

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

POLIMORFISMO DO GENE *UCP2* E A BUSCA DE RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM BRASILEIROS

Ramon Varella Diniz, Virgínia Klausner, Leoberto de Lima, Matheus Salgado de Oliveira, Sônia Khouri Sibelino, 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, ramon.varella36@gmail.com, rcanevari@univap.br.

Resumo

O gene *UCP2* (*Uncoupling Protein 2*) é responsável dentre outras funções, pelo controle da respiração celular e produção de ATP. Polimorfismos específicos neste gene, tais como o -866G/A, podem causar alterações em sua expressão e alterar o funcionamento do metabolismo de lipídios e glicose no organismo, levando ao desenvolvimento da Diabetes tipo 2 (DM2). O objetivo deste estudo foi detectar se existe relação do polimorfismo -866G/A do gene *UCP2* com o desenvolvimento da DM2 em brasileiros. Amostras de DNA foram extraídas do sangue de 24 participantes divididos em três grupos: indivíduos com DM2, indivíduos com ausência de DM2 mas com casos na família e indivíduos sem DM2 (grupo controle). As análises de PCR e PCR-RFLP foram realizadas com as enzimas Taq DNA polimerase e *MluI*, respectivamente. Os resultados moleculares foram comparados com os resultados das análises bioquímicas e clínicas/pessoais. Não foi observada relação do alelo A ou do alelo G com o desenvolvimento de DM2, contudo foi observada que a presença do alelo A está relacionada com o aumento dos valores de HbA1c e insulina nos indivíduos com presença da patologia na família.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 2. Polimorfismo. *UCP2*. PCR-RFLP.

Área do Conhecimento: Biologia Molecular.

Introdução

Polimorfismos genéticos são caracterizados por alterações na sequência de DNA com incidência em mais de 1% da população mundial e podem, em conjunto, proporcionar maior facilidade de desenvolvimento de muitas doenças genéticas (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

O gene *UCP2* (*Uncoupling Protein 2*), localizado no cromossomo 11, é responsável dentre outras funções, pelo controle da respiração celular e produção de ATP (HASHEMI *et al.*, 2014). Polimorfismos específicos neste gene podem causar alterações em sua expressão e conseqüentemente alterar o funcionamento do metabolismo de lipídios e glicose no organismo, levando ao desenvolvimento de várias doenças (SHEN *et al.*, 2014). O aumento de expressão do gene *UCP2* ocasiona a diminuição da síntese de ATP pela mitocôndria, reduzindo assim a taxa de insulina secretada pelo pâncreas pois o ATP é essencial para a execução das funções normais da célula, aumentando assim o risco de desenvolvimento da Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (XU *et al.* 2021).

A DM2 é uma patologia multifatorial ocasionada pela hiperglicemia crônica devido à baixa ou nenhuma secreção de insulina ou pela dificuldade da ação da mesma no organismo (WU *et al.*, 2014). Em 2021, levantamentos realizados pela *International Diabetes Federation* (IDF) conduzidos por Boyko *et al.* (2021) mostraram que o número de indivíduos diabéticos entre a idade de 20 e 79 anos no mundo era de 536,6 milhões e no Brasil cerca de 15,7 milhões foram diagnosticados com a doença.

O polimorfismo -866G/A, localizado na região promotora do gene *UCP2*, é caracterizado pela presença do alelo G e o alelo A, este último descrito em muitos estudos relacionado ao desenvolvimento de DM2 na população indiana (DIN *et al.*, 2023, GOMATHI *et al.*, 2019), russa (LAPIK; RANJIT; GALCHENKO, 2021) e chinesa (HOU *et al.*, 2020). Contudo, há estudos com resultados controversos, mostrando não haver relação da presença do alelo A com o desenvolvimento da DM2 na população chinesa (QIN *et al.*, 2013), brasileira (SOUZA *et al.*, 2013) e japonesa (SASAHARA *et al.*, 2004), ou mesmo o relacionando ao baixo risco do desenvolvimento dessa patologia na população italiana, funcionando como um alelo protetor segundo os autores (BULOTTA *et al.*, 2005).

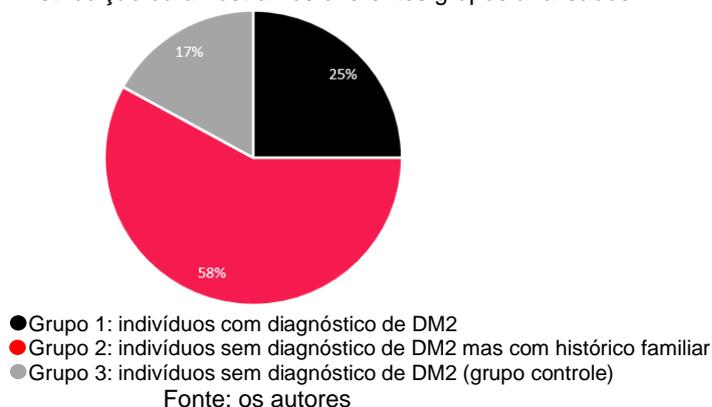
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Considerando a alta incidência da DM2 na população brasileira e a relação de determinados polimorfismos genéticos com a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de distúrbios multifatoriais, este estudo tem o objetivo de analisar o polimorfismo -866G/A (rs659366) da região promotora do gene *UCP2* pela técnica de PCR-RFLP para investigar, por meio de análises bioquímicas e clínicas, se o mesmo está relacionado com a predisposição ao desenvolvimento da DM2 em indivíduos brasileiros. As informações adquiridas com esse estudo poderão agregar informações adicionais a prevenção e ao diagnóstico deste distúrbio.

Metodologia

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº 5.810.129). Vinte e quatro indivíduos com a faixa etária entre 18 a 70 anos, atendidos no Centro de Práticas Supervisionadas (CPS) da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, participaram deste estudo. Após a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), um questionário foi aplicado aos participantes. De acordo com o resultado do questionário aplicado e das análises bioquímicas realizadas, os mesmos foram classificados em três grupos: 6 (25%) indivíduos com diagnóstico de DM2 (grupo 1), 14 (58%) indivíduos sem diagnóstico de DM2 mas com histórico familiar (diagnóstico de DM2 nos pais e/ou avós) (grupo 2) e 4 (17%) indivíduos sem diagnóstico de DM2 (grupo 3 - controle) (Figura 1).

Figura 1. Distribuição da amostra nos diferentes grupos analisados.



As coletas de amostras de sangue dos participantes, realizadas no Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDLAB) da Univap, foram obtidas por punção venosa em jejum de oito horas seguindo todas as instruções e recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC). As amostras de sangue coletadas foram processadas para posterior análises moleculares e bioquímicas que consistiram a análise da dosagem da glicemia de jejum, colesterol total, triglicérides, hemoglobina glicada (HbA1c) e insulina. Além disso, foi calculado o HOMA-IR multiplicando-se o valor de glicemia pelo de insulina e dividindo pela constante 415, para avaliar a resistência insulínica e o funcionamento das células beta do pâncreas com valores de normalidade abaixo de 3,4 (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022)

A extração de DNA da papa leucocitária obtida de cada amostra de sangue foi realizada utilizando-se o protocolo de fenol:clorofórmio. A quantificação e pureza do DNA foi avaliada 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 da região promotora do gene *UCP2* que contém o polimorfismo -866G/A (rs659366). As sequências dos iniciadores que flanqueiam o polimorfismo -866G/A foram 5'-CACGCTGCTTCTGCCAGGAC-3' (sense) e 5'-AGGCGTCAGGAGATGGACCG-3' (antisense), amplificando uma região de 363 pares de base (pb).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

As condições de amplificação para 200 ng de DNA consistiram em um volume final de 25 μ l contendo 10 mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 uM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,6 uM de cada iniciador e 2U/uL de Taq DNA Polimerase. As condições de amplificação, realizadas no termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler), foram desnaturação inicial   94 C por 5 minutos seguida por 35 ciclos constituídos de desnaturação   94 C por 1 minuto, anelamento   68 C por 1 minuto e extensão   72 C por 1 minuto, acompanhado de extensão final de 72 C por 6 minutos.

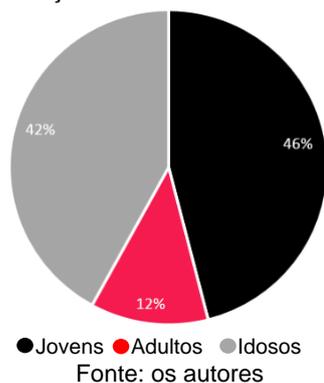
Posteriormente a realização da PCR e da eletroforese em gel de agarose para a avaliação da amplificação da sequência polimórfica do gene *UCP2*, cada amostra foi submetida a técnica de PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *MluI*, que reconhece a sequência alvo e rompe as ligações fosfodiéster do DNA no sítio A↓CGCGT. A solução para digestão enzimática preparada utilizou 5 μ L do produto amplificado pela PCR, 12 μ L de H₂O, 1,5 μ L de tampão 10X e 1,5 μ L de enzima de restrição, sendo a mistura incubada a 37 C por 1 a 2 horas.

Os produtos digeridos pela PCR-RFLP foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,6%, utilizando um marcador de baixo peso molecular (100pb) e o corante fluorescente brometo de  tideo (3 μ g/ml). A incidência da luz ultravioleta (UV) foi controlada pelo equipamento *Transilluminator-D Pro MiniBIS* (DNR Bio-Imaging Systems Ltd), e a captura da imagem foi obtida utilizando-se o software GelCapture para posterior identificação dos genótipos das amostras.

Resultados

Dos 24 casos analisados, quanto   classificação etária segundo a Organização Mundial da Saúde (2023), 46% dos participantes eram jovens, 12% adultos e 42% idosos (Figura 2). Em relação ao g nero, 83% dos participantes são do g nero feminino e 16% do g nero masculino. Quanto a raça, as amostras ficaram distribuídas com 79% de descendência brasileira e 21% de outras descendências, sendo neste critério considerado apenas a geração dos avós dos participantes.

Figura 2. Distribu o das amostras em relação à faixa etária



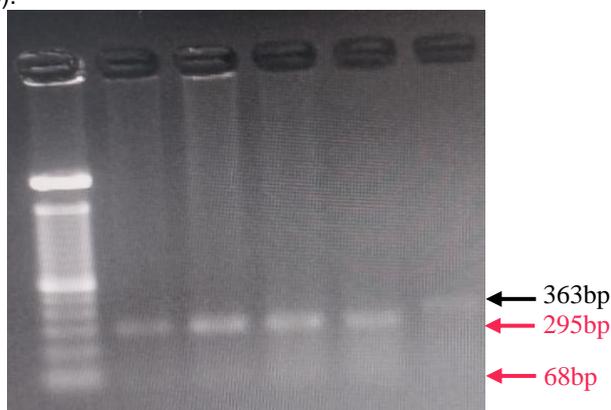
Após a realização da técnica de PCR-RFLP e da eletroforese em gel de agarose nas 24 amostras do estudo, foram observadas diferentes padrões de bandas no gel que consistem em um dos três tipos de genótipos possíveis em relação a presença ou ausência do sítio de restrição da enzima *MluI*.

A presença do sítio de restrição da enzima *MluI* nos dois alelos do gene *UCP2* (genótipo homozigoto AA) foi observado em nove amostras analisadas (amostras 5, 9, 10, 13, 14, 20, 21, 22 e 32) detectado pela presença de dois fragmentos (295 pb e 68 pb), referente aos dois alelos do gene, visualizado após eletroforese em gel de agarose. A ausência do sítio de restrição nos dois alelos do gene *UCP2* (genótipo homozigoto GG) foi observado em cinco amostras analisadas (amostras 1, 8, 23, 28 e 31) detectado pela presença de um fragmento (363 pb) nos dois alelos do gene. Os genótipos heterozigotos (genótipo GA), ou seja, a presença do sítio de restrição em um alelo e ausência do sítio de restrição no outro alelo, foi observado em 10 amostras analisadas (amostras 3, 4, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19 e 29) detectado pela presença de três fragmentos (bandas 363 pb relativo a um alelo e bandas de 295 pb e 68 pb relativo ao outro alelo do gene).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Vale ressaltar que pelo baixo poder de resolução do gel de agarose, não foi possível visualizar a banda de 68 pb, em especial nos indivíduos heterozigotos com a presença de apenas uma cópia do alelo de 68 pb (Figura 3).

Figura 3. Análise de PCR-RFLP das variantes do gene *UCP2* (G-866A) em gel de agarose. A presença do sítio de restrição *MluI* (alelo A) resultou em dois fragmentos: 295 pb e 68 pb, enquanto no caso do alelo G, o produto permanece não digerido (363 pb).



Amostras 20-22: homozigotos mutantes (genótipo AA); amostra 23, homozigoto tipo selvagem (genótipo GG) e marcador de peso molecular (M): 100 pb.

Fonte: os autores

A casuística foi distribuída de acordo com os genótipos identificados pela análise de PCR-RFLP. No grupo 1, que consiste nos indivíduos com diagnóstico de DM2, 34% apresentam o genótipo GG, 16% o genótipo GA e 50% o genótipo AA. No grupo 2, caracterizado pelos indivíduos sem diagnóstico de DM2, mas com presença de histórico familiar da doença, em 22% dos casos foi detectado o genótipo GG, em 50% dos casos o genótipo GA e em 28% dos casos o genótipo AA. No grupo 3 (controle), 50% dos casos tiveram a presença do alelo A com os genótipos GA ou AA. As análises bioquímicas para dosagem de glicemia de jejum, HbA1c e insulina, além do cálculo de HOMA-IR, apresentaram resultados de médias gerais e desvio padrão dentro dos valores de normalidade segregados a cada um dos grupos por genótipos (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos por genótipos com respectivas médias e desvio padrão dos resultados das análises bioquímicas e cálculo de HOMA-IR

Genótipos	Grupos	Número de casos (%)	Glicemia (mg/dL)	MÉDIA / DESVIO PADRÃO		
				HbA1c (%)	Insulina (uU/mL)	HOMA-IR
GG	Grupo 3	0	-	-	-	-
	Grupo 2	22	82,33 / 11,15	4,8 / 0,17	9,66 / 5,75	1,92 / 1,07
GA	Grupo 1	34	105 / 4,24	6,1 / 0,28	14,15 / 8,55	3,62 / 2,3
	Grupo 3	50	73 / 0	5,15 / 0,07	13,67 / 7,5	3,17 / 0,73
	Grupo 2	50	88,71 / 15,41	5,34 / 0,64	14,37 / 5,79	3,18 / 1,61
AA	Grupo 1	16	99 / 0	5,8 / 0	12,3 / 0	2,93 / 0
	Grupo 3	50	75,5 / 7,78	5,3 / 0,42	11,75 / 2,61	2,24 / 0,72
	Grupo 2	28	87 / 4,08	5,4 / 0,32	14,6 / 4,9	3,03 / 0,98
	Grupo 1	50	100,3 / 21,12	6,13 / 1,56	3,76 / 3,23	1 / 1,03

Grupo 1: indivíduos com diagnóstico de DM2

Grupo 2: indivíduos sem diagnóstico de DM2 mas com histórico familiar

Grupo 3: indivíduos sem diagnóstico de DM2 (grupo controle)

HbA1c: hemoglobina glicada

HOMA-IR: padrão de resistência insulínica

Fonte: o autor.

Discussão

A hipótese deste estudo é haver a existência da relação entre a presença do alelo A referente ao polimorfismo -866G/A do gene *UCP2* com o desenvolvimento da DM2 em indivíduos brasileiros. Os

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

dados obtidos até o momento nas amostras analisadas não mostraram esta relação. O número amostral baixo, especialmente para os grupos 1 e 3 (grupo controle) e a disparidade da quantidade de amostras por grupo impossibilitou a realização de uma análise estatística mais criteriosa e fidedigna na busca da relação entre o polimorfismo -866G/A e a DM2, sendo realizado apenas o cálculo das médias e desvio padrão para a interpretação dos resultados. Desta forma, as correlações estatísticas com os dados bioquímicos e clínicos com o genótipo de cada indivíduo não foi realizada.

Souza *et al.* (2013) pesquisaram a existência desta relação em brasileiros descendentes de europeus no sul do Brasil, analisando amostras de sangue venoso de participantes diabéticos tipo 2 e não diabéticos por PCR-RFLP com a enzima *MluI* e apesar de terem concluído que este polimorfismo não está relacionado ao desenvolvimento desta patologia, a existência deste único estudo na população brasileira demanda a realização de mais pesquisas em outras regiões do país.

Ressaltamos que a heterogeneidade da faixa etária da nossa amostra (46% jovens, 12% adultos e 42% idosos) também pode ter influenciado na classificação dos grupos dos participantes e consequentemente nos resultados obtidos, considerando que o desenvolvimento da DM2, assim como outras doenças multifatoriais, está ligado intrinsecamente à idade avançada (NUSSBAUM, MCINNES E WILLARD, 2016). Dessa forma, nos 46% das amostras, a relação dos genótipos AA ou GA com o diagnóstico da DM2 não é precisa, pois esses pacientes sendo jovens podem ter a possibilidade de desenvolver a DM2 em idade mais avançada, como também descrito por Nanayakkara *et al.* (2020).

Além da idade, a falta de equidade entre os gêneros foi observada nos casos analisados. Vale ressaltar que existem diferenças no desenvolvimento de determinadas doenças entre homens e mulheres (CIARAMBINO *et al.*, 2022) e a maior quantidade de participantes do gênero feminino pode determinar a maior frequência de um determinado polimorfismo. Com o intuito de excluir estas variáveis, Lapik, Ranjit e Galchenko (2021) realizaram seu estudo apenas com amostras obtidas de mulheres russas com a faixa etária entre 45 e 60 anos. Estes autores concluíram que a variante AA do polimorfismo -866G/A estava associada a altos níveis glicêmicos e lipídicos nestas mulheres. Contudo, embora a amostra do presente estudo foi heterôgenea quanto a faixa etária e gênero, a descendência brasileira foi observada em 79% dos indivíduos, que afirmaram que seus antecedentes até a linhagem dos avós possuíam origens brasileiras.

Embora uma análise mais robusta não foi possível de ser realizada para a busca da relação do polimorfismo -866G/A do gene *UCP2* com o desenvolvimento da DM2, foi possível a determinação dos genótipos de todos os casos analisados e a realização do cálculo das respectivas médias e desvios padrões para ser possível uma inferência da relação dos genótipos com o diagnóstico da DM2. Adicionalmente, foi observado discreto aumento nos níveis de HbA1c e insulina sérica nos indivíduos sem diagnóstico de DM2 mas com histórico familiar (grupo 2). Para a HbA1c o valor médio das amostras é de 4,8% no genótipo GG, e respectivamente 5,34% e 5,4% no GA e AA. Para a insulina, o aumento foi mais evidente do genótipo GG para o GA, sendo de 9,66uU/mL a 14,37uU/mL respectivamente, e 14,6uU/mL para o genótipo AA. Além de relacionar o alelo A ao desenvolvimento de DM2 em indianos, Gomathi *et al.* (2019) também relacionaram a presença dos genótipos GA e AA com os altos níveis de HbA1c, parâmetro este ideal para avaliação do perfil diabético.

Conclusão

Não foi observada relação do polimorfismo -866G/A do gene *UCP2* com o desenvolvimento da DM2 por meio do cálculo das médias e do desvio padrão nas amostras analisadas. O número amostral baixo e a disparidade da quantidade de amostras por grupo impossibilitou a realização de uma análise estatística mais criteriosa para relacionar os genótipos variantes GA e AA com o desenvolvimento dessa patologia em indivíduos brasileiros. Análises adicionais em um número amostral maior e mais homogêneo serão realizadas para a obtenção de resultados mais fidedignos.

Referências

BOYKO, E. J. *et al.* **IDF Diabetes Atlas 2021**, 10. ed. International Diabetes Federation, 2021. p. 34-37.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BULOTTA, A. *et al.* The common -866G/A polymorphism in the promoter region of the *UCP-2* gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in caucasians from italy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, p. 1176-1180, fev. 2005.

DE SOUZA, B. M. *et al.* Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T Polymorphisms and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: Case-Control Study and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 8, jan. 2013. em: 14 mai. 2022.

CIARAMBINO, T. *et al.* Influence of gender in Diabetes Mellitus and its complication. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 9 ago. 2022.

GOMATHI, P. *et al.* The -866G/A polymorphism in the promoter of the UCP2 gene is associated with risk for type 2 diabetes and with decreased insulin levels. **Gene**, v. 701, p. 125-130, jun. 2019.

HASHEMI, M. *et al.* A 45-bp insertion/deletion polymorphism of UCP2 gene is associated with metabolic syndrome. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 13, n. 12, jan. 2014.

HOU, G. *et al.* UCP2-866G/A Polymorphism is Associated with Prediabetes and Type 2 Diabetes. **Archives of Medical Research**, v. 51, n. 6, ago. 2020.

LAPIK, I. A., RANJIT, R., GALCHENKO, A.V. Impact of KCNJ11 rs5219, UCP2 rs659366, and MTHFR rs1801133 Polymorphisms on Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study. **The Review of Diabetics Studies**, v. 17, n. 1, p. 21-29, mar. 2021.

NANAYAKKARA, N. *et al.* Impact of age at type 2 diabetes mellitus diagnosis on mortality and vascular complications: systematic review and meta-analyses. **Diabetologia**, v. 64, p. 275-287, dez. 2020.

NUSSBAUM, Robert L; MCINNES, Roderick R; WILLARD, Huntington F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**, 2023.

SASAHARA, M. *et al.* Uncoupling Protein 2 Promoter Polymorphism 866G/A Affects Its Expression in -Cells and Modulates Clinical Profiles of Japanese Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes (American Diabetes Association)**, v. 53, n. 2, fev. 2004.

SHEN, Y. *et al.* Investigation of Variants in UCP2 in Chinese Type 2 Diabetes and Diabetic Retinopathy. **PLoS One**, v. 9, n. 11, nov. 2014.

WU, Y. *et al.* Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, p. 1185-1200, set. 2014.

XU, L. *et al.* Association of uncoupling protein-2 -866G/A and Ala55Val polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of case-control studies. **Medicine**, v. 100, n. 6, fev. 2021.