

# **O POLIMORFISMO PRO12ALA DO GENE DO RECEPTOR PROLIFERADOR-ATIVADO DE PEROXISSOMOS (PPAR) GAMA EM INDIVÍDUOS NORMAIS DO SUL DO BRASIL**

DAIANE NICOLI SILVELLO<sup>1</sup>, DANIEL SIMON<sup>2</sup>

## **RESUMO**

*O receptor proliferador-ativado de peroxissomos gama (PPAR)-g é o principal regulador da adipogênese e sensibilidade à insulina. Estudos recentes identificaram uma substituição de prolina para alanina (Pro12Ala) no PPAR-g. Este polimorfismo foi associado com características relacionadas à diabetes e/ou proteção contra a diabetes tipo 2. Este trabalho teve por objetivo o estabelecimento das metodologias de genotipagem do polimorfismo Pro12Ala e o estudo de sua frequência em uma amostra de indivíduos normais caucasóides de Porto Alegre. A frequência do alelo Pro foi 0,80, e o polimorfismo está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências obtidas não diferem das frequências de outros grupos caucasóides anteriormente estudados. Será realizado um estudo de associação para analisar o polimorfismo Pro12Ala e parâmetros clínicos em indivíduos diabéticos e não-diabéticos .*

---

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biologia – Bolsista do PROICT/  
ULBRA

<sup>2</sup>Professor - orientador do Curso de Biologia/ULBRA –  
Pesquisador Cincan/ULBRA

## ABSTRACT

*Peroxisome proliferator-activated receptor-g (PPAR)-g is the main regulator of adipogenesis and insulin sensitivity. Recent studies have identified a common proline-to-alanine substitution (Pro12Ala) in the PPAR-g. This polymorphism has been associated with diabetes-related traits and/or protection against type 2 diabetes. The aims of this work were to define the genotyping methodologies of the Pro12Ala polymorphism and to study its frequency in a sample of 100 normal Caucasian individuals from Porto Alegre. The Pro allele frequency was 0.80, and the polymorphism is in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequencies did not differ from other Caucasian groups previously studied. An association study will be performed to analyze the Pro12Ala polymorphism and clinical parameters in diabetic and nondiabetic individuals.*

## INTRODUÇÃO

As conexões entre glicose, lipídeos e metabolismo de energia estão se tornando melhor compreendidos ao nível molecular conforme as múltiplas funções dos receptores proliferadores ativados de peroxissomos (PPAR) estão sendo elucidadas. Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligantes que pertencem a superfamília dos receptores nucleares. As três isoformas atualmente identificadas, PPAR-alfa, PPAR-beta e PPAR-gama, tem domínios de ligação bem divergentes o que permite o reconhecimento de diferentes ligantes, resultando em diferentes atividades biológicas. O PPAR-gama é o principal regulador da adipogênese, da expressão gênica em adipócitos e da sensibilidade à insulina (Wilson *et al.*, 2001), e pode ser responsável por outras funções (Michaud & Renier, 2001; Duval *et al.*, 2002).

Foram descritas algumas variantes genéticas no gene do PPAR-gama, entre estas o polimorfismo Pro12Ala (Yen *et al.*, 1997). O alelo Ala deste polimorfismo foi associado com o risco reduzido para o diabetes tipo 2 (Deeb *et al.*, 1998), mas outros estudos mostram resultados divergentes (Mancini *et al.*, 1999; Ringel *et al.*, 1999). Aparentemente, o efeito no indivíduo é

fraco, mas por causa de uma prevalência mais de 75% do alelo Pro, de alto risco, o risco atribuível à população é grande. Os efeitos *in vivo* do polimorfismo são secundários a alterações no tecido adiposo, onde o PPAR-gama é predominantemente expresso. A redução moderada na atividade transcricional do PPAR-gama em consequência do polimorfismo modula a produção e a liberação de fatores derivados do tecido adiposo. Estas alterações resultam em melhoria secundária na sensibilidade à insulina na captação de glicose e na supressão da produção de glicose. O efeito deste polimorfismo na população pode ser modulado por fatores ambientais ou genéticos tais como a obesidade, a etnicidade, a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados e o repertório genético (Stumvoll & Häring, 2002).

O presente trabalho representa a etapa inicial de um projeto que tem por objetivo estudar a associação do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR-gama com parâmetros clínicos no diabetes tipo 2. Desta forma foram estabelecidas as metodologias para genotipagem do polimorfismo Pro12Ala e determinadas as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo em uma amostra de indivíduos normais brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Indivíduos estudados

Foram estudados 100 indivíduos normais caucasóides doadores de banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A população caucasóide de Porto Alegre é constituída de indivíduos descendentes de europeus, principalmente de Portugal, Itália, Alemanha e Espanha.

### Extração de DNA

DNA de alto peso molecular foi extraído a partir de sangue total utilizando o método não enzimático descrito por Lahiri & Nurnberger (1991).

### Definição dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Foram selecionados um par de iniciadores para a reação em cadeia da polimerase (PCR) baseados em seqüências do gene do PPAR-gama que estavam disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI).

A seqüência dos iniciadores foram: iniciador P2 5'-GTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3' e iniciador P3 5'-GCCAATCAAGCCCAGTC-3'. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 251 pares de bases (pb).

### Determinação dos Genótipos

Foi feita uma mudança de base na extremidade 3' do iniciador P2 para possibilitar a genotipagem do polimorfismo Pro12Ala através da clivagem com a enzima de restrição *BstU I*. Os genótipos foram determinados através da presença (alelo Ala) ou ausência (alelo Pro) do sítio de reconhecimento da enzima de restrição. A presença do sítio de clivagem gerava dois fragmentos: 227 pb e 24 pb.

### Análise dos Produtos Amplificados

Após a clivagem os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Os géis, corados com brometo de etídeo, foram expostos a luz ultravioleta, sendo realizado o registro dos genótipos em câmara escura. O tamanho dos fragmentos foi analisado e estimado por comparação com a migração das bandas de DNA do marcador de peso molecular de 50 pb.

### Análise Estatística

As freqüências alélicas foram determinadas através da contagem direta dos alelos. As freqüências genotípicas foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg através do teste de chi-quadrado ( $\chi^2$ ). Comparações das freqüências alélicas entre os indivíduos estudados e amostras de outras populações descritas na literatura foram realizadas através do teste de  $\chi^2$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Pro12Ala do gene do PPAR-gama em um amostra de indivíduos caucasóides normais brasileiros. As frequências alélicas e genotípicas obtidas são mostradas na Tabela 1. A distribuição dos genótipos está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estudos anteriores mostram que as frequências do polimorfismo Pro12Ala variam de acordo com a etnicidade das populações em estudo. A frequência do alelo Ala observada em nosso trabalho (0,10) não difere estatisticamente daquelas reportadas para outros grupos de indivíduos caucasóides estudados: italianos (0,096; Mancini *et al.*, 1999), filandeses (0,12; Deeb *et al.*, 1998) e americanos (0,11; Beamer *et al.*, 1998).

A patogênese do diabetes tipo 2 é caracterizada por disfunção das células beta para compensar a diminuição na sensibilidade à insulina. A etiologia é multifatorial e estudos de gêmeos indicam um papel central de fatores genéticos (Medici *et al.*, 1999; Poulsen *et al.*, 1999). Além disto, um excesso de taxas de concordância em gêmeos monozigóticos versus gêmeos dizigóticos claramente sugere uma contribuição de fatores genéticos para a resistência à insulina e disfunção das células beta. Entretanto, devido a enorme heterogeneidade e provavelmente o caráter poligênico, poucas variantes genéticas foram identificadas como responsáveis

por uma proporção substancial da forma comum da diabetes tipo 2.

A primeira evidência de associação entre o polimorfismo Pro12Ala e diabetes tipo 2 foi relatada em um grupo de pacientes Nipo-Americanos (Deeb *et al.*, 1998). Este tipo de estudo de associação, entretanto, é freqüentemente relacionado com uma perda de reproducibilidade. Estudos posteriores em outros grupos de pacientes não foram capazes de atingir estes resultados. A existência de interações entre fatores da dieta e outros genes e o polimorfismo Pro12Ala enfatizam a dificuldade de analisar este polimorfismo e podem explicar a heterogeneidade de achados nos estudos realizados até o momento (Luan *et al.*, 2001).

Para fazer uso diagnóstico, preventivo ou terapêutico de um polimorfismo é necessário entender como e em qual contexto metabólico, genético e ambiental o genótipo influencia o fenótipo. Estudos recentes sobre vias metabólicas, subfenótipos diabéticos e não-diabéticos e efeitos de interações gênicas-ambientais e gênicas-gênicas têm fornecido algumas informações úteis sobre os mecanismos potenciais pelos quais o polimorfismo Pro12Ala reduz o risco para o diabetes tipo 2. Geralmente, uma variante genética que afeta o risco para diabetes tipo 2 deve influenciar a sensibilidade à insulina, a secreção de insulina ou a suscetibilidade à obesidade. A realização de um estudo de associação visando a análise de parâmetros clínicos em indivíduos diabéticos e não diabéticos será o próximo passo de nossa investigação.

**Tabela 1** - Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR-gama em uma amostra de indivíduos normais brasileiros (n=100).

| Frequências* |         |            |
|--------------|---------|------------|
| Alelo        | Pro     | 180 (90,0) |
|              | Ala     | 20 (10,0)  |
| Genótipo     | Pro/Pro | 81 (81,0)  |
|              | Pro/Ala | 18 (18,0)  |
|              | Ala/Ala | 1 (1,0)    |

\*Valores entre parênteses são porcentagens.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAMER, B. A.; YEN, C. J.; ANDERSEN, R. E.; MULLER, D.; ELAHI, D.; CHESKIN, L. J.; ANDRES, R.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-g2 gene with obesity in two Caucasian populations. **Diabetes**, v.47, p.1806-1808, 1998.

DEEB, S. S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMAKI, J.; MYKKANEM, L.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; FUJIMOTO, W.; AUWERX, J. A. Pro12Ala substitution in PPARg2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nature Genetics**, v.20, p.284-287, 1998.

DUVAL, C.; CHINETTI, G.; TROTTEIN, F.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. The role of PPARs in atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p.422-430, 2002.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.5444, 1991.

LUAN, J.; BROWNE, P. O.; HARDING, A. H.; HALSALL, D. J.; O'RAHILLY, S.; CHATTERJEE, V. K. K.; WAREHAM, N. J. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARg locus. **Diabetes**, v.50, p.686-689, 2001.

MANCINI, F. P.; VACCARO, O.; SABATINO, L.; TUFANO, A.; RIVELLESE, A. A.; RICCARDI, G.; COLANTUONI, V. Pro12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-g2 is not associated with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, p.1466-1468, 1999.

MEDICI, F.; HAWA, M.; PYKE, D. A.; LESLIE, R. D. Concordance rate for type 2 diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. **Diabetologia**, v.42, p.146-150, 1999.

MICHAUD, S. É.; RENIER, G. Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. **Diabetes**, v.50, p.660-666, 2001.

POULSEN, P.; KYVIK, K. O.; VAAG, A.; BECK, Nielsen H. Heritability of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance a population-based twin study. **Diabetologia**, v.42, p.139-145, 1999.

RINGEL, J.; ENGELI, S.; DISTLER, A.; SHARMA, A. M. Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma and diabetes mellitus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.254, p.450-453, 1999.

STUMVOLL, M.; HÄRING, H. The

peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 Pro12Ala polymorphism. **Diabetes**, v.51, p.2341-2347, 2002

WILSON, T. M.; LAMBERT, M. H.; KLIEVER, A. S. Peroxisome proliferator-activated receptor g and metabolic disease. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.341-367, 2001.

YEN, C. J.; BEAMER, B. A.; NEGRI, C.; SILVER, K.; BROWN, K. A.; YARNALL, D. P.; BURNS, D. K.; ROTH, J.; SHULDINER, A. R. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPARgamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.241, p.:270-274,1997.