

## AValiação DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO GENE *ADIPOQ* E SUA RELAÇÃO COM A PREDISPOSIÇÃO AO CâNCER

Clara Ribeiro de Oliveira, Bianca Espindola Martins, Matheus Salgado de Oliveira, Renata de Azevedo Canevari

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, clarinhariibs@gmail.com, rcanevari@univap.br

### Resumo

O câncer é uma doença genética resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. O gene *ADIPOQ*, localizado no cromossomo 3q27, codifica uma proteína que exerce funções anti-inflamatórias e antiangiogênicas. O polimorfismo +45 T/G localizado no éxon 2 deste gene tem sido associado ao risco de desenvolvimento de câncer. O objetivo deste estudo consistiu em analisar o polimorfismo +45 T/G (rs2241766) do gene *ADIPOQ* e avaliar se o mesmo está relacionado com o desenvolvimento de câncer em indivíduos brasileiros. Amostras de DNA foram extraídas do sangue de 32 participantes divididos em dois grupos: 12 indivíduos com histórico de câncer e 20 indivíduos sem o diagnóstico desta doença (grupo controle). Após a quantificação do DNA extraído, a PCR foi realizada obtendo-se um amplicon de 372 pb. A genotipagem foi realizada pela técnica PCR-RFLP com a endonuclease *Sma*I, que na presença do alelo G gera fragmentos de 219 pb e 153 pb. Ambos os genótipos TT e TG foram observados na amostra utilizada, contudo não foi observada relação dos alelos T ou G com o maior risco de desenvolvimento de câncer nesta população.

**Palavras-chave:** Gene. *ADIPOQ*. Polimorfismo. Câncer.

**Área do Conhecimento:** Biomedicina.

### Introdução

O câncer é uma doença genética, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Dados atualizados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer (IARC) revelaram cerca de 19,98 milhões de novos casos de câncer e 9,74 milhões de mortes relacionadas ao câncer no mundo em 2022 (Cao *et al.*, 2024). No Brasil, no triênio de 2023-2025, dos 704 mil novos casos de câncer registrados a cada ano, 70% são provenientes das regiões Sul e Sudeste do país (INCA, 2022). Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, incluindo inúmeros fatores ambientais e hereditários (Lewandowska *et al.*, 2019). A predisposição genética é uma causa importante na susceptibilidade ao desenvolvimento de várias neoplasias, envolvendo a herança de variações genéticas, tais como polimorfismos genéticos do tipo SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) que aumentam o risco de um indivíduo desenvolver a doença (Onay *et al.*, 2006).

O gene *ADIPOQ* localizado no cromossomo 3q27 é composto por três éxons e dois íntrons (Han *et al.*, 2020). Este gene codifica a adiponectina, uma proteína importante na regulação de processos metabólicos e com ação em diversas vias, possuindo papéis anti-inflamatórios, antiproliferativos, inibição da angiogênese, indução de apoptose, além de regular o metabolismo glicídico e lipídico, bem como a ação da insulina (Parida; Siddharth; Sharma, 2019). Em condições fisiológicas, a adiponectina é uma proteína abundante na circulação sistêmica. Entretanto, em condições patológicas caracterizadas por inflamação crônica, como diabetes mellitus tipo 2, obesidade, aterosclerose, doenças cardiovasculares e nefropatia, observa-se diminuição das concentrações séricas desta proteína (Di Zazzo *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2020) possuindo assim, uma concentração sérica inversamente relacionada à adiposidade e à resistência a insulina (Han *et al.*, 2020). A inflamação crônica induzida leva à superexpressão do TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL18 (interleucina 18) e outras citocinas pró-inflamatórias que também são conhecidas por inibir a adiponectina (Parida; Siddharth; Sharma, 2019).

Vários estudos têm detectado relação de alguns SNPs do genoma com o desenvolvimento de determinados cânceres. Especificamente, o alelo G do SNP +45 T/G presente no éxon 2 do gene

*ADIPOQ* (rs2241766) tem sido associado com o risco de câncer em algumas populações (Hu *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Maleki *et al.*, 2022). No Brasil, para o nosso conhecimento, não há estudo que avalia a relação do polimorfismo +45 T/G do gene *ADIPOQ* com a predisposição ao câncer.

Considerando a alta incidência de diversos tipos de câncer na população brasileira e a relação de determinados SNPs com o risco aumentado de desenvolvimento de doenças genéticas multifatoriais, este estudo tem como objetivo analisar o SNP +45 T/G (rs2241766) do gene *ADIPOQ* pela técnica de PCR-RFLP para investigar se há relação entre este polimorfismo e o risco aumentado de desenvolver câncer em indivíduos brasileiros.

## Metodologia

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos nº 5.810.129. Na casuística foram incluídos 32 participantes classificados em dois grupos: 12 indivíduos com histórico de câncer pessoal (grupo experimental) e 20 indivíduos com ausência de diagnóstico de câncer em sua história de vida (grupo controle). No grupo controle foi determinado como critério de exclusão indivíduos com idade inferior a 50 anos. Todos os participantes preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e um questionário sobre seu histórico pessoal e clínico.

As coletas de sangue dos participantes, realizadas no Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDLAB), foram obtidas por punção venosa. A extração do DNA da papa leucocitária, obtida de cada amostra de sangue, foi realizada utilizando o protocolo de fenol: clorofórmio. A quantificação e a avaliação da qualidade do DNA foram realizadas por espectroscopia de absorção ultravioleta no equipamento *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)*, mediante às razões 260/280 e 260/230, que avalia a contaminação por proteínas e reagentes, respectivamente, considerando que o DNA absorve a luz no comprimento de onda de 260nm, as proteínas em 280nm e reagentes em 230nm.

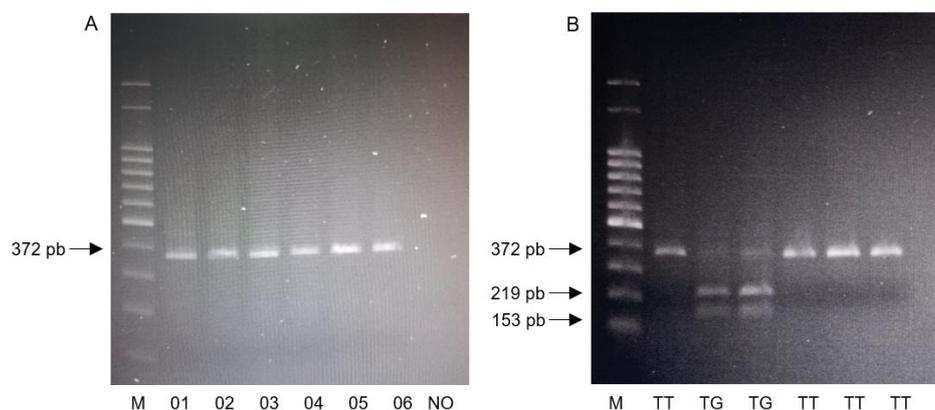
A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificar a sequência do gene *ADIPOQ* que contém o SNP +45 T/G presente no éxon 2 deste gene. As sequências dos iniciadores que flanqueiam este polimorfismo utilizadas foram 5'-GAAGTAGACTCTGCTGAGATGG-3' (*sense*) e 3'-TATCAGTGTAGGAGGTCTGTGATG-5' (*antisense*), amplificando uma região de 372 pb com temperatura de anelamento de 59°C. A avaliação da amplificação pela PCR foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 1,6%. A genotipagem das amostras foi realizada pela PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *SmaI*, que reconhece a sequência alvo e rompe as ligações fosfodiéster do DNA no sítio CCC↓GGT. Amostras com a presença do genótipo GG, resultam em dois fragmentos de 219 pb e 153 pb. Amostras com o genótipo heterozigoto TG resultam em três fragmentos: 372 pb, 219 pb e 153 pb. Amostras de genótipo homozigoto TT, significando ausência de corte pela enzima, resultam em um produto amplificado não digerido de 372 pb.

Os produtos digeridos pela PCR-RFLP foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,6% corado com brometo de etídio (3 µg/ml). O equipamento *transilluminator-D Pro MiniBIS (DNR Bio-Imaging Systems Ltd)* foi utilizado para a visualização das bandas formadas no gel de agarose, referente aos fragmentos digeridos e as imagens foram capturadas utilizando-se o software *GelCapture* para posterior identificação dos genótipos das amostras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste qui-quadrado no software *GraphPad Prism 5*, com significado estatístico de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

Na figura 1A é observada, após a realização da PCR e eletroforese em gel de agarose, a amplificação do gene *ADIPOQ* pela visualização do amplicon de 372 pb que contém o polimorfismo +45 T/G deste gene. Na figura 1B são observadas, após a realização da técnica de PCR-RFLP, as bandas de 372 pb, 219 pb e 153 pb geradas após a digestão do amplicon com a enzima *SmaI*.

Figura 1 – Análise da PCR (A) e PCR-RFLP (B) referente aos produtos amplificados do polimorfismo +45 T/G do gene *ADIPOQ* em gel de agarose. A presença do sítio de restrição *Sma*I (alelo G) resultou em dois fragmentos de: 219 pb e 153 pb. A ausência do sítio de restrição (alelo T) resultou em um produto não digerido de 372 pb.



Fonte: A autora, 2024.

As amostras foram analisadas de acordo com os genótipos identificados pela análise de PCR-RFLP. No grupo experimental, que consiste em 12 indivíduos que já apresentaram diagnóstico de câncer, todos eles (100%) apresentaram o genótipo TT. No grupo controle, constituído por 20 indivíduos com ausência de diagnóstico de câncer em sua história de vida, 18 (90%) apresentaram o genótipo TT e somente dois indivíduos (10%) apresentaram o genótipo TG. Devido ao pequeno número amostral, a análise estatística entre os genótipos e a presença ou ausência de câncer não foi realizada, mas pela alta frequência observada do alelo T em ambos os grupos, observa-se a ausência de relação do SNP +45 T/G do gene *ADIPOQ* com a predisposição ao câncer.

Os dados pessoais, clínicos e os resultados da genotipagem de cada um dos participantes estão apresentados na tabela 1. Estes dados foram analisados e comparados pelo teste qui-quadrado, considerando associações estatisticamente significativas com  $p \leq 0,05$ .

Na comparação entre a presença ou ausência de câncer e as características observadas como alelos, idade, gênero, índice de massa corporal (IMC), tabagismo, ingestão de álcool, alimentação saudável e prática de exercícios físicos, o único resultado estatisticamente significativo foi na comparação do IMC com a presença ou ausência de câncer, onde os participantes do grupo controle foram predominantemente associados a um IMC acima de 25 Kg/m<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ), o que caracteriza indivíduos com sobrepeso. Nas demais características analisadas não foi observado diferença estatisticamente significativa com a presença ou ausência de câncer ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

A análise de dados populacionais disponíveis em banco de dados indica que cerca de 90% da população global possui o alelo T, enquanto apenas 10% apresentam o alelo G, o que está em concordância com nossos achados, considerando o tamanho reduzido da amostra estudada (NCBI dbSNP, 2024).

A hipótese deste estudo é a existência de relação do alelo G do polimorfismo SNP +45 T/G (rs2241766) do gene *ADIPOQ* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer na população brasileira. Essa hipótese se baseia em estudos prévios da literatura que demonstraram associação do alelo G com a redução dos níveis séricos de adiponectina, sabendo-se que a redução de expressão desta proteína está relacionada com a inflamação crônica, um mecanismo frequentemente implicado na carcinogênese (Govindarajan *et al.*, 2023; Maleki *et al.*, 2022; Gu *et al.*, 2018). Contudo, os resultados obtidos em nosso estudo não demonstraram associação significativa entre o polimorfismo +45 T/G e a predisposição ao câncer. A pequena amostra populacional foi um fator limitante, possivelmente comprometendo a capacidade de detectar associações estatisticamente significativas.

Além disso, a disparidade no número de participantes entre os grupos experimental e controle pode ter influenciado nos resultados.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos com histórico de câncer (grupo experimental) e com ausência de câncer (grupo controle) em relação às características alélicas, pessoais e clínicas dos pacientes.

Características	Grupo experimental	Frequência (%)	Grupo Controle	Frequência (%)	valor de <i>p</i>
<b>Alelos</b>					0.1289
T	12	37,5%	18	56,25%	
G	0	0	2	6,25%	
<b>Idade</b>					0.2326
50 ≥	12	37,5%	20	62,5%	
50 <	0	0	0	0	
<b>Gênero</b>					0.1624
Feminino	7	21,9%	15	46,9%	
Masculino	5	15,6%	5	15,6%	
<b>IMC*</b>					0.0101
IMC ≤ 24,9	5	15,6%	1	3,1%	
IMC ≥ 25	7	21,9%	19	59,4%	
<b>Tabagismo</b>					0.7348
Sim	1	3,1%	2	6,25%	
Não	11	34,4%	18	56,25%	
<b>Ingestão de álcool</b>					0.7348
Sim	1	3,1%	2	6,25%	
Não	11	34,4%	18	56,25%	
<b>Alimentação saudável</b>					0.4075
Sim	10	31,25%	16	50%	
Não	2	6,25%	4	12,5%	
<b>Atividade física</b>					0.0989
Sim	5	15,6%	13	40,6%	
Não	7	21,9	7	21,9	

\*IMC: índice de massa corporal; \* diferença estatisticamente significativa  $p \leq 0,05$ .

Fonte: A autora, 2024.

Estudos em populações orientais realizados na população coreana (Hsueh *et al.*, 2018), chinesa (Lu *et al.*, 2022) e do Taiwan (Ou *et al.*, 2014) também não detectaram associação significativa do SNP +45 T/G do gene *ADIPOQ* com o desenvolvimento câncer colorretal. Além disso, Hung *et al.*, (2020) também não identificaram relação entre este polimorfismo +45 T/G do gene *ADIPOQ* com o câncer de células renais na população de Taiwan. Esses resultados indicam ausência de associação do polimorfismo +45 T/G do gene *ADIPOQ* em determinados tipos de câncer nessas populações.

Contudo, outros trabalhos realizados em outras populações identificaram uma relação contrária, ou seja, que a presença do alelo G deste SNP exerceria um fator protetor, bem como estaria associado a um menor risco de desenvolver câncer de mama nas populações da Turquia (Özgöz *et al.*, 2021) e México (Macías-Gómez *et al.*, 2019). Da mesma forma, a associação entre o alelo G como um fator protetor e redução do risco de câncer colorretal foi observada em populações da Arábia Saudita (Al-Harithy; Al-Zahrani, 2012) e México (Partida-Pérez *et al.*, 2011).

Em contrapartida, de acordo com a nossa hipótese e a função do gene *ADIPOQ* e a proteína adiponectina, outros trabalhos relataram associação do alelo G do SNP +45 T/G com o risco aumentado de desenvolver alguns tipos de câncer. Por exemplo, na população iraniana, o genótipo TG foi identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer papilífero de tireoide (Maleki *et al.*, 2022). Estudos realizados com a população chinesa observaram que indivíduos portadores dos genótipos TG e GG apresentaram um risco maior de câncer colorretal em comparação com aqueles com o genótipo TT (Hu *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015).

Os indivíduos que sofrem de obesidade possuem altas taxas de incidência e mortalidade por câncer, já que o ambiente inflamatório desses pacientes pode promover a carcinogênese (Hu *et al.*, 2013). No presente estudo, observou-se uma associação estatisticamente significativa entre o grupo controle e o

índice de massa corporal (IMC) com média acima de 25 Kg/m<sup>2</sup>, sendo um fator que caracteriza o sobrepeso. Sabendo-se que a obesidade é um fator de risco alto para o desenvolvimento de câncer (Parida; Siddharth; Sharma, 2019), os participantes do grupo controle devem manter um acompanhamento regular, focando na gestão de fatores de risco, como a alta adiposidade, adotando medidas preventivas, incluindo uma dieta equilibrada, exercício físico regular e monitoramento contínuo dos parâmetros metabólicos e inflamatórios.

## Conclusão

Nossos resultados não evidenciaram uma associação significativa entre o polimorfismo +45 T/G do gene *ADIPOQ* (rs2241766) e a susceptibilidade ao câncer na população brasileira. Contudo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos valores de IMC, com os indivíduos controles apresentando um média de IMC mais elevado. Esses achados sugerem que, embora o polimorfismo rs2241766 deste gene não tenha mostrado relação com o risco de câncer, o IMC elevado em indivíduos sem a doença indica a necessidade de investigações adicionais sobre o papel da adiposidade na carcinogênese. Análises adicionais em um número amostral maior e mais homogêneo em ambos os grupos e abordagens que considerem outros fatores de risco são necessárias para avaliar com maior precisão a relação deste polimorfismo com o desenvolvimento dos tumores e para um melhor esclarecimento da complexa relação entre polimorfismos genéticos e o risco de câncer.

## Referências

- AL-HARITHY, R. N.; AL-ZHRANI, M. H. The adiponectin gene, *ADIPOQ*, and genetic susceptibility to colon cancer. **Oncology Letters**, v. 3, n. 1, p. 176–180, jan. 2012.
- CAO, W. et al. Socioeconomic inequalities in cancer incidence and mortality: An analysis of GLOBOCAN 2022. **Chinese Medical Journal**, v. 137, n. 12, p. 1407–1413, jun. 2024.
- DI ZAZZO, E. et al. Adiponectin as link factor between adipose tissue and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 839, fev. 2019.
- GOVINDARAJAN, S. et al. Association of serum adiponectin levels and *ADIPOQ* SNP rs2241766 with breast cancer risk in Indian women. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 19, n. 5, p. 1379–1384, jul. 2023.
- GU, L. et al. Serum adiponectin in breast cancer: A meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 29, p. E11433, jul. 2018.
- GUO, X. et al. Association between adiponectin polymorphisms and the risk of colorectal cancer. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 19, n. 1, p. 9–13, jan. 2015.
- HAN, Q. et al. *ADIPOQ* rs2241766 gene polymorphism and predisposition to diabetic kidney disease. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, n. 1, p. 5158497, jun. 2020.
- HSUEH, Y.-M. et al. Adiponectin gene polymorphisms and obesity increase the susceptibility to arsenic-related renal cell carcinoma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 350, p. 11–20, jul. 2018.
- HU, X. et al. Gene polymorphisms of *ADIPOQ* +45T>G, *UCP2* -866G>A, and *FABP2* Ala54Thr on the risk of colorectal cancer: A matched case-control study. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67275, jun. 2013.
- HU, X. et al. Gene polymorphisms related to insulin resistance and gene-environment interaction in colorectal cancer risk. **Annals of Human Biology**, v. 42, n. 6, p. 560–568, nov. 2015.
- HUNG, Y. C. et al. Association of adiponectin genotypes with colorectal cancer susceptibility in Taiwan. **Anticancer Research**, v. 40, n. 3, p. 1297–1306, mar. 2020.

INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025 — Instituto Nacional de Câncer - INCA. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 27 ago. 2024.

LEWANDOWSKA, A. et al. Environmental risk factors for cancer – review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1–7, mar. 2019.

LU, Y.-T. et al. The interaction between glycemic index, glycemic load, and the genetic variant ADIPOQ T45G (rs2241766) in the risk of colorectal cancer: a case–control study in a Korean population. **European Journal of Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 2601–2614, ago. 2022.

MACÍAS-GÓMEZ, N. M. et al. ADIPOQ rs2241766 SNP as protective marker against DIBC development in Mexican population. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214080, 18 mar. 2019.

MALEKI, M. et al. Correlation between adiponectin rs2241766 and rs266729 polymorphisms and risk of papillary thyroid cancer. **Molecular Biology Research Communications**, v. 11, n. 3, p. 113–118, set. 2022.

OU, Y. et al. Associations between variants on ADIPOQ and ADIPOR1 with colorectal cancer risk: a chinese case-control study and updated meta-analysis. **BMC Medical Genetics**, v. 15, n. 1, p. 137, dez. 2014.

ONAY, V. Ü. et al. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. **BMC Cancer**, v. 6, n. 1, p. 114, dez. 2006.

ÖZGÖZ, A. et al. Postmenopausal estrogen receptor positive breast cancer and obesity associated gene variants. **EXCLI Journal**, v. 20, p. 1133–1144, jul. 2021.

rs2241766 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2241766>. Acesso em: 27 ago. 2024.

PARIDA, S.; SIDDHARTH, S.; SHARMA, D. Adiponectin, obesity, and cancer: Clash of the bigwigs in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2519, maio. 2019.

PARTIDA-PÉREZ, M. et al. Association of LEP and ADIPOQ common variants with colorectal cancer in Mexican patients. **Cancer Biomarkers**, v. 7, n. 3, p. 117–121, 21 jan. 2011.

YE, L. et al. A population-specific correlation between ADIPOQ rs2241766 and rs 1501299 and colorectal cancer risk: a meta-analysis for debate. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 2, p. 307–315, abr. 2017.

VAN HERCK, Y. et al. Is cancer biology different in older patients? **The Lancet Healthy Longevity**, v. 2, n. 10, p. e663–e677, out. 2021.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDLAB) pela coleta de amostras de sangue e ao Laboratório de Biologia Molecular do Câncer pelo auxílio na captação dos voluntários e pelas análises moleculares.