

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 14 / N° 18 / 2012 / 12-16

Optimización de la técnica SSCP-HD para la detección de polimorfismos en el exón 3 del gen ADIPOQ

Optimization of the SSCP-HD technique for the detection of polymorphisms on exon 3 of the ADIPOQ gene

María C. González Giménez; María M. Tiscornia; Romina Hahn; Pedro D. Zapata; Graciela A. Bonneau

Resumen

Los polimorfismos del gen de la adiponectina están relacionados con alteraciones en su expresión con la subsecuente disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina, esto último se encuentra asociado a la insulino-resistencia, obesidad e hipertensión arterial, todos factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y oncológicas.

El objetivo del trabajo fue estandarizar una reacción de amplificación, PCR, seguida de detección mediante SSCP-HD (polimorfismo de conformación de cadena simple-heterodúplex) para el análisis de los polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) presentes en el exón 3 del gen ADIPOQ.

Las extracciones de ADN se realizaron por el método *Salting-Out* modificado, los cebadores fueron analizados mediante programas bioinformáticos, y los fragmentos obtenidos fueron analizados mediante la técnica de Polimorfismo en la Cadena Simple-Heterodúplex (SSCP-HD).

Con las condiciones utilizadas se logró la amplificación del exón 3 de ADIPOQ, identificándose patrones de corridas mediante la técnica de SSCP-HD que facilitarán el estudio posterior de los polimorfismos de simple nucleótido en el gen seleccionado.

Palabras clave: polimorfismos, adiponectina, PCR, SSCP-HD.

Abstract

Polymorphisms of the adiponectin gene are associated with alterations in expression with subsequent decrease in plasma levels of adiponectin. The latter is associated with insulin resistance, obesity, and hypertension, all risk factors for cardiovascular disease and cancer.

The objective of the present work was to standardize an amplification reaction, PCR, followed by detection by SSCP-HD (strand conformation polymorphism-heteroduplex simple) for the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in exon 3 of the gene ADIPOQ.

DNA extractions were performed by the modified salting-out method, the primers were analyzed using bioinformatics programs, and the fragments were analyzed by the technique of Polymorphism, Single-Stranded-Heteroduplex (SSCP-HD).

With the conditions used, the amplification of exon 3 of ADIPOQ was possible, identifying patterns of runs using the technique of SSCP-HD which will facilitate further studies of single nucleotide polymorphisms in the gene selected.

Key words: polymorphisms, adiponectin, PCR, SSCP-HD.

Introducción

La adiponectina (ADIPOQ) es una hormona producida exclusivamente por el tejido adiposo que podría tener un rol activo como antidiabético, antiinflamatorio y antiaterogénico (1,2). Fue identificada por cuatro grupos independientes, entre 1995 y 1996, designándose con diferentes nomenclaturas:

- Proteína de 30 kDa del adipocito relacionada con el complemento: Acrp30. (3)
- Adiponectina: ADIPOQ. (4)

- Proteína derivada del gen transcrito más abundante del tejido adiposo: apM1. (2)
- Proteína de unión a gelatina de 28 kDa: GBP28. (5)

El gen ADIPOQ está codificado por el brazo largo del cromosoma 3, locus 3q27. Posee una extensión de 17 Kb y está compuesto por 3 exones y 2 intrones.

La proteína está formada por 247 aminoácidos y organizada en cuatro dominios (3,6): secuencia señal amino terminal, región variable, dominio tipo colágeno (cAd) y dominio globular carboxilo terminal (gAd). Su estructura

cuaternaria está formada por trímeros asociados a través del dominio gAd, el cual también es responsable de la actividad biológica. (7)

Los SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) del gen de ADIPOQ están relacionados con alteraciones en su expresión con la subsecuente disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina, esto último se encuentra asociado a la insulina resistencia, obesidad, e hipertensión arterial, todos factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y oncológicas. (8, 9, 10).

Cook y Semple (11) observaron que el SNP rs121917815 afecta a la secreción de la adiponectina provocando la disminución o desaparición cuando el alelo es heterocigótico. También, reportaron que el SNP rs62625753, ubicado en el dominio tipo colágeno, reduciría el número de glicosilaciones post-traduccionales y no se produciría la estructura de colágeno de triple hélice, lo que disminuiría la secreción de adiponectina. Por otro lado, el SNP rs17366743, ubicado en la región de bisagra entre el dominio tipo colágeno y el dominio globular, podría provocar un cambio que obstaculice parcialmente la formación de complejos triméricos, sin alterar la expresión de la adiponectina, pero si su estructura cuaternaria, sin descartar que esto produzca un impacto en la acción sobre el receptor. (11,12). Estos 3 SNPs rs121917815, rs62625753, rs17366743 se encuentran en el exón 3 del gen ADIPOQ; basado en estas y en otras bibliografías en donde la mayoría estudiaron al exón 3 del gen ADIPOQ, además teniendo en cuenta las informaciones del NCBI (National center for Biotechnology Information) y EBI (European Bioinformatics Institute), se decidió trabajar con dicha región del gen.

Uno de los métodos utilizados para identificar los SNPs es la electroforesis en geles de poliacrilamida SSCP-HD (Single Strand Conformation Polymorphism-Heteroduplex). Es un método simple, de bajo costo y se fundamenta en la conformación espacial que adopta una hebra individual de DNA en condiciones no desnaturalizantes. Esta conformación depende de la secuencia nucleotídica y de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre sí mismo, y es capaz de detectar cambios provocados por una única modificación. La sensibilidad del método varía entre 80–90% para detectar mutaciones en fragmentos menores de 200 pares de bases (pb). (13)

El objetivo de este trabajo fue estandarizar una reacción de amplificación, PCR, seguida de detección mediante SSCP-HD para el análisis de los SNPs presentes en el exón 3 del gen ADIPOQ.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron 86 muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA obtenidas por punción venosa. La población analizada consistió en un grupo de empleados públicos del hospital de pediatría Dr. Fernando Barreyro de la ciudad de Posadas, Misiones. Todos los participantes del estudio fueron debidamente instruidos, firmaron su consentimiento informado antes de iniciar el estudio. Fueron excluidos aquellos individuos que presenten diabetes, hipotiroidismo o hipertiroidismo, enfermedad infecciosa, renal, hepática o neoplasias y embarazadas.

Extracción de ADN

Se utilizó el método de Salting-Out, una modificación del protocolo de Miller *et al.*, 1988 (14). Primeramente se lisaron los eritrocitos mediante Buffer de Lisis de Glóbulos Rojos (Tris-HCl 10mM; TRITON X-100 1%; Sacarosa 11%), y posteriormente se lisaron los leucocitos mediante la adición de Buffer de Lisis de Glóbulos Blancos (Tris-HCl 10mM; NaCl 400mM; EDTA 2mM), luego se agregó 50µl de solución de proteinasa K: proteinasa K 1 mg/ml; SDS 1%; EDTA 2mM. Las proteínas fueron eliminadas mediante acetato de potasio 3M y la precipitación del DNA se logró por el agregado de isopropanol. El DNA fue lavado con etanol 70%, secado, disuelto en agua destilada estéril y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización. Para verificar la integridad del DNA se realizaron geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con transiluminador UV.

Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta datos bibliográficos y bases de datos para dbSNPs del NCBI (data base de single-nucleotide polymorphism - National center for Biotechnology Information) y EBI (European Bioinformatics Institute). En todos los casos se utilizó la secuencia del contig NT 005612.16 para el Exón 3 del gen ADIPOQ y el programa Primer 3 (versión 0.4.0). (15)

PCR

Para ajustar la PCR se realizaron reacciones en un volumen de 20 µl conteniendo tampón para PCR (200mM (NH₄)₂SO₄; 750mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Tween 20), 0,5U de Taq-Polimerasa (Fermentas®), 10ng de ADN y cantidades variables de dNTPs (rango de 50 a 200µM), de MgCl₂ (rango de 1,5 a 6mM) y de cada cebador (rango de 0,5 a 0,25µM).

El ciclado realizado consistió en una desnaturalización

inicial de 3 min a 94°C seguida de 30 ciclos de 94°C por 20min, 55°C por 20min y 72°C por 20min. Los productos de amplificación fueron separados mediante geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con transiluminador UV.

SSCP-HD

Las muestras fueron desnaturalizadas mediante calentamiento a 95°C por 6 min en una solución de formamida 98%, EDTA 10mM pH 8, azul de bromofenol y rápidamente enfriadas en hielo. Posteriormente, fueron separadas en geles de poli(acrilamida) al 10% conteniendo 20% de formamida en tampón TBE 0,5X (Tris-borato 90mM pH 8,3; EDTA 4mM), a un voltaje constante de 100v y temperatura ambiente por aproximadamente 36h. Para la visualización del resultado de la electroforesis los geles fueron fijados en una solución de etanol 10% y ácido acético 0,75%, teñidos con nitrato de plata 2g/l y revelados con una solución de NaOH y formaldehído (16). El resultado fue registrado mediante Scanner HP Deskjet F300 All-in-One series.

Resultados y discusión

Basado en datos bibliográficos referidos a la epidemiología molecular de los SNPs observados en poblaciones de otros lugares, que ubican un gran número de polimorfismos en el exón 3 del gen ADIPOQ y considerando el objetivo se seleccionó este exón para el diseño de la metodología que permita analizar la presencia de los SNPs rs76533408, rs62625753, rs72563731, rs17366743, rs121917815, rs79645624, rs78129385, rs78685763 y rs113716447. (11,12)

Los resultados del análisis con el programa Primer3 arrojaron valores detallados en la tabla I, que fueron utilizados para elegir los cebadores óptimos. Se evaluaron las complementariedades de cada cebador sobre sí mismo y entre ellos, al igual que en sus extremos 3', lo que indicaría la formación de estructuras secundarias y la formación de dímeros. Además, se obtuvo el porcentaje de GC, cuyo óptimo se encuentra entre los rangos de 40-60%, y la Temperatura melting (Tm) que indica temperatura a la cual la mitad de las bases del cebador están apareadas con el ADN molde, y a partir de este valor, se decidió la temperatura de hibridación (Th).

Tabla I: Análisis bioinformático de los cebadores.

Cebadores	Izquierdo	Derecho
Secuencia	5'-GGCTGACCTTCACATCCTTC	5'-CCTAAGGGAGACATCGGTGA
Tamaño de secuencia en pb	20	20
Tm °C ^a	60,07	59,66
GC% ^b	55	55
3' ^c	2	0
Complementariedad entre los 2 cebadores	4	
Complementariedad 3' entre los 2 cebadores	2	
Producto de amplificación en pb	298	

a) Temperatura melting; b) Porcentaje de guanina y citosina; c) Complementariedad entre los extremos 3' de los cebadores.

Para la puesta a punto de la PCR se ajustó la concentración del MgCl₂ ya que éste actúa como cofactor de la Taq polimerasa, optimizándose este valor en 3,5 mM y amplificando de esta manera la región del Exón 3 del gen ADIPOQ. (Figura 1)

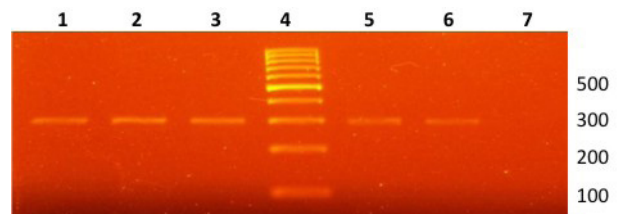


Figura 1: Resultado de la optimización de la PCR. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas del producto amplificado en la posición de 298 pb. En los carriles 1, 2, 3, 5, 6 muestras de los individuos, en el 4 se encuentra el PM y en el 7 el control negativo.

El método elegido para el estudio de los SNPs fue el SSCP-HD porque es un método reproducible, económico, rápido y fácil, de uso habitual en muchos laboratorios de biología molecular. La mejor técnica para detectar las mutaciones desconocidas es la secuenciación directa, pero requiere equipos poco disponibles actualmente y es costosa para ser usada rutinariamente (17). Uno de los principales inconvenientes de la técnica SSCP-HD, es la imprecisión existente todavía a los efectos de algunos parámetros que afectan su sensibilidad, como por ejemplo: la composición del gel, concentración de ADN y el contenido de guanina/citosina (G+C) del ADN. También se observaron dificultades en la detección de muestras con un contenido de G+C inferior al 40%, según Sheffield *et al.*, (17) los SNPs en fragmentos mayores de 200 nucleótidos son menos sensibles a ser detectados por SSCP, pero se ha demostrado que en condiciones adecuadas alelos de 261 y 335 pb pueden ser detectados (11,18). Sin embargo, ajustando todos estos parámetros puede arribarse a una optimización sin inconvenientes como es el caso presentado en este trabajo en el cual se analizó exitosamente una secuencia de 298 pb. En la figura 2 se observa un gel de poli(acrilamida) representativo de la optimización de la técnica SSCP-HD lograda para el fragmento amplificado del exón 3. En el gel se observa como una de las muestras, la número 48,

presenta un perfil electroforético diferente, pudiendo ser indicativo de la presencia de un cambio de secuencia, como por ejemplo un SNP, aunque el mismo debe ser confirmado por secuenciación. El reconocimiento de patrones diferenciales es fundamental para la identificación de muestras con posibles cambios de secuencia y constituye el primer paso para la caracterización de los mismos.

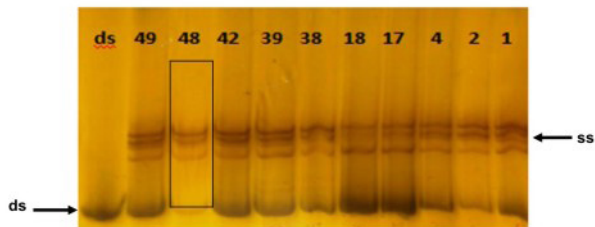


Figura 2: Resultado de la optimización del SSCP-HD. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con plata. En cada carril está indicado el código de la muestra. La muestra 48 presenta un patrón electroforético diferente al de los demás carriles. ds: cadena doble, ss: cadena simple.

Como conclusión se destaca la puesta a punto de la amplificación de un segmento del exón 3 del gen ADIPOQ y la determinación de patrones electroforéticos diferenciales que podrían emplearse para la identificación de cambios de secuencia que pudieran asociarse a algún SNPs en el fragmento amplificado de ADIPOQ.

Bibliografía

1. **Elissondo, N.; Gómez Rosso, L.; Maidana, P. y Brites, F.** Adiponectina: una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras., *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 42: p 17-33. 2008.
2. **Maeda, K.; Okubo, K.; Shimomura, I.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. y Matsubara, K.** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)., *Biochem Biophys Res Commun.* 221: p 286-289. 1996.
3. **Scherer, P.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G. y Lodish, H.** A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 270: p 26746-26749. 1995.
4. **Hu, E.; Liang, P. y Spiegelman, B.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271: p 10697-10703. 1996.
5. **Nakano, Y.; Tobe, T.; Choi-Miura, N.; Mazda, T. y Tomita, M.** Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 120: p 803-812. 1996.
6. **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. y Matsuzawa, Y.** Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24: p 861-868. 2000.
7. **Waki, H.; Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y.; Uchida, S.; Kita, S.; Hara, K.; Hada, Y.; Vasseur, F.; Froguel, P.; Kimura, S.; Nagai, R. y Kadowaki, T.** Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 278: p 40352-40363. 2003.
8. **Hara, K.; Boutin, P.; Mori, Y.; Tobe, K.; Dina, C.; Yasuda, K.; Toshimasa, Y.; Shuichi, O.; Terumasa, O.; Kazuhiro, E.; Hiro, K.; Ryoko, H.; Yasuo, A.; Yoshio, Y.; Ryoza, N.; Matsuo, T.; Koichi, M.; Madoka, Y.; Yasuko, N.; Satoshi, K.; Motowo, T.; Satoshi, K.; Chikako I.; Philippe, F. y Takashi, K.** Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in Japanese population. *Diabetes.* 51: p 536-540. 2002.
9. **Takashi, K.; Toshimasa, Y.; Naoto, K.; Kazuo, H.; Kohjiro, U y Kazuyuki, T.** Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation.* 116: p 1784-1792. 2006.
10. **Lopez Fontana, C.M.; Maselli Artola, M.E.; Di Milta Monaco, N.; Recalde Rincon, G.M.; Vanrell Rodriguez, M.C.; Uvilla Recupero, A.; Messina Lombino, D.; Perez Elizalde, R.F.; Lopez Laur, J.D.** Influencia de la leptina y adiponectina sobre el cáncer de próstata. *Arch Esp Urol.* 62:103-108. 2009.
11. **Cook, J. y Semple, R.** Hypoadiponectinemia—Cause or Consequence of Human “Insulin Resistance”? *J Clin Endocrinol Metab.* 95: p 1544-1554. 2010.
12. **Vasseur, F.; Helbecque, N.; Dina, C.; Lobbens, S.; Delannoy, V.; Gaget, S.; Boutin, P.; Vaxillaire, M.; Lepretre, F.; Dupont, S.; Hara, K.; Clement, K.; Bihain, B.; Kadowaki, T. y Froguel, P.** Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the Apm1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Human Molecular Genetics.* 11: 2607-2614. 2002.
13. **Cuzcano Estrada, A.; Sandoval, J.; Guevara Fujita, M. y Fujita R.** Uso de la técnica del SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Rev. peru. Biol.* 12: p 349-358. 2005.
14. **Miller, S.; Dykes, D. y Polesky, H.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc. Ac. Res.* 16 : p 1215. 1988.
15. **Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute;** http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. (verified 02 Oct. 2011)
16. **Canovas, F.; Gallardo, A.; Avila, C. y Claros, M.** *Bioquímica Aplicada. Diseño experimental y análisis de datos.* Asturias. Septem Ediciones. p 294. 2001
17. **Sheffield, V.; Beck, J.; Kwitek, A.; Sandstrom, D. y Stone, E.** The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitu-

tions. *Genomics* 16: p 325-332. 1993.

18. **Kakavas, V.; Plageras, P.; Vlachos, T.; Papaioannou, A. y Noulas, v.**, PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases. *Mol Biotechnol.* 38: p 155–163. 2008.

Recibido: 26/03/2012

Aprobado: 01/08/2012

- María del Carmen González Giménez^{1,2}

Es Bioquímica egresada de la Universidad Nacional de Misiones. Integrante del proyecto de investigación “Insulino-resistencia y riesgo cardiovascular en empleados hospitalarios”, Incentivado código 16/Q369 (Resolución: 344-10). Es Becaria del CEDIT (Resolución N° 45/11). Adscripta al sector Hormonas y Marcadores Tumorales del Laboratorio Central Hospital Madariaga. Realiza tareas de extensión y servicio en el Laboratorio de Biotecnología Molecular.

- María Mercedes Tiscornia¹

Es Licenciada en Genética y alumna de Doctorado en Bioquímica en la Universidad Nacional de Tucumán. Actualmente es Auxiliar de Primera Regular de la Cátedra de Biología Molecular y Genética desde el año 2010. Es Becaria del CONICET Categoría I. Se desempeña como Investigador del Proyecto PICTO 37029 financiado por la ANPCyT, habiendo participado además del proyecto financiado por la ANPCyT (PICT 05-15058). Realiza tareas de extensión y servicio en el Laboratorio de Biotecnología Molecular. Posee publicaciones en revistas indexadas y presentaciones a congreso.

- Romina Hahn^{1,2}

Es alumna de la carrera de Bioquímica de la Universidad Nacional de Misiones. Becaria del proyecto de investigación “Insulino-resistencia y riesgo cardiovascular en empleados hospitalarios” Incentivado código 16Q369 (Resolución: 344-10). Adscripta auxiliar docente a la cátedra Bioquímica Clínica II (Res. N° 124/11).

- Graciela Alicia Bonneau^{1,2}

Bioquímica especialista en Química Clínica, egresada de la Universidad Nacional de Misiones. Residencia en Bioquímica Clínica. Profesional Bioquímica de Planta Permanente del Laboratorio Central a cargo del sector de Hormonas y Marcadores Tumorales, Hospital Dr. Ramón Madariaga de Posadas-Misiones. Docente Jefe Trabajos Prácticos de la materia Práctica Hospitalaria de la carrera de Bioquímica. Directora de tesis, becarios y pasantes. Investigadora categoría III. Directora de Programa y Proyectos. 21 Publicaciones en revistas nacionales e internacionales. Obtención de 4 premios, internacional, nacional y regional por mejor trabajo científico.

- Pedro Darío Zapata¹

Es Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares. Se desempeña actualmente como Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría I en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. En el área de Biomedicina ha sido beneficiario de subsidios de la ANPCyT: PICT 05-15058 y PICTO 37029. Dirige auxiliares, becarios de grado y posgrado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

1. Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM. E-mail: biotecmol2010@gmail.com.

2. Laboratorio Central Hospital Dr. Ramón Madariaga – Ministerio de Salud Pública. Av. Mariano Moreno 1375. (3300) Posadas, Misiones. Argentina.