

## **DESNATURALIZACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN PARA ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A OBESIDAD.**

Camila Sala<sup>1</sup>, Ana Alzamendi<sup>2</sup>, María Rita Santos<sup>1</sup>, Silvina Quintana<sup>3</sup>, Claudio Bravi<sup>1</sup>, Graciela Bailliet<sup>1</sup>.

- 1- Laboratorio de Genética Molecular de Poblaciones, IMBICE, La Plata.
- 2- Laboratorio de Neuroendocrinología. IMBICE, La Plata.
- 3- Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Fares Taie, Mar del Plata.

E-mail: [camilasala@outlook.com](mailto:camilasala@outlook.com)

### **Introducción**

La OMS define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo (TA) que puede ser perjudicial para la salud, lo que pone en evidencia el papel relevante del TA en el desarrollo de las alteraciones asociadas a la obesidad. Contribuyen al desarrollo de esta patología tanto factores ambientales como genéticos. La incidencia del sobrepeso y la obesidad ha aumentado drásticamente en el último cuarto de siglo en todo el mundo, situación de la que la Argentina no se encuentra exenta. Al igual que en otros países, los cambios alimentarios (dietas desbalanceadas ricas en azúcares simples y grasas), el descenso de actividad física y un mayor nivel de estrés cotidiano han contribuido a cambiar las características antropométricas de la población argentina. Los resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (2005) mostraron que la obesidad alcanzó una prevalencia del 10,4 %, en la población de niños entre 6 y 60 meses siendo las regiones pampeanas y del GBA las zonas con mayores índices. La última Encuesta de Factores de Riesgo (2013) del Ministerio de Salud de la Nación mostró que el 37,1 % de la población argentina adulta Argentina tiene sobrepeso y que el 20,8 % es considerada obesa. En base a este tipo de datos se estima que las muertes atribuibles a esta problemática rondan las 30.000 al año. Solo recientemente, los gobiernos e instituciones públicas han comenzado a elaborar campañas de prevención y diagnóstico temprano de la obesidad.

En las últimas décadas se ha detectado también que los índices de sobrepeso y obesidad se manifiestan a edades cada vez más tempranas, lo que conlleva a la aceleración del riesgo de padecer trastornos relacionados, tanto metabólicos como vasculares. Además, la obesidad infantil está relacionada con déficit del desarrollo motor, cognitivo y social de los individuos. Las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad se correlacionan con la distribución del TA; mientras el incremento del TA visceral aumenta los riesgos del desarrollo de las mismas, el TA subcutáneo lo disminuye (O'Rahilly y col. 2014). Los cambios funcionales del TA juegan un rol determinante en el desarrollo de insulino resistencia, dislipemias y enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad (Kelly y col. 2015). La disfunción del TA depende de la forma de expansión que se produzca, si prevalece la generación de nuevos adipocitos (hiperplasia), la expansión es saludable, pero si por el contrario predomina la hipertrofia adipocitaria se genera una expansión no saludable (Choe y col. 2016). Dependiendo de su etiología, la obesidad ha sido clasificada en 2 subgrupos: la obesidad monogénica (obesidad extrema sin retraso en el desarrollo), y la obesidad sindrómica (individuos clínicamente obesos con cuadros clínicos complejos) (Herrera y col. 2010).

La primera mutación causante de obesidad monogénica fue descrita en 1997 (Flegal y col.), hasta la fecha ya suman 20 mutaciones responsables de alguna forma de obesidad autosómica (O'Rahilly y col. 2009). Todas esas mutaciones están situadas en genes involucrados en las rutas metabólicas de la leptina y la melanocortina, que constituyen los sitios críticos de regulación de la homeostasis energética de todo el organismo a nivel del sistema nervioso central (Coll y col. 2004). Los primeros avances en el descubrimiento de

loci de susceptibilidad a obesidad ocurrieron en 2007. Esto fue posible a través del desarrollo de estudios de asociación a través de todo el genoma (GWAS), que permite la búsqueda de marcadores que pueden heredarse en bloque debido al desequilibrio de ligamiento (Frayling y col. 2007) Estos trabajos permitieron capturar 80% de las variantes comunes utilizando 500.000 mutaciones de punto cuidadosamente seleccionados. El genotipado de un set de marcadores seleccionados es un objetivo atractivo que permitiría capturar las variantes comunes.

Estudios epidemiológicos en relación a la obesidad corriente han demostrado concordancia en el descenso de obesidad cuando disminuye el grado de parentesco, denotando el componente genético de la susceptibilidad a la obesidad. Sin embargo, es necesaria la exposición a un ambiente obesogénico para el desarrollo de la enfermedad (Wardle y col. 2008). Una hipótesis es que aquellos genes que proveyeron de una ventaja adaptativa en el pasado, permitiendo la máxima eficiencia para la reserva de nutrientes, podrían encontrarse desajustados cuando se enfrentan a los ambientes obesogénicos del presente (Saunders y col. 2007).

Son de especial interés las variantes nucleotídeas en genes que fueron significativamente asociados a medidas antropométricas, en especial BMI (body mass index) en personas con alteraciones de peso, con diabetes tipo 2 y obesidad monogénica: FTO (rs9939609), los niños homocigotos para el alelo de alto riesgo, comen el doble que niños homocigotos del alelo de bajo riesgo (Ursu y col. 2015). El marcador GNPDA2 rs10938397 (OR= 1,2, P=1,5-4) mostró un alto nivel de riesgo cuando se compararon cohortes internacionales de niños obesos (N=1308) y controles (N=8369). Otros dos marcadores involucrados en vías de señalización asociadas a la ingesta de alimentos y el gasto energético, revelaron niveles significativos de asociación con el BMI en una población de Americanos Europeos: GHRL (Ghrelin), SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) (Li y col, 2014).

La técnica de HRM se utiliza para determinar si dos productos de PCR de tamaño similar tienen secuencias idénticas. De la misma manera que en una PCR cuantitativa, la amplificación del fragmento de interés se lleva a cabo en presencia de un intercalante fluorescente. Luego, el producto de la amplificación se somete a un gradiente de temperaturas crecientes para ser desnaturalizado, liberando el intercalante fluorescente. Una vez que se libera, el intercalante cambia su conformación y pierde la fluorescencia. Un termociclador de alta resolución, especializado es capaz de registrar las fluctuaciones en la emisión de fluorescencia por medio de una curva de disociación específica para cada amplicón. La curva de disociación para cada amplicón se construye a partir de su secuencia nucleotídica, su tamaño y su estructura primaria (11, 12). El enlace A-T es más débil que el G-C, por lo tanto las regiones ricas en A-T se disociarán a temperaturas más bajas que aquellas con mayor contenido de G-C (13). La distribución de estas regiones ricas en A-T o G-C en el oligonucleótido son las que condicionan la forma de la curva resultante, la cual se utiliza para comparar amplicones de múltiples muestras.

## **Objetivo**

El objetivo del presente trabajo fue determinar la utilidad de la técnica de “High Resolution Melting” (HRM) como método para identificar variantes en genes asociados al desarrollo de obesidad en niños.

## **Materiales y Métodos**

Para realizar este trabajo, se utilizaron muestras pertenecientes al banco de ADN del IMBICE, se seleccionaron 25 individuos no emparentados oriundos de la ciudad de Mendoza. Estas muestras se obtuvieron mediante consentimiento informado del donante y

se anonimizaron al llegar al laboratorio. Se escogió la ciudad de Mendoza como población de referencia. Esta ciudad representa el cuarto aglomerado urbano a nivel nacional. Su importante desarrollo económico y su geografía, la convierten en un foco de actividades económicas, que demandó históricamente una gran cantidad de mano de obra para la agricultura. Como consecuencia de lo anterior, a lo largo del tiempo representó un destino idóneo para el establecimiento tanto de inmigrantes como de migrantes internos. Es por eso que una con una muestra de esta ciudad cosmopolita se pretende reflejar la variabilidad genética y étnica de la población argentina en general.

Para el diseño de los cebadores de seleccionaron cuatro de los SNPs que presentaron asociación significativa con el desarrollo de la obesidad (CITA). Se empleó el programa Primer3 v0.3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>, Srozen y Skaletsky 2000). Se utilizaron los parámetros establecidos por defecto en el programa Primer3. Con el programa OligoCalc (Kibbe 2007, disponible en <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>) se obtuvieron los valores de estabilidad termodinámica (energía libre de Gibbs;  $\Delta G_0$ ) de las interacciones detectadas entre cebadores (formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros) que pueden dar lugar a errores en las reacciones de PCR. Finalmente se analizó si las secuencias diseñadas de los oligonucleótidos presentaban alguna complementariedad en algún otro locus del genoma a través del programa Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Luego de superar este control, los oligonucleótidos se consideraron óptimos para pasar a la fase experimental.

Debido a que, si bien el equipo que se utilizó para realizar las amplificaciones (Rotor Gene Q 5-plex; Qiagen) es de alta resolución, no logra discriminar satisfactoriamente las sustituciones A-T, para el marcador FTO se recurrió al diseño de primers alelo específicos. En este caso, se recurrió a un trío de oligonucleótidos: dos forward que reconocen alternativamente los alelos portadores de las bases A y T, a uno de los cuales se le adicionó una cola de poli T que permite incrementar el tamaño y la temperatura de melting del amplicón resultante y de esa manera evidenciar las diferencias, y un reverse, que delimita el tamaño del fragmento amplificado. En el caso de los demás marcadores, sólo se diseñaron dos cebadores. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Descripción de los cebadores utilizados.

Marcador	Cebador	Secuencia 5'-3'
FTO	FTO-F(T)	tttCCTTGCGACTGCTGTGAATTTT
	FTO-F(A)	CCTTGCGACTGCTGTGAATTTA
	FTO-R	CCACTCCATTTCTGACTGTTACCTA
GHRL	GHRL-F	CACAAAGACTATGATGAACTCCCTTCT
	GHRL-R	CTCTGCCTCTCCAAAAGAACTTCTAA
GNDPA-2	GNDPA2-F	CACACACCAAATGTTTTTACTTTAC
	GNDPA2-R	GCCAAAGGACATAGCTGAATGTA
SOCS-3	SOCS3-F	TGTTGACTTCTTTCCATTGTTTTAG
	SOCS3-R	ACACCCTCTATCCCATCTGTATAGC

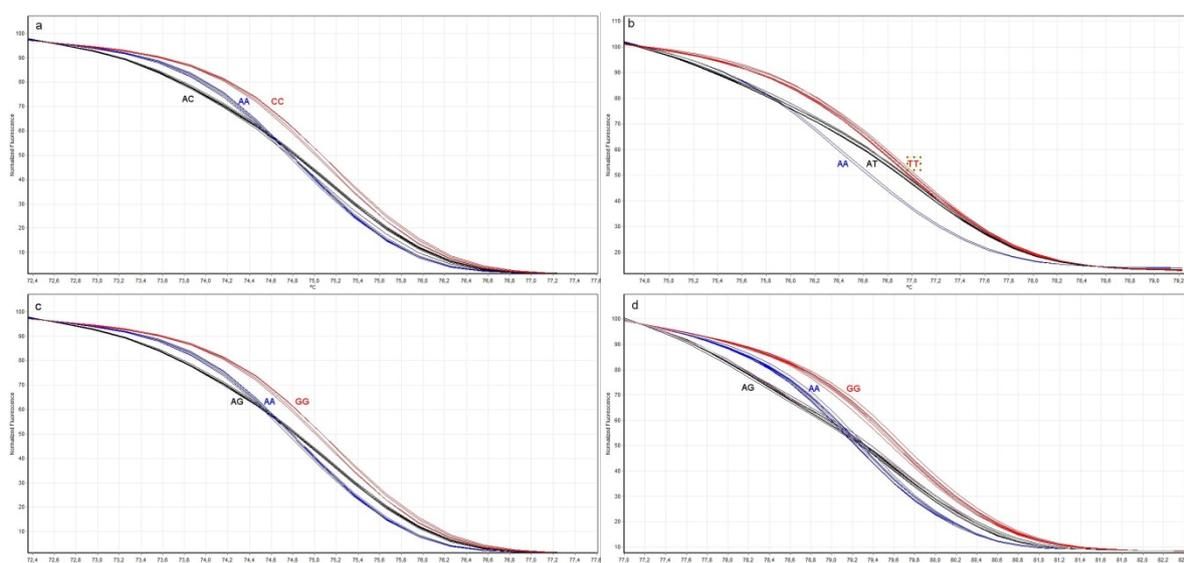
Se realizaron reacciones de amplificaciones por PCR en Tiempo Real con posterior análisis por HRM de 20  $\mu$ l de volumen final, conteniendo 10  $\mu$ L de "Mezcla Real 2X" (Taq DNA Polimerasa, dNTPs, Mg<sup>++</sup>, conservantes, buffer y colorante Evagreen) (Biodynamics), 40 nM de primers, 2  $\mu$ l (10 ng/ $\mu$ ) de templado y agua libre de RNAsas y DNAsas hasta completar el volumen final. El ciclado consistió en un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos de 95 °C, 40 ciclos de 20 segundos a 95 °C y de 20 segundos a 58 °C. Finalmente 10 segundos a 72 °C y un ciclo de melting de 70 a 95 °C.

Por medio del programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) se testeó el equilibrio de Hardy Weimberg para cada marcador.

## Resultados

Para cada uno de los SNPs fue posible identificar tres genotipos, dos homocigotas y un heterocigota (Figura 1). En el caso de FTO, el 12% de la población resultó AA, el 28%, AT y un 60% TT. En las variantes relacionadas con el gen GNPDA-2, se halló un 50% de individuos homcigotas AA, un 37,5% de heterocigotas AG y un 12,5% de homocigotas GG. Para el marcador GHRL, el 24% de los individuos fue portador del genotipo AA, otro 24% del AC y un 52%, CC. Por último, los genotipos AA, AG y GG del marcador SOCS-3 se encontraron en proporciones del 33, 38 y 29% respectivamente. Con base en estos datos, se calcularon las frecuencias alélicas para todos los marcadores en la población de Mendoza (Tabla 2).

**Figura 1. Perfiles de melting.** La figura (a) corresponde al marcador GHRL, la (b) a Fto, a (c) a GNPDA-2 y la (d) a SOCS3.



**Tabla 2.** Frecuencias alélicas para cada uno de los marcadores en la población de Mendoza.

Marcador	Frecuencias Alélicas	
FTO	28% A	72% T
GNPDA-2	31 % G	69% A
GHRL	36% A	64% C
SOCS-3	48% G	52% A

El test de equilibrio de Hardy-Weimberg demostró que tanto FTO como GNDPA-2 y SOCS-3 adhieren a este equilibrio, pero ese no es el caso del marcador GHRL ( $p < 0,05$ ). Este último resultado puede ser atribuido a un efecto de la deriva genética por haber considerado una muestra de tamaño demasiado pequeño (Tabla 3).

**Tabla 3.** Test de equilibrio de Hardy-Weimberg.

Locus	Nº de genotipos	Heterocigotas	Heterocigotas	P-Value
-------	-----------------	---------------	---------------	---------

		Observados	Esperados	
FTO	25	0,32000	0,41143	0,33012
GNPDA2	20	0,30000	0,43077	0,28058
GHRL	25	0,24000	0,47020	0,02520
SOCS3	24	0,41667	0,50709	0,43273

## Conclusión

La técnica de HRM es un método rápido y eficiente para distinguir variantes en genes asociados a la obesidad.

## Bibliografía

Choe, SS, Huh, JY, Hwang, IJ, Kim, JI, Kim, JB. Adipose Tissue Remodeling: its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2016, 7, 30-41.

Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GSH, O'Rahilly S. Proopiomelanocortin and Energy Balance : Insights from Human and Murine Genetics. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism*, 2004;89(March):2557–62.

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Journal of American Medical Association* 2007, 298:2028–2037.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MJ, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe N, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CNA, Doney ASF, Morris AD, Smith GD, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Hattersley AT, and McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007, 316:889–894.

Herrera BM, Lindgren CM. The Genetics of Obesity. *Current Diabetes Reports* 2010;(October):498–505.

Kelly DM. & Jones TH. Testosterone and obesity. *Obesity Reviews*, 2015, 16, 581–606.

Li P, Tiwari HK, Lin W, Allison DB, Chung WK, Leibel RL, Nengjun Y, Liu, N. Genetic Association Analysis of 30 Genes Related to Obesity in a European American Population (2014). *International Journal of Obesity*, 2014;38(5):724–9.

O'Rahilly S: Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 2009, 462:307–314.

O'Rahilly S and Farooqi IS. Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. *International Journal of Obesity*, 2008 32, S55–S61

O'Reilly, MW, House, PJ, Tomlinson JW. Understanding androgen action in adipose tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014; 143, 277–284.

Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 87:398–404.