis de colesterol HDL (“high density lipoprotein”) foram similares entre os três genótipos, não correndo desvios significantes entre os mesmos no sexo masculino (Tabela 14).

As comparações entre todos os níveis de lipoproteínas (total, LDL e HDL) entre os três genótipos em mulheres não evidenciaram diferenças entre os mesmos (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de colesterol total (CT) entre mulheres.

Nível de colesterol total –11391(G>A)			
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)	DP ²
G/G	134	200,1	±45,4
G/A	45	188,4	±40,1
A/A	5	187,3	±32,0
P ² = 0,268			
Nível de colesterol total –11377(C>G)			
C/C	115	196,0	±41,8
C/G	61	197,6	±47,6
G/G	9	199,6	±49,5
P ² = 0,953			

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Tabela 16 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de colesterol LDL e HDL (“low e high density lipoprotein”) entre mulheres.

Níveis das frações de colesterol –11391(G>A)					
GENÓTIPOS	N	Média CT ¹ (mg/dL)			
		LDL	DP ²	HDL	DP ²
G/G	123	124,7	±44,2	49,8	±12,4
G/A	40	116,6	±43,6	48,2	±13,7
A/A	5	114,9	±40,9	53,8	±9,4
		P ² =0,557		P ² =0,581	
Níveis das frações de colesterol –11377 (C>G)					
		LDL	DP ²	HDL	DP ²
C/C	106	120,4	±42,1	49,8	±12,3
C/G	55	125,4	±47,7	49,5	±13,9
G/G	9	126,8	±42,3	44,9	±6,4
		P ² =0,751		P ² =0,529	

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

Outro parâmetro comparado que não mostrou diferenças entre os genótipos foi o nível de triglicerídeos (TG, Tabela 17, homens e mulheres).

Tabela 17 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de triglicerídeos (TG) ambos os sexos.

Níveis de Triglicerídeos -11391 (G>A)						
GENÓTIPOS	N	Homens		N	Mulheres	
		Média TG	DP ²		Média TG	DP ²
G/G	56	132,2	±61,7	136	125,6	±70,1
G/A	18	161,5	±18,0	44	123,2	±82,2
A/A	1	78,0		5	84,0	±35,0
	P ² =0,236			P ² =0,394		

Níveis de Triglicerídeos -11377 (C>G)						
GENÓTIPOS	N	Homens		N	Mulheres	
		Média TG	DP ²		Média TG	DP ²
C/C	43	140,8	±63,3	116	124,1	±77,2
C/G	25	144,1	±77,3	61	121,4	±61,6
G/G	7	104,4	±29,5	9	137,0	±80,4
	P ² =0,237			P ² =0,707		

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

No que se refere às diferenças dos níveis de glicose entre os três genótipos também não se observou diferenças em ambos os sexos (Tab. 18).

Tabela 18 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de acordo com níveis de glicose, ambos os sexos.

Níveis de Glicose -11391 (G>A)						
GENÓTIPOS	N	Homens		N	Mulheres	
		Média TG	DP ²		Média TG	DP ²
G/G	56	99,1	±48,2	134	92,9	±26,7
G/A	17	92,4	±19,3	44	89,2	±26,1
A/A	1	97,8		4	83,2	±11,6
	P ² =0,858			P ² =0,582		

Níveis de Triglicerídeos -11377 (C>G)						
GENÓTIPOS	N	Homens		N	Mulheres	
		Média TG	DP ²		Média TG	DP ²
C/C	43	94,1	±37,9	114	91,4	±27,2
C/G	24	97,0	±35,2	60	93,8	±25,9
G/G	7	120,8	±82,6	9	86,0	±16,3
	P ² =0,313			P ² =0,673		

¹valores ajustados pela idade; ²testes com valores de p inferiores a 5% foram tomados como significantes.

5. DISCUSSÃO

De posse dos dados das tabelas 6 a 12 desta Dissertação, constatamos que não houve uma variação significativa das medidas antropométricas entre os genótipos de ambos os polimorfismos. Resultados similares foram encontrados nas análises desenvolvidas por VASSEUR e MENZAGHI *et al.* (2002) que não encontraram associações entre medidas antropométricas e os polimorfismos. No entanto, diversos outros artigos relatam associação entre desvios das medidas antropométricas com os alelos -11391 e -11377 ou com seus haplótipos ou com outras variantes do gene APM1.

Um dos primeiros destes estudos foi a investigação de HARA *et al.* (2002) que observaram que, nas posições 45 e 276 do gene APM1, quando o genótipo altera de TT para GG, a presença do alelo G na posição 276 está linearmente associada com baixos níveis de adiponectinemia plasmática em indivíduos com IMC aumentado.

YANG *et al.* (2003) investigaram 245 chineses, não diabéticos, quanto ao polimorfismo 94T>G do gene APM1. Encontraram que a frequência do alelo G era menor em indivíduos com IMC elevado (≥ 27). Também no mesmo ano, UKKOLA *et al.* (2003) realizaram uma investigação das frequências dos polimorfismos 45T>G e IVS2+62G>T em mulheres suecas obesas, não encontrando desvios entre o grupo alvo e os controles. Estas frequências, no entanto, modificaram-se quando alguns sinais específicos de obesidade foram levados em conta (cintura abdominal, por exemplo).

FILIPPI *et al.* (2004) analisaram a associação entre dois polimorfismos de SNPs (+45T>G e +276G>T) nos genes da adiponectina e da resistência à insulina em 253 indivíduos não diabéticos. Foi investigado, também, se esta associação estaria modulada pelo índice da massa corporal (IMC). Nenhuma associação foi encontrada com o SNP +45T>G, mas o alelo +276G>T ocorreu associado com um índice da massa corporal mais elevado ($P < 0,01$).

No mesmo ano, estudando uma população de suecos, GU *et al.* (2004) observaram que portadores do alelo C para o polimorfismo -11377 C>G apresentavam um índice de massa corporal (IMC) maior que o índice médio das pessoas com o genótipo GG.

Em um estudo que examinou a associação entre mutações no gene da adiponectina com a prevalência da doença da artéria coronariana (CAD) OHASHI *et al.* (2004) encontraram que os níveis de adiponectina no plasma se correlacionavam negativamente com o índice da massa corporal (IMC), sendo significativamente baixos nos pacientes com CAD ou com diabetes tipo 2. Observaram, também, que os níveis de adiponectina do plasma nos indivíduos portadores da mutação I164T eram significativamente mais baixos do que aqueles das pessoas sem a mutação e eram independentes do IMC.

FREDRIKSSON *et al.* (2005) investigaram se um polimorfismo no gene da adiponectina poderia influenciar os níveis de expressão do adiponectina na gordura visceral em pacientes obesos. Os autores estudaram a expressão do gene APM1 no tecido adiposo investigando a relação entre a variação na expressão do APM1, do polimorfismo G276T de APM1, do polimorfismo comum Pro12Ala do gene PPAR γ (o fator de transcrição, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma) e características clínicas de obesidade mórbida e índices de massa corporal (IMC) = $41.5 \pm 4.9 \text{ kg/m}^2$ em 36 pacientes não-diabéticos. Os resultados indicaram que a variação genética em APM1 influencia a expressão do gene no tecido visceral adiposo e sugeriram um papel potencial para tal variação na regulação da acumulação da gordura corporal em indivíduos obesos.

BUZZETTI *et al.* (2007) investigaram uma possível associação entre os SNPs -11391G>A e -11377C>G do gene da adiponectina e a medida da sensibilidade à insulina em um grupo de indivíduos obesos (N=99, idade média 35 anos e com nenhuma comorbidade associada) com uma história de obesidade de, pelo menos, 10 anos. Observaram que os homocigotos para o alelo G no locus -11391 e os portadores da variante -11377G tiveram mais baixos índices da massa corporal e de níveis de adiponectina quando comparados aos indivíduos com os genótipos GA+AA e com os não portadores da variante, respectivamente.

LOOS *et al.* (2007) estudaram a associação dos polimorfismos ADIPOQ, ADIPOR1, e ADIPOR2 (receptores 1 e 2 da adiponectina) com a taxa metabólica em repouso (RQ) e índice de massa corporal, porcentagem de gordura corporal, circunferência da cintura e gordura visceral em 759 participantes de um estudo familiar em Québec, Canadá. Seus resultados confirmaram achados precedentes que indicavam que a variante >G do locus ADIPOQ 45T- contribui à gordura total e à obesidade abdominal.

É possível que a falta de associação que observamos entre algumas formas de SNPs do gene APM1, tão bem evidenciada em outros estudos, seja resultado ou de nosso número amostral (somado ao fato de serem indivíduos não selecionados para o peso corporal) ou realmente refletir uma condição genética da população da grande Porto Alegre. Mais estudos, com uma amostra maior e com medidas dos níveis de adiponectina no plasma, poderão esclarecer esta questão.

Um fator que investigamos e no qual também não encontramos associação com os polimorfismos do gene APM1 foi o perfil lipídico dos indivíduos. Em alguns estudos da literatura, no entanto, esta associação foi evidenciada. UKKOLA *et al.* (2003) ao realizar sua investigação das freqüências dos polimorfismos 45T>G e IVS2+62G>T em mulheres suecas obesas verificaram que uma única substituição (T45G) no codon 15 do exon 2 resultando em nenhuma mudança no aminoácido (Gly15Gly) foi encontrada em freqüências iguais entre indivíduos obesos e controle. Entretanto, este polimorfismo estava associado com o nível de colesterol de soro no grupo obeso. BERTHIER *et al.* (2005) referem o aumento da fração de baixa densidade (LDL) e redução do HDL em pessoas portadoras do alelo 276T, quando comparadas com os homozigotos GG. YAN *et al.* (2006) não observaram relação do polimorfismo 45T>G com a obesidade, mostrando que este polimorfismo está mais associado com aumento do colesterol HDL na análise de uma população chinesa.

Outro parâmetro que analisamos e no qual não encontramos associação com os polimorfismos -11391G>A e -11377C>G do exon 1 do gene APM1 foi nível de glicose do mesmo modo que as análises de GU *et al.* (2004) não mostraram associação significativa destes haplótipos com diabetes do tipo 2 (DM2) e resistência à insulina (RI). A pesquisa de VASSEUR *et al.* (2002)

sugere que possa existir um risco aumentado de desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em haplótipos variantes da região promotora do gene APM1 (-11377 G>C e -11391 G>A), porém, não demonstram a relação com resistência à insulina.

Em vários artigos, no entanto, esta e outras associações com outras variantes deste gene ficaram evidentes. Assim, VASSEUR *et al.* (2002), analisando uma população francesa, conseguiram estabelecer que a presença de, no mínimo, uma mutação não-sinônima no éxon 3 está relacionada com o nível de adiponectina e ocorrência de diabetes tipo 2, porém, sem poder analisar índices de resistência à insulina.

UKKOLA *et al.* (2003) verificaram que a glicose do sangue era mais elevada nas mulheres obesas (N=56) que eram homozigotas para o alelo G (GG) do polimorfismo IVS2 G62T e que todas as diabéticas (N=6) da amostra estavam neste grupo. FILIPPI *et al.* (2004) ao analisaram a associação entre dois polimorfismos de SNPs (+45T>G SNP e +276G>T) na resistência à insulina em indivíduos não diabéticos encontraram que o alelo +276G>T ocorreu associado com a resistência à insulina.

Por outro lado, JAZIRI *et al.* (2006), estudando uma população caucasiana francesa, relatam o envolvimento do polimorfismo -11391G>A com o aumento dos níveis circulantes de glicose. Segundo SCHWARZ *et al.* (2006), este polimorfismo, dentre o grupo analisado, foi o mais frequentemente associado ao diabetes, principalmente os portadores dos alelos -11391A e -11377C.

BUZZETTI *et al.* (2007) sugerem que os portadores destes polimorfismos da região promotora do gene APM1 estejam associados ao desenvolvimento do DM2 pela diminuição da sensibilidade ao hormônio insulina. A susceptibilidade à diabetes deve estar situada em um determinado locus do cromossomo 3q27, onde está o gene APM1. Nas posições 45 e 276, quando o genótipo altera, de TT para GG, HARA *et al.* (2002) já tinham observado que o risco de diabetes tipo 2 ficava bastante aumentado, bem como a resistência à insulina.

Especificamente, a possível variação das freqüências dos haplótipos -11391 e -11377 foi investigada por dois grupos de autores. O estudo recente de MENZAGHI *et al.* (2007) analisou indivíduos caucasianos, diabéticos e não

diabéticos, verificando que o haplótipo está associado com o aumento de peso, mas não com diabetes tipo 2. A variabilidade do locus do APM1 guarda relação com a obesidade e outros quadros de síndrome de resistência à insulina. Os mesmos autores sugerem que a adiponectinemia está relacionada à ação antiaterogênica e com a sensibilidade à insulina. E dois loci do gene APM1 parecem apresentar as variações que justificam estes achados: na extremidade 5', o polimorfismo -11391 G>A representa uma variação modesta mas com um significativo resultado na adiponectinemia; já, na extremidade 3', a variação +276 G>T é um forte determinante de resistência à insulina e doença arterial coronariana.

É possível que, também, com referência aos parâmetros bioquímicos (níveis de colesterol, de triglicerídeos e de glicose) que investigamos neste trabalho não tenhamos encontrado associação com polimorfismos da região promotora do gene APM1, seja devida às mesmas causas apontadas anteriormente: ou estes polimorfismos não estão relacionados com estes fenótipos de obesidade na população da grande Porto Alegre ou esta ausência de associação é o resultado de um número amostral insuficiente para evidenciá-la.

6. APÊNDICE

6.1. Anexo 1 – Questionário e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA												
Título do Projeto: Análise de Polimorfismos do Gene Codificador da Adiponectina												
Área do Conhecimento: Genética Humana						Nº de participantes		No centro:		Total: 200		
Curso: Pós-Graduação Genética Humana						Unidade: Laborat. Diagnóst. Genético ULBRA						
Projeto Multicêntrico		<input checked="" type="checkbox"/>	Sim		<input type="checkbox"/>		Não		<input checked="" type="checkbox"/>	Nacional		
						<input type="checkbox"/>		Internacional		Cooperação Estrangeira		
						<input type="checkbox"/>		Sim		<input checked="" type="checkbox"/>	Não	
Patrocinador da pesquisa: Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq												
Instituição onde será realizado: Laboratório Diagnóstico Genético-Molecular ULBRA Canoas												
Nome dos pesquisadores e colaboradores: Roberto Claire Arena de Souza, Margarete Mattevi												

NOME													
ENDEREÇO													
RES.				COM.				CELULAR					
REGISTRO				D.NASCIM.				RG					
IDADE			SEXO		FEM		MASC		FOTOTIPO			DATA	
PESO				IMC				CINTURA					
COL. TOTAL				HDL				LDL					
TRIGLICER.				GLIC. JEJUM									

É diabético? () sim () não	Se positivo, com diagnóstico médico? () sim () não
É hipertenso ? () sim () não	Se positivo, com diagnóstico médico? () sim () não
Problemas cardiovasculares? () sim () não	Se positivo, com diagnóstico médico? () sim () não
Ativ. Física ou Caminhadas? () sim () não	Quantas vezes por semana? <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> + de 3
Usa cigarros ? () sim () não	Quantos cigarros por dia? <input type="checkbox"/> até 10 <input type="checkbox"/> 10 a 20 <input type="checkbox"/> + de 20
Usa álcool? () sim () não	() cerveja () vinho () uísque () outro <input type="checkbox"/> 1x/dia <input type="checkbox"/> 1 a 2 x/semana <input type="checkbox"/> + de 2 x/semana

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As adiposidades são patologias multifatoriais complexas que podem ser indicativas de um dos problemas de saúde mais significativos de todo o mundo. Os fatores que contribuem para o ganho de peso ou acúmulo de gordura localizada são numerosos e, em sua maioria, desconhecidos. A aplicação da genética na compreensão e tratamento das desordens da regulação do peso corporal, em humanos, teve enorme progresso nos últimos anos. Assim, este estudo tem o objetivo de determinar a influência das variantes em genes que codificam as adipocitocinas (hormônios produzidos pelas células de gordura) na etiologia das adiposidades, na população do Rio Grande do Sul. Para os exames, serão colhidas amostras de sangue, por acesso venoso, e isso será realizado por pessoal treinado e com material descartável, estéril. As amostras serão guardadas até o seu exame e, após, destruídas conforme normas técnicas. Os desconfortos e riscos da participação no estudo são aqueles mesmos de uma simples coleta de sangue para exame laboratorial, porém, o participante contribui para o estudo de fatores de risco aos problemas relativos à obesidade e doenças cardiovasculares, além de ter avaliado alguns aspectos de sua saúde. Desde que haja qualquer alteração na avaliação dos dados, o participante será comunicado e encaminhado conforme a necessidade, para tratamento ou acompanhamento pertinente. O participante está totalmente isento de despesas, o que já exime a possibilidade de qualquer ressarcimento.

Caso aceite participar do estudo, fica garantido a você:

- **direito de anonimato e privacidade;**
- **não será injetado ou administrado nenhum tipo de droga;**
- **todo o material de coleta é descartável e manipulado na sua presença;**
- **as coletas são realizadas por profissionais capacitados e qualificados;**
- **se for de sua vontade, esta autorização poderá ser cancelada.**

AUTORIZAÇÃO

Eu, “ _____ ”, tive acesso a todas as informações necessárias, descritas acima, tendo lido as mesmas e entendido a importância da utilização destes dados para o enriquecimento científico.

Os propósitos deste estudo ficaram claros para mim, bem como os procedimentos realizados, seus desconfortos, riscos e a garantia de confidencialidade a cerca de minha identidade e outros dados obtidos.

Minha assinatura neste Consentimento Livre e Esclarecido autoriza os responsáveis por esta pesquisa a utilizar todos os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, porém, sempre preservando minha privacidade e integridade.

Quaisquer dúvidas, poderão ser esclarecidas com o Dr. Roberto Arena, através dos fones (51) 3381-9505 ou no endereço à rua Carlos Huber, 121, Porto Alegre, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA/Canoas, (51) 34779217.

Porto Alegre, ____ / ____ / 2006.

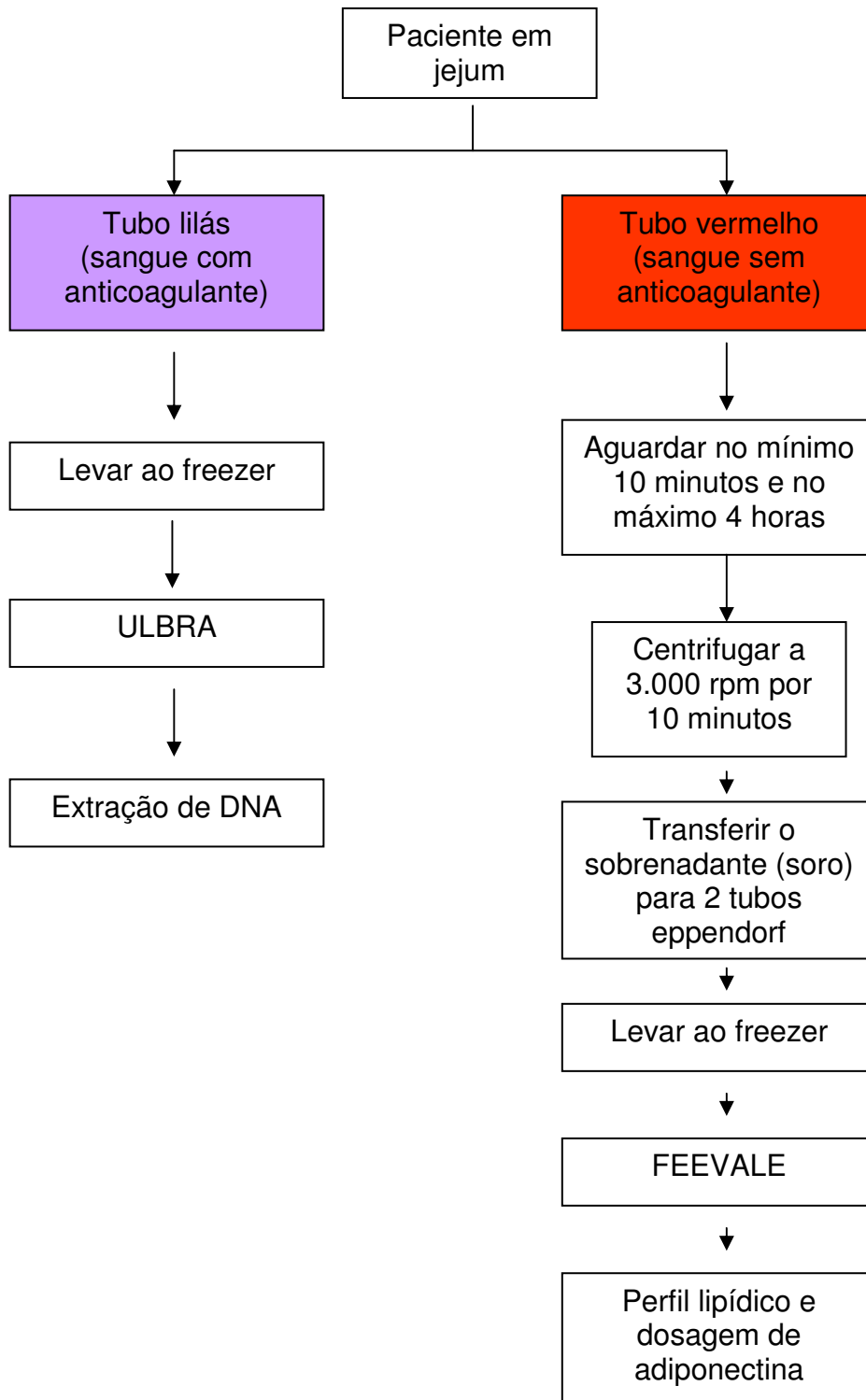
Testemunha/CPF, RG e Telefone

assinatura do voluntário

Testemunha/CPF, RG e Telefone

6.2. – Anexo 2

Fluxograma de coleta de amostras – projeto adiponectina



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNER P (1995) Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*, 27(7):435-8.
- BARON AD, BRECHTEL-HOOD, JOHNSON A, HARDIN D. Skeletal blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 1993; 21: 129-35.
- BARON AD. Vascular reactivity. *Am J Cardiol* 1999; 84: 25J-27J.
- BERTHIER MT, HOUDE A, CÔTÉ M, PARADIS AM, MAURIÈGE P, BERGERON J, GAUDET D, DESPRÉS JP, VOHL MC. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J Lipid Res*, 2005;46(2):237-44.
- BLOGOWSKA A, RZEPKA-GORSKA I, KRZYZANOWSKA-SWINIARSKA B (2005) Body composition, dehydroepiandrosterone sulfate and leptin concentrations in girls approaching menarche. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 18(10):975-83.
- BUZZETTI R, PETRONE A, ZAVARELLA S, ZAMPETTI S, SPOLETINI M, POTENZIANI S, LETO G, OSBORN J, LEONETTI F. The glucose clamp reveals an association between adiponectin gene polymorphisms and insulin sensitivity in obese subjects: *Int J Obes (Lond)*, 2007;31(3):424-8.
- CALLES-ESCADON J, MIRZA SA, SOBEL BE, SCHNEIDER DJ. Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood in normal human subjects. *Diabetes* 1998; 47: 290-3.
- CANCELLO R, TOUNIAN A, POITOU C, CLÉMENT K (2004) Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab*, 30;215-27.

- CLARKE KJ, ZHONG Q, SCHWARTZ DD, COLEMAN ES, KEMPPAINEN RJ, JUDD RL. (2003) Regulation of adiponectin secretion by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun*,312:945-9.
- CLEMENT K, FERRE P. (2003) Genetics and pathophysiology of obesity. *Pediatr Res*, 53:721-5.
- COMUZZIE AG, FUNAHASHI T, SONNENBERG G (2001) The genetic basis of plasma variation of adiponectin, a global endophenotype for obesity and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4321-5.
- CORBALAN MS, MARTI A, FORGA L, PATINO A, MARTINEZ-GONZALES MA, MARTINEZ JA (2004) Influence of two polymorphisms of the tumoral necrosis factor-alpha gene on the obesity phenotype. *Diabetes Nutr Metab*,17(1):17-22.
- COURTEN M, ZIMMET P, HODGE A, *et al.* Hyperleptinemia: the missing link in the metabolic syndrome? *Diabetes Med* 1997; 14: 200-8.
- DAYI A, BEDIZ CS, MUSAL B, YILMAZ O, KOMLEKCI A, CELILOGLU M, CINRIM D (2005) Comparison of leptin levels in serum and follicular fluid during the oestrous cycle in cows. *Acta Vet Hung*. 53(4):457-67.
- DUNDAR B, DUNDAR N, ERCI T, BOBER E, BUYUKGEBIZ A. (2005) Leptin levels in boys with pubertal gynecomastia. *J Pediatr Endocrinol Metab*,18(10):929-34.
- FILIPPI E, SENTINELLI F, TRISCHITTA V, ROMEO S, ARCA M3, LEONETTI F, DI MARIO U e BARONI M.G. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance *European Journal of Human Genetics* (2004) 12.
- FREDRIKSSON J, CARLSSON E, ORHO-MELANDER M, GROOP L, RIDDERSTRÅLE M. A polymorphism in the adiponectin gene influences adiponectin expression levels in visceral fat in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Oct 11; : 16231017
- FRAYN KN, KARPE F, FIELDING BA, MACDONALD IA, COPPACK SW. (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes*,27:875-88.

- GARG UC, HASSID A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7.
- GOLDSTEIN BJ, AHMAD F, DING W, LI PM, ZHANG WR. Regulation of insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 91-9.
- GOUNI-BERTHOLD I, GIANNAKIDOU E, FAUST M, KRATZSCH J, BERTHOLD HK, KRONE W. (2005) Resistin gene 3'-untranslated region +62G-->A polymorphism is associated with hypertension but not diabetes mellitus type 2 in a German population. *J Intern Med*,258(6):518-26.
- GU HF, ABULAITI A, OSTENSON CG, 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 Suppl 1:S31-5.
- HALLEUX CM, TAKAHASHI M, DELPORTE ML, DETRY R, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. (2001) Secretion of adiponectin and regulation of APM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*,288:1002-7.
- 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, AND 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, vol. 51: 536-40.
- HAYNES WG, MORGAN DA, WALSH AS, SIVITZ WI, MARK AL. Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin Experim Pharmacol Physiol* 1998; 25: 58-64.

- HERMSDORFF HHM, MONTEIRO JBR (2004) Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: Where is the problem? *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.48 no.6: 803-11.
- HOEFLE G, MUENDLEIN A, SAEELY CH, RISCH L, REIN P, KOCH L, SCHMID F, ACZEL S, MARTE T, LANGER P, DREXEL H. The -11377 C>G promoter variant of the adiponectin gene, prevalence of coronary atherosclerosis, and incidence of vascular events in men. Feldkirch, Austria, 2007.
- HOWARD G, O'LEARY DH, ZACCARO D, Insulin sensitivity and atherosclerosis. *Circulation* 1996; 93: 1809-17.
- HSUEH W, LAW R. Insulin signaling in the arterial wall. *Am J Cardiol* 1999; 84: 21J-24J.
- <http://www2.uerj.br/~micron/atlas/Adiposo/fundam.htm>
- <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=402>
- IRWIN ML, IRWIN ML, MCTIERNAN A, BERNSTEIN L, GILLILAND FD, BAUMGARTNER R, BAUMGARTNER K, BALLARD-BARBASH R. (2005) Relationship of obesity and physical activity with C-peptide, leptin, and insulin-like growth factors in breast cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,14(12):2881-8.
- JAZIRI R, LOBBENS S, AUBERT R, PÉAN F, LAHMIDI S, VAXILLAIRE M, PORCHAY I, BELLILI N, TICHET J, BALKAU B, FROGUEL P, MARRE M, FUMERON F. The PPARG Pro12Ala polymorphism is associated with a decreased risk of developing hyperglycemia over 6 years and combines with the effect of the APM1 G-11391A single nucleotide polymorphism: the Data From an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes*, 2006 Apr;55(4):1157-62.
- JUGE-AUBRY CE, HENRICHOT E, MÉIER CA. (2005) Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*,19(4):547-66.
- JUNG HS, PARK KH, CHO YM, CHUNG SS, CHO HJ, CHO SY, KIM SJ, KIM SY, LEE HK, PARK KS. (2005) Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006 Jan;69(1):76-85.

- KAHN BB, FLIER JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 467-72.
- KAMIGAKI M, SAKAUE S, TSUJINO I, OHIRA H, IKEDA D, ITOH N, ISHIMARU S, OHTSUKA Y, NISHIMURA M. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 13;339(2):624-32.
- KAWANAMI D, MAEMURA K, TAKEDA N, HARADA T, NOJIRI T, IMAI Y. (2004) Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytocine-endothelial cell interaction. *Biochem Biophys Res Commun*;314:415-9.
- KISHIDA K, NAGARETANI H, KONDO H. (2003) Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 286-92.
- KOJI O, OUCHI N, KIHARA S, FUNAHASHI T, NAKAMURA T, SUMITSUJI S, KAWAMOTO T, MATSUMOTO S, NAGARETANI H, KUMADA M, OKAMOTO Y, NISHIZAWA H, KISHIDA K, MAEDA N, HIRAOKA H, IWASHIMA Y, ISHIKAWA K, OHISHI M, KATSUYA T, RAKUGI H, OGIHARA T E MATSUZAWA Y. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease *Diabetes*, 2005 54:1607-1610.
- LAHIRI DK, NURNBERGER JI. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 19:5444.
- LINDSAY RS, FUNAHASHI T, KRAKOFF J. (2003) Genome-wide linkage analysis of serum adiponectin in the Pima Indian population. *Diabetes*, 52, 2419-25.
- LONG JC, WILLIAMS RC, URBANEK M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995, 56:799-810.
- LOOS RJ, RUCHAT S, RANKINEN T, TREMBLAY A, PÉRUSSE L, BOUCHARD C. 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.* 2007 Jan,85(1):26-34.
- LUO JD, ZHANG GS, CHEN MS. (2005) Leptin and cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 18 (7):427-31.
- MACKEVICS V, HEID IM, WAGNER SA, CIP P, DOPPELMAYR H, LEJNIEKS A, GOHLKE H, LADURNER G, ILLIG T, IGLSEDER B, KRONENBERG F, PAULWEBER B. The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy Caucasians. *Eur J Hum Genet*, 2006 Mar;14(3):349-56.
- MATSUZAWA, Y. FUNAHASHI, T. KIHARA, S. SHIMOMURA, I. (2004) Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:29-33.
- MATTISON R, JESEN M. (2003) The adipocyte as an endocrine cell. *Curr Op Endocrinol Diab*,10:317-21.
- MENZAGHI C, ERCOLINO T, DI PAOLA R. (2002) A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 51, 2306-12.
- MENZAGHI C, TRISCHITTA V, DORIA A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*. 2007 May,56(5):1198-209.
- MIKKAIL N, TUCK M. Insulin and the vasculature. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2: 148-53.
- MORA-JANISZEWSKA O, KULIK-RECHBERGER B, RECHBERGER T. (2005) The role of insulin resistance and resistin in pathogenesis of diabetes mellitus with special attention to diabetes in pregnancy. *Ginekol Pol*, 76(7):580-5.
- OLEFSKY JM. (2000) Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor α agonists. *J Clin Invest* , 106: 467-72.
- OHASHI K, OUCHI N, KIHARA S, FUNAHASHI T, NAKAMURA T, SUMITSUJI S, KAWAMOTO T, MATSUMOTO S, NAGARETANI H, KUMADA M, OKAMOTO Y, NISHIZAWA H, KISHIDA K, MAEDA N, HIRAOKA H, IWASHIMA Y, ISHIKAWA K, OHISHI M, KATSUYA T, RAKUGI H, OGIHARA T, MATSUZAWA Y. Adiponectin I164T mutation is associated

- with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Apr 7;43(7):1195-200.
- PALANIVEL R, MAIDA A, LIU Y, SWEENEY G. (2005) Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetology*, 9, 1-8.
- PAPADOPOULOS DP, MAKRIS TK, KRESPI PG, POULAKOU M, STAVIROULAKIS G, HATZIZACHARIAS NA, PERREA D, VOTTEAS VV. (2005) Adiponectin and resistin plasma levels in healthy individuals with prehypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*,7(12):729-33.
- PARK KG, PARK KS, KIM MJ, KIM HS, SUH YS, AHN JD. (2004) Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Res Clin Pract*,63:135-42.
- PETRIE JR, UEDA S, WEBB D, *et al.* Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 1996; 93: 1331-3.
- PICHARDO-BAHENA R, PAZ-GOMEZ FJ, ESTRADA-VILLSEÑOR EG. (2004) Obesity and steatohepatitis. Histologic aspects *Gac Med Mex.*140 Suppl 2:S33-40.
- POITOU C, LACORTE J-M, COUPAYE M, BERTRAISS S, BEDEL J-F, LAFON N, BOUILLOT J-L, GALAN P, BORSON-CHAZOT F, BASDEVAN A, COUSSIEU C, CLÉMENT K. (2005) Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obesity Surgery*, 15, 11-23.
- QI L, LI T, RIMM E, ZHANG C, RIFAI N, HUNTER D, DORIA A, HU FB. The +276 polymorphism of the APM1 gene, plasma adiponectin concentration, and cardiovascular risk in diabetic men. *Diabetes*, 2005 May;54(5):1607-10.
- QI L, DORIA A, MANSON JE, MEIGS JB, HUNTER D, MANTZOROS CS, HU FB. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2006 May;55(5):1512-6.
- RADOMSKI MW, MONCADA S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 1993; 344: 251-64.

- RAJALA MW, SCHERER PE. (2003) Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Neuroendocrinol*,144(9):3765-73.
- REA R, DONNELLY R. (2006) Effects of metformin and oleic acid on adipocyte expression of resistin. *Diabetes Obes Metab*,8(1):105-9.
- REAVEN GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 1995; 75: 473-86.
- RECASENS M, RICART W, FERNANDEZ-REAL JM. (2004) Obesity and inflammation *Rev Med Univ Navarra*. 48(2):49-54.
- RUIGE IB, ASSENDELFF WJJ, DEKKER JM, *et al*. Insulin and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Circulation* 1998; 97: 996-1001.
- SAITO F, HORI MT, FITTINGOFF M, TUCK ML. Insulin attenuates agonist-mediated calcium mobilization in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1161-8.
- SCHERRER U, RANDIN D, VOLLENWEIDER P, *et al*. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994; 94: 2511-5.
- SCHWARZ PE, GOVINDARAJALU S, TOWERS W, SCHWANEBECK U, FISCHER S, VASSEUR F, BORNSTEIN SR, SCHULZE J. Haplotypes in the promoter region of the ADIPOQ gene are associated with increased diabetes risk in a German Caucasian population. *Horm Metab Res*, 2006 Jul;38(7):447-51.
- SHULMAN GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-6.
- TAKAHASHI M, ARITA Y, YAMAGATA K. (2000) Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24, 861-8.
- TSO AW, SHAM PC, WAT NM, XU A, CHEUNG BM, RONG R, FONG CH, XU JY, CHENG KK, JANUS ED, LAM KS. Polymorphisms of the gene encoding adiponectin and glycaemic outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study. *Diabetologia*, 2006 Aug;49(8):1806-15.

- UKKOLA O, RAVUSSIN E, JACOBSON P, SJOSTRORN L, BUCHARD C. (2003) Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort. *Metabolism*, 52, 881-4.
- VASSEUR F, HELBECQUE N, DINA C, LOBBENS S, DELANNOY V, GAGET S, BOUTIN P, VAXILLAIRE M, LEPRÊTTE F, DUPONT S, HARA K, CLEMENT K, BIHAIN B, KADOWAKI T, FROGUEL P. (2002) 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. *Hum Mol Genet* 1;11(21):2607-14.
- WAJCHENBERG BL. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21(6):697-738.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation in obesity. Geneva, 1997 Jun.
- YAN WL, CHEN SF, HUANG JF, SHEN Y, QIANG BQ, LIU DH, GU DF. Common SNPs of APM1 gene are not associated with hypertension or obesity in Chinese population. *Biomed Environ Sci*. 2006 Jun,19(3):179-84.
- YANG WS, TSOU PL, LEE WJ. (2003) Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *J Mol Med* 81, 428-34.
- YURI KS, DAMASCENO DC, CALDERON IMP, RUDGE MVC. (2005) Leptina e seu papel nas funções reprodutivas. *Rev. Fêmina.*, vol. 33, nº 5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)