



PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-RFLP PARA AVALIAÇÃO DO SNP -C11377G DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA ADIPONECTINA

**SANTOS, Betânia Rodrigues¹; SILVA, Liziane Pereira¹; MINTEN, Gicele Costa⁴;
MILECH, Cristini²; SPRITZER, Poli Mara³; HORTA, Bernardo Lessa⁴; OLIVEIRA,
Isabel Oliveira⁵**

1- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Acadêmica de Ciências Biológicas, Laboratório de Fisiologia Molecular, DFF, Pelotas, RS-Brasil. 2- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Bióloga, Laboratório de Fisiologia Molecular, DFF, Pelotas, RS-Brasil. 3- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -Departamento de Fisiologia. 4- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. 5- Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Laboratório de Fisiologia Molecular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Pelotas, RS-Brasil.
betaniabio@yahoo.com.br

1) INTRODUÇÃO

A Adiponectina é uma proteína secretada pelo tecido adiposo que regula a sensibilidade tecidual à insulina (Arita *et al.*, 1999), diminui os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e de triglicerídeos no músculo e no fígado (Fruebis *et al.*, 2001), além de apresentar efeitos supressores sobre a aterogênese. O gene que codifica para essa proteína foi identificado e está localizado no cromossomo 3q27 (Schaffler *et al.*, 1998).

A relação da adiponectina com doenças metabólicas foi fortalecida pelo mapeamento de um *locus* para suscetibilidade à diabetes (Takahashi *et al.*, 2000), doenças coronárias (Francke *et al.*, 2001) e acúmulo de tecido adiposo (Kissebah *et al.*, 2000) no mesmo cromossomo onde se encontra o gene da adiponectina. Além disso, os níveis plasmáticos de adiponectina são menores em pessoas obesas ou com diabetes tipo 2, quando comparadas a uma população controle (Arita *et al.*, 1999).

Estudos genéticos envolvendo o gene da adiponectina têm focado sua atenção em diferentes Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs). Entre eles, o SNP T45G (localizado no éxon 2) e o SNP G276T (localizado no intron 2) estão significativamente associados com diabetes tipo 2 em japoneses com sensibilidade reduzida à insulina (Hara *et al.*, 2002). Em caucasianos não diabéticos de descendência alemã e sem história familiar de diabetes, o SNP T45G foi associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de obesidade e, secundariamente, para a resistência à insulina (Stumvoll *et al.*, 2002). Da mesma forma, num estudo de haplótipos envolvendo os SNPs T45G e G276T realizado em italianos caucasianos não diabéticos foi observada uma associação com resistência à insulina e obesidade (Menzaghi *et al.*, 2002).

Outros SNPs estudados no gene da adiponectina são o -11377 e o -11391, localizados na região promotora do gene, os quais correspondem a troca de uma

base C por uma base G e de uma G por uma base A, respectivamente. Em franceses, o haplótipo incluindo os SNPs -G11391A e -C11377G apresenta associação com os níveis de adiponectina circulante e com diabetes tipo 2 (Vasseur *et al.*, 2002). Por outro lado, em chineses com diabetes tipo 2, os SNPs T45G e -C11377G foram associados com uma maior eficácia da terapia com múltiplas doses de rosiglitazone, uma droga usada no tratamento da diabetes (Sun *et al.*, 2008)

Com isso, percebe-se que as variações no gene da adiponectina estão envolvidas com os mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas e que existem diferenças nos SNPs envolvidos conforme a população estudada. O objetivo do trabalho foi padronizar a metodologia de PCR-RFLP para avaliar o SNP -C11377G do gene da adiponectina. A partir desta padronização, será realizado um estudo para avaliar a distribuição do SNP- C11377G em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas/RS no ano de 1982, e sua relação com fatores de risco para a Síndrome Metabólica.

2) MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram utilizadas amostras de DNA pertencentes ao banco da coorte 1982 da cidade de Pelotas. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento de coleta de sangue, no qual estava salientada a utilização das amostras em estudos científicos. O material genômico foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico humano com base no protocolo de Miller e colaboradores (1988).

A genotipagem do SNP -C11377G foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP) com utilização da enzima de restrição *HhaI* (5'...GCG^VC...3') da empresa New England Biolabs.

Para a padronização do PCR foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1,5µL e 1,8µL), de dNTPs (1,0µL e 1,2µL) e de *primers* (0,7µL e 1,0µL). Para a reação de digestão enzimática, testou-se a utilização de 10µL e 15µL do produto de PCR.

Na reação de PCR foram utilizados os *primers forward* (ACTTGCCCTGCCTCTGTCTG) e *reverse* (GCCTGGAGAACTGGAACGTG) na condição de 35 ciclos, com temperatura de anelamento de 57°C, gerando fragmentos de 250 pb. A digestão enzimática consistiu de 2 etapas, sendo a primeira uma incubação à 37°C por duas horas, seguida por uma incubação à 80°C por 20 minutos. A verificação das reações foi feita por eletroforese em gel de agarose 2,0% para o PCR, e de 4,0% para a digestão enzimática.

Um indivíduo pode apresentar os dois alelos sem a substituição do nucleotídeo C pelo G (genótipo homozigoto CC – 1 banda), um alelo com e outro sem a substituição das bases (genótipo heterozigoto CG – 3 bandas) ou, ainda, os dois alelos com a presença da substituição das bases (genótipo homozigoto GG – 2 bandas).

Após a padronização da técnica foram selecionados, de forma aleatória, 65 indivíduos pertencentes ao banco de DNA da coorte de 1982. Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste do Qui-quadrado, programa SPSS versão para windows 10.

3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos testes com variações nas quantidades dos reagentes, a reação de PCR ficou padronizada com 1,8µL de cloreto de magnésio, 1,2µL de dNTPs e 1,0µL de *primers*. A reação de digestão enzimática foi padronizada com a utilização de 15µL de produto de PCR. A partir do estabelecimento dessas condições foi obtida uma boa visualização das bandas em gel de agarose, uma vez que a diferença no tamanho dos fragmentos é muito pequena.

A amostra estudada apresenta-se em Equilíbrio de Hard-Weinberg (EHW) ($\chi^2 = 0,022$; $p=0,05$), com uma frequência de 0,82 para o alelo selvagem (C) e de 0,18 para o alelo mutado (G). Os genótipos apresentaram uma distribuição de 66% para o homocigoto CC, de 31% para o heterocigoto CG e de 3% para o homocigoto GG.

Existem variações nas frequências alélicas e genotípicas para o SNP - C11377/G dentro de diferentes populações. Em Chineses não-diabéticos a distribuição alélica descrita é de 0,79 para o C e 0,21 para o G. Nesse mesmo estudo Sun *et al.* (2008) detectaram um aumento na frequência dos genótipos com alelo mutado em indivíduos com diagnóstico de diabetes tipo 2 (CC=0,48; CG= 0,47; GG= 0,05). Em Coreanos, Jang *et al.* (2008) observaram que a presença em homocigose do alelo G (G=0,27) está associada aos baixos níveis de adiponectina circulante (CC=0,53; CG=0,40; GG=0,07). Por outro lado, Gu *et al.* (2004), num estudo realizado com a população sueca, verificaram que as frequências alélicas apresentavam distribuição inversa às encontradas em outros países, sendo a presença do alelo C apontada como fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 .

4) CONCLUSÃO

Após essa etapa inicial de padronização da técnica de PCR-RFLP, pretende-se dar continuidade ao estudo procedendo-se a genotipagem dos indivíduos da coorte de 82, para que possam ser avaliadas associações do SNP -C11377G com componentes da Síndrome Metabólica numa amostra da população brasileira.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARITA, Y., KIHARA, S., OUCHI, N., TAKAHASHI, M., MAEDA, K., MIYAGAWA, J., HOTTA, K., SHIMOMURA, I., NAKAMURA, T., MIYAOKA, K., KURIYAMA, H., NISHIDA, M., YAMASHITA, S., OKUBO, K., MATSUBARA, K., MURAGUCHI, M., OHMOTO, Y., FUNAHASHI, T., MATSUZAWA, Y. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. **Biochem Bioph Res Communications**, 1999, 257, p. 79-83.
- FRANCKE, S., MANRAJ, M., LACQUEMANT, C., LECOEUR, C., LEPRETRE, F., PASSA, P., HEBE, A., CORSET, L., YAN, S. L., LAHMIDI, S., JANKEE, S., GUNNESS, T. K., RAMJUTTUN, U. S., BALGOBIN, V., DINA, C., FROGUEL, P. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. **Hum Mol Genet**, 2001, 10, p.2751–2765.
- FRUEBIS, J., TSAO, TS., JAVORSCHI, S., EBBETS-REED, D., ERICKSON, M. R. S., YEN, F. T., B. E., LODISH, H. F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001, 98, p. 2005-2010.

GU, H. F., ABULAITI, A., OSTENSON, C-G., HUMPHREYS, K., WAHLESTEDT, C., BROOKES, A. J., EFENDIC, S. Single Nucleotide Polymorphisms in the Proximal Promoter Region of the Adiponectin (*APM1*) Gene Are Associated With Type 2 Diabetes in Swedish Caucasians. **Diabetes**, 2004, 53, p.31-35.

HARA, K., BOUTIN, P., MORI, Y., TOBE, K., DINA, C., YASUDA, K., YAMAUCHI, T., OTABE, S., OKADA, T., ETO, K., KADOWAKI, H., HAGURA, R., AKANUMA, Y., YAZAKI, Y., NAGAI, R., TANIYAMA, M., MATSUBARA, K., YODA, M., NAKANO, Y., KIMURA, S., TOMITA, M., KIMURA, S., ITO, C., FROGUEL, P., KADOWAKI, T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. **Diabetes**, 2002, 51, p.536–540.

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

KISSEBAH, A. H., SONNENBERG, G. E., MYKLEBUST, J., GOLDSTEIN, M., BROMAN, K., JAMES, R. G., MARKS, J. A., KRAKOWER, G. R., JACOB, H. J., WEBER, J., MARTIN, L., BLANGERO, J., COMUZZIE, A. G. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97, p.14478–14483.

MENZAGHI, C., ERCOLINO, T., PAOLA, R. D., BERG, A. H., WAARAM, J. H., SCHERER, P. E., TRISCHITTA, V., DORIA, A. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. **Diabetes**, 2002, 51, p.2306–2312.

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

SUN, H., GONG, Z-C., YIN, J-Y., LIU, H-L., LIU, Y-Z., GUO, Z-W., ZHOU, H-H., WU, J., LIU Z-Q. The association of adiponectin allele *45T/G* and *-11377C/G* polymorphisms with Type 2 diabetes and rosiglitazone response in Chinese patients. **Br J Clin Pharmacol**, 2008, 65, p.917–926.

SCHAFFLER, A., LANGMANN, T., PALITZSCH, K. D., SCHOLMERICH, J., SCHMITZ, G. Identification and characterization of the human adipocyte *apM-1* promoter. **Biochim Biophys Acta**, 1998, 1399, p.187–197.

STUMVOLL, M., TSCHRITTER, O., FRITSCHKE, A., STAIGER, H., RENN, W., WEISSER, M., MACHICAO, F., HARING, H. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. **Diabetes**, 2002, 51, p.37–41.

TAKAHASHI, M., ARITA, Y., YAMAGATA, K., MATSUKAWA, Y., OKUTOMI, K., HORIE, M., SHIMOMURA, I., HOTTA, K., KURIYAMA, H., KIHARA, S., NAKAMURA, T., YAMASHITA, S., FUNAHASHI, T., MATSUZAWA, Y. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. **Intern J of Obesity**, 2000, 24, p.861-868.

VASSEUR, F., HELBECQUE, N., DINA, C., LOBBENS, S., DELANNOY, V., GAGET, S., BOUTIN, P., LEPRETRE, L., DUPONT, S., HARA, K., KADOWAKI, T., FROGUEL, P. Single nucleotide polymorphisms haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of *APM1* gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. **Hum Mol Genet**, 2002, 11, p.2607–2614.

Apoio: CNPq, FAPERGS, Wellcome Trust Foundation