

PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO Gln223Arg DO RECEPTOR DE LEPTINA POR PCR

GABRIELLE GASPAR AREJANO¹;
BRUNA ANJOS PEDERZOLI²; DANIELLE LEAL DELABARY²;
ELIZABETE HELBIG²; AUGUSTO SCHNEIDER²; CARLOS CASTILHO BARROS³

¹Universidade Federal de Pelotas - gabiarejano@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- brunaperderzoli@gmail.com; daninutricao@hotmail.com.br;
helbignt@gmail.com; augustoschneider@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - barros_cc@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO:

A obesidade tem sido considerada uma epidemia mundial. Estima-se que já afeta aproximadamente 310 milhões de pessoas (WHO; Popkin e Doak., 1998). Tem como principal causa o aumento do sedentarismo e do consumo de alimentos com alto valor energético. (Pereira et al., 1999). A leptina é um hormônio proteico secretado principalmente pelos adipócitos. Sua ação principal se dá no sistema nervoso central, mais precisamente no hipotálamo. Tem como principais funções a regulação da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético. Sendo conhecido como hormônio da saciedade. Sua concentração plasmática está diretamente relacionada com a quantidade de tecido adiposo do indivíduo. Por isso, indivíduos obesos apresentam alta concentração de leptina, porém mantém a ingestão alimentar aumentada devido ao desenvolvimento de resistência a este hormônio. (UFTM., 2011).

A leptina exerce sua ação pela ativação de seu receptor, o qual possui cinco isoformas diferentes em humanos, Ra, Rb, Rc, Rd e Re. A forma Rb contém o box STAT (Transdutoras e Ativadoras do Sinal de Transcrição) sendo esta a única forma que ativa as vias de sinalização intracelulares estando distribuído pela maioria dos tecidos inclusive hipotálamo. Já as outras formas não possuem domínio intracelular ou este é incompleto, portanto não possuem todos os mecanismos de ação quanto à isoforma longa (Rb) dispõe (CHEN et. al., 1996; LEE et. al., 1996; Frühbeck et al., 2001; Rosmond et. al., 2000). Sabe-se que pelo menos um polimorfismo do gene do receptor está relacionado à predisposição à obesidade, por alterar a afinidade do receptor com seu hormônio (Quinton et. al., 2001). Este polimorfismo, denominado Gln223Arg, tem sido relacionado a modificações no metabolismo celular, ao estado nutricional e principalmente à obesidade (Rosmond et. al., 2000). Este é um Polimorfismo do tipo de nucleotídeo único (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), no qual ocorre a substituição de adenina uma por uma guanina alterando o código do aminoácido glutamina para uma arginina, no códon 223 do éxon 6. Pode ser denominado também como rs1137101. A genotipagem deste polimorfismo tem sido feita por técnica chamada de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), onde após a amplificação da região do DNA por PCR, o produto é submetido a digestão por endonuclease específica e analisado em gel de agarose após eletroforese.

O presente trabalho tem com objetivo padronizar técnica mais simples para genotipagem do polimorfismo do receptor de leptina que esta fortemente relacionado a desequilíbrios nutricionais, mais precisamente com a obesidade.

2. METODOLOGIA:

2.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE CÉLULAS BUCAIS:

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA genômico (gDNA) que utiliza proteinase K. Após coleta, as células bucais foram colocadas em tubo contendo 600 uL de solução de lise (Quiagen Sciences, Cat. No. 158908, EUA) e Proteínase K (Invitrogen[®], Cat. No. 25530-015, Alemanha) e incubadas por 4 horas à 55°C. Após centrifugação e retirada do algodão de coleta, foram adicionados 200 uL de solução de precipitação de proteínas (Quiagen Sciences, Cat. No. 158912, EUA). O sobrenadante foi salvo em outro tubo, após centrifugação o gDNA foi precipitado pela adição de 600 uL isopropanol seguido por centrifugação. O pellet contendo o gDNA foi lavado com etanol 75% e hidratado com 30 uL de água ultra pura.

2.2. Estratégia para genotipagem usando apenas a reação em cadeia da polimerase (PCR):

Para reduzir os custos com a compra de enzimas, desenhamos iniciadores nucleotídeos (primers) capazes de anelar especificamente em cada alelo, na região onde ocorre o polimorfismo. Estes primers foram chamados de internos e estão representados na Tabela 1. Estes primers foram desenhados para anelar em fitas opostas, combinando com primers mais distantes da mutação, os quais foram chamados de primers externos. Os primers externos também servem como controle da reação, pois amplificam um fragmento de 366 pares de bases ambos os alelos. Na Figura 1 temos um esquema mostrando como os primers anelam a fita do gDNA a fim de produzir diferentes produtos dependendo do alelo presente na amostra.

Tabela 1: Primers usados para genotipagem do polimorfismo Gln223Arg do receptor de leptina.

| Sense | Anti-sense |
|----------|------------|
| hlepRf1 | hlepRr |
| hargsGif | hargsAir |

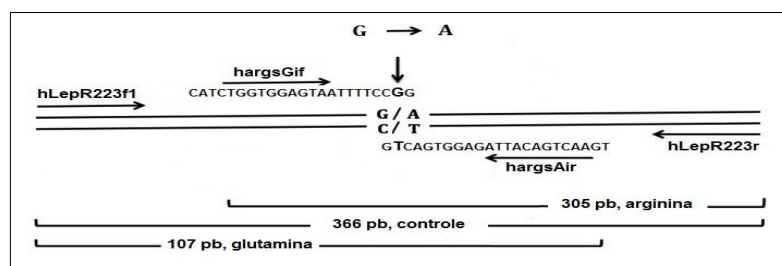


Figura 1: Esquema da estratégia de genotipagem do polimorfismo Gln223Arg do receptor de leptina por PCR. hargsAir = primer anti-sense interno que identifica nucleotídeo guanina que completa o códon para o aminoácido arginina; hargsGif = primer sense que anela somente com o alelo contendo uma guanina central e que codifica para o aminoácido arginina; hlepRf1 e hlepRr = primers externos que combinam com os internos para formar as bandas específicas, e também combinam entre si para formar o produto de 366 pb o qual serve como controle da reação.

2.3. TESTES SOBRE A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR):

Várias condições de reação foram tentadas alterando-se temperatura de anelamento, tempos de anelamento, números de ciclos, concentração de cloreto de

magnésio e concentração de cada primer para se obter o protocolo ideal que diagnosticar o genótipo das amostras.

2.4. ANÁLISES POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE:

Para visualização dos produtos das PCRs, foi usado eletroforese em gel de agarose 2% corado com fluoróforo (syberSafe, Invitrogen®, EUA). Este processo promove a separação das partículas, para que seja possível a visualização das bandas, as quais são comparadas com um marcador molecular contendo fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos. Por fim, para obtenção da imagem, o gel foi colocado em um foto documentador com luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. INICIADORES OLIGONUCLEOTÍDEOS:

Após testes de vários primers, os que tiveram melhores resultados estão descritos na Figura 1 acima. Novos primers estão sendo desenhados para serem testados numa tentativa de se conseguir o diagnóstico com uma PCR única.

3.2. RESULTADOS ESPERADOS:

Com os primers atuais foram necessárias duas reações separados, pois um dos primers apresentou alta afinidade com ambos os alelos, necessitando assim temperaturas de anelamento maiores do que o previsto. A primeira reação é feita usando os primers hLepR223F1 e hargsAir e deve gerar um fragmento de 107 pb identificando o alelo Glu. A segunda reação é feita com os primers hLepR223F1, hargsGif e hLepR223r e gerou duas bandas, uma de 305 pb, identificando o alelo Arg, e outra de 366 que serve como controle da PCR, pois é produto da amplificação de qualquer um dos alelos (Figura 2).

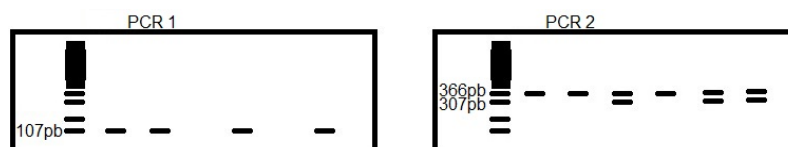


Figura 2: Imagem esperadas na eletroforese das duas reações de PCR. PCR1 deve apresentar ou não uma banda de 107 pares de bases; PCR2 deve apresentar uma ou duas bandas, sendo a de 366 presente em todas as amostras, e a de 305 presente somente nas amostras contendo o alelo Arg.

3.3. TESTES INICIAIS:

Com o atual protocolo conseguimos que apenas uma reação fosse efetiva na identificação do polimorfismo. Por outro lado vimos que este PCR já é suficiente para o diagnóstico, uma vez que a intensidade das bandas indica a presença de heterogenia ou homogenia (Figura 3).

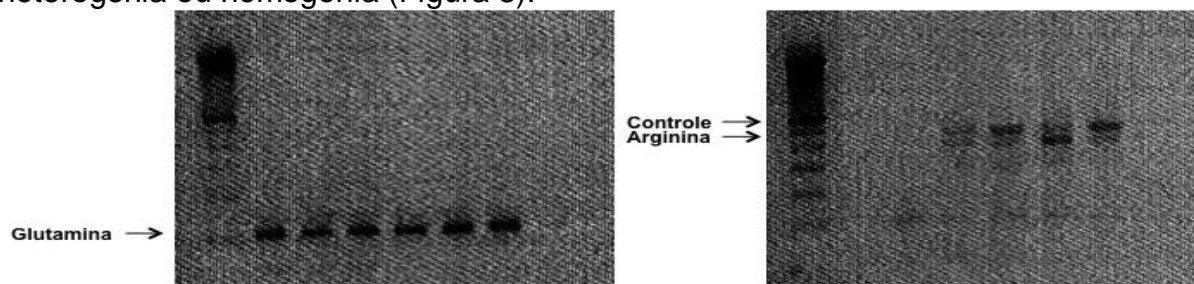


Figura 3: Imagens obtidas nas análises por eletroforese. Imagens de géis de agarose mostrando os produtos produzidos pelas novas PCRs. À esquerda a PCR1 mostra a banda de 107 pb em todas as mostras; na imagem da direita vemos que houve a produção das duas bandas esperadas (366 pb – controle; 305 pb – alelo Arg). Pela intensidade das bandas em relação à banda controle podemos identificar os genótipos glu/glu, glu/glu, arg/arg e glu/glu respectivamente.

4. CONCLUSÕES:

Nossos resultados mostraram ser possível padronizar um método mais simples para genotipagem do polimorfismo Gln223Arg do receptor de leptina usando apenas PCR. Ainda deveremos fazer alguns ajustes nos desenhos dos primers para chegarmos a um protocolo robusto suficiente para a genotipagem em larga escala.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., CluPPER, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., Morhgenstern, J.P. **Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in ob/ob mice.** *Cell*, v.84, p.491-495, 1996.

FRÜHBECK, G., GÓMEZ-AMBROSI, J., MURUZÁBAL, F. J., BURRELL, M. A. **The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.280, p-E827-E847, 2001.

Lee, G.H., Proença, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvish-Zadeh, J.G., Lee, J.I., Friedman .J.M. **Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.** *Nature*, v.379, p.632-635, 1996.

Pereira LO, Francischi RP, Klopfer M, Sawada LA, Santos R, Vieira P, et al. **Obesidade e sua Implicações – Ação da Atividade Física e Controle Nutricional.** *Rev Bras Nutr Clin* 1999;14:9-17

Popkin BM, Doak CM. **The obesity epidemic is a worldwide phenomenon.** *Nutri rev* 56: 106- 14, 1998.

QUINTON, N., et al., **A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women.** *Human genetics*, 2001. 108(3): p. 233-236, 2001.

ROSMOND, R., et al., **Hypertension in Obesity and the Leptin Receptor Gene Locus.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 85(9): p. 3126-3131, 2000.

UFTM. **Leptina** Acessado em 22 maio. 2014. Online. Disponível em: uftm.edu.br/nutro/html/Leptina.html

WHO - World Health Organization. **Obesity – preventing and managing the global epidemic.** Geneva: Report of a WHO Consultation on Obesity, 1998.