

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

*Recebido em  
06/01/05  
Karina  
ok lilac*

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**RASTREAMENTO MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR  
ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA GAMA  
(PPAR $\gamma$ ) EM PACIENTES COM DIABETES MELITO DO TIPO 2**

**Vladimir Tavares**

Tese para obtenção do grau de  
**DOUTOR**

Orientador: Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata

**São Paulo**

**2004**

18070

DEDALUS - Acervo - CQ



30100010386

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tavares, Vladimir

T231r Rastreamento molecular do gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) em pacientes com diabetes melito do tipo 2 / Vladimir Tavares. -- São Paulo, 2004.

124p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Genética 3. Biologia molecular I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Vladimir Tavares

RASTREAMENTO MOLECULAR DO GENE DO RECEPTOR  
ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA GAMA  
(PPAR $\gamma$ ) EM PACIENTES COM DIABETES MELITO DO TIPO 2

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata  
orientador/presidente

*Prof. Dra. Rozangela Serlencija*

1º examinador

*Prof. Dra. Sandra Mara Ferreira Villas*

2º examinador

*Prof. Dra. Roxana Otton*

3º examinador

*Prof. Dra. Regina Célia M.S. Moises*

4º examinador

São Paulo, 05 de novembro de 2004.

Se creres em Deus, caminharás sem aflição e sem medo, nas trilhas do mundo, por maiores que sejam perigos e riscos a te obscurecerem a estrada, porquanto, ainda mesmo à frente da morte, reconhecerás que permaneces com Deus, tanto quanto Deus está sempre contigo, além de provações e sombras, limitações e mudanças, em plenitude de vida eterna.

*Emmanuel*

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**Dedico este trabalho....**

**Aos meus filhos Victor e Viviane, cujo amor incondicional permitiu  
que eu suportasse os momentos mais difíceis da vida.**

---

**Ao Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata**

Pelo convívio, amizade, incentivo, ensinamentos e por colaborar de maneira importante na minha formação como pesquisador.

**À Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata,** pelos ensinamentos e rigor científico que muito colaboraram em minha formação como pesquisador.

---

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Regina Célia Mello Santiago Moisés, do Departamento de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo, pelas sugestões e análise crítica deste trabalho.

Ao Serviço de Endocrinologia da Santa Casa de São Paulo, em nome do Prof. Dr Osmar Monte, Dr João Eduardo N. Salles e Dra. Alexandra C. Speranza, pelo fornecimento de amostras e dados clínicos dos pacientes utilizados neste estudo.

Ao Serviço de Endocrinologia do Hospital Geral de São Paulo, em nome do Dr Sidney Gomes, pelo fornecimento de amostras e dados clínicos dos pacientes utilizados neste estudo.

À Dra. Ines Barroso do Incyte Genomics, Londres, Inglaterra, pelo fornecimento de iniciadores utilizados neste estudo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro concedido (Proc. 01/06825-4) que possibilitou a realização desta pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Hamilton Massayuki Hinuy, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Bety Chen, Mustafa Hassan Issa, Fabiana Cristina Perreira, Marília Reis Gonçalves Rocha, André Ducat Luchessi, Simone Cohen Sisorkin e Adriana Natsue Ozaki, pela amizade e consideração.

**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas.....	3
1. Introdução.....	9
1.1. Estrutura do receptor.....	11
1.2. RXR e heterodimerização.....	11
1.3. Cofatores.....	12
1.4. PPREs.....	12
1.5. Ligantes sintéticos dos PPARs.....	14
1.6. Ligantes naturais.....	14
1.7. PPAR $\alpha$ .....	15
1.8. PPAR $\beta$ .....	15
1.9. PPAR $\gamma$ .....	16
1.10. PPARs no mecanismo de sensibilização à insulina.....	16
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Casuística.....	24
3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão.....	25
3.3. Materiais.....	27
3.4. Métodos.....	28
3.5. Métodos moleculares.....	32
3.6. Análise estatística.....	47

---

4. Resultados.....	50
5. Discussão.....	96
6. Conclusões.....	108
7. Referências bibliográficas.....	109

**Lista de abreviaturas**

A	adenina
AF-1	sítio de ativação transcricional ligante independente
AF-2	sítio de ativação transcricional ligante dependente
aP2	proteína que se liga a ácidos graxos no adipócito
bp	pares de bases
cDNA	cadeia complementar de DNA
°C	Graus Celsius
C	citosina
CPT I	camitina palmitoil transferase I
CN	controle normal
CT	colesterol total
DM2	diabetes melito do tipo 2
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfato
DBD	domínio de ligação ao DNA
DR – 1	seqüências repetidas diretas separadas por 1 base
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FATP	proteína transportadora de ácidos graxos
G	guanina
GE	grupo de estudo
GC	grupo controle
GPO	glicose peroxidase

HDL-C	colesterol da HDL
HOMA-IR	modelo homeostático para resistência insulínica
HOMA- $\beta$	modelo homeostático - função secretora-células beta
HCl	ácido clorídrico
IMC	índice de massa corpórea
ICQ	índice cintura quadril
IC	intervalo de confiança
IVS	seqüências intervenientes
IR	insulino resistência
Kb	kilobases
KV	kilovolt
KCl	cloreto de potássio
LDL-C	colesterol da LDL
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LBD	domínio de ligação ao ligante/ativador
LPL	lipase lipoprotéica
M	molar
mg	miligramas
mL	mililitro
mM	milimolar
min	minuto
mRNA	RNA mensageiro
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
ng	nanograma
n	número de indivíduos

N-CoR	co-repressor núcleo receptor
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAR	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPRE	elemento responsivo ao PPAR
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
PAD	pressão arterial diastólica
pmol	picomol
RAR	receptor do ácido retinóico
RXR	receptor do ácido 9 cis-retinóico
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucléico
RC	razão de chances
rpm	rotações por minuto
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples
SMRT	mediador silencioso - retinol e hormônio da tireóide
SRC	coativador 1 do receptor de esteróides
SDS	dodecil sulfato de sódio
S	segundo
T	timina
TR	receptor do hormônio da tireóide
TZDs	tiazolidinedionas

---

TAG	triacilglicerol
TNF	fator de necrose tumoral
TE	tris-EDTA
TBE	tris borato EDTA
Tris-HCl	tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
UV	ultravioleta
UI	unidades internacionais
VLDL-C	colesterol da VLDL
VDR	receptor da vitamina D3
V	volts

---

## Resumo

---

No presente estudo utilizaram-se as técnicas do polimorfismo conformacional de fita simples (PCR-SSCP) e seqüenciamento na prospecção e caracterização de polimorfismos no gene do *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma* (PPAR $\gamma$ ) em pacientes com diabetes melito do tipo 2 (DM2). Foi possível, portanto, caracterizar cinco polimorfismos, sendo um destes localizado em região intrônica (IVS3+21A>T) e quatro em região codificadora (exon B: 34C>G; exon 1: 90C>A e 159C>T e exon 6: 161C>T) no gene do PPAR $\gamma$ . As regiões referentes aos polimorfismos 34C>G e 161C>T foram amplificadas pela técnica da PCR e analisadas por restrição enzimática. O polimorfismo 34C>G no grupo de estudo (GE), mostrou associação do genótipo Pro/Pro com valores séricos elevados de insulina, índices HOMA-IR e HOMA- $\beta$  em comparação com portadores do genótipo Pro/Ala+Ala/Ala. Em mulheres do GE, portadoras dos genótipos CT+TT apresentaram menores valores séricos de triacilgliceróis (TAG) e VLDL-C do que não portadoras (genótipo CC) para o polimorfismo C161>T. Conclui-se que as técnicas empregadas nesta investigação foram capazes de caracterizar os polimorfismos apresentados e genotipar as alterações moleculares 34C>G e 161C>T para o GE e controle. Os resultados isoladamente indicam que o polimorfismo 34C>G está associado à variabilidade na concentração sérica e secreção de insulina em pacientes com DM2 e o polimorfismo 161C>T foi associado com menor concentração sérica de TAG e VLDL-C, em mulheres com DM2, por provável desequilíbrio de ligação com outras alterações no gene do PPAR $\gamma$ . No estudo de associação destes polimorfismos os resultados individuais para cada polimorfismo foram confirmados, porém, como estão em desequilíbrio de ligação, os efeitos apresentados sobre o metabolismo de lipídeos e carboidratos podem ser devidos ao polimorfismo 34C>Gou161C>T.

**Abstract**

---

The present investigation employed single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) followed by cycle sequencing for the screening and characterization of polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR $\gamma$ ) gene in patients with Type 2 diabetes mellitus (2DM). It has been possible to characterize 5 different polymorphisms, 1 located in intron (IVS3+21A>T) and 4 in coding regions (exon B: 34C>G; exon 1: 90C>A and 159C>T and exon 6: 161C>T) of the PPAR $\gamma$  gene. The polymorphic regions 34C>G and 161C>T of the PPAR $\gamma$  gene were amplified by PCR and analyzed by enzymatic restriction. The polymorphism 34C>G showed that in the 2DM group, fasting insulin and HOMA index were significantly higher in Pro/Pro genotype carriers than non-carriers. In women of the 2DM group the concentrations of triacylglycerol (TAG) and VLDL-C were significantly lower in CT+TT genotype carriers than non-carriers for the polymorphism 161C>T. In conclusion it was possible to characterize 5 different polymorphism using SSCP and sequencing in diabetic type 2 individuals. Furthermore, a successful enzymatic restriction was applied to the polymorphic regions 34C>G and 161C>T in the 2DM group and controls. The isolated results indicate that the 34C>G polymorphism was associated with the sensibility and variability of insulin levels in 2DM individuals and the 161C>T polymorphism was associated to lower levels of AIP, TAG and VLDL-C in serum of the women (2DM group) suggesting that the action of genetic variation at the PPAR $\gamma$  locus is in linkage disequilibrium with another, yet to be identified gene alterations. In the study of association the isolated results were confirmed, nevertheless, the two polymorphism were in linkage disequilibrium, and therefore, the effects of the lipids and carbohydrates metabolism observed with one polymorphism may be due to linkage with the other.

## 1. Introdução

---

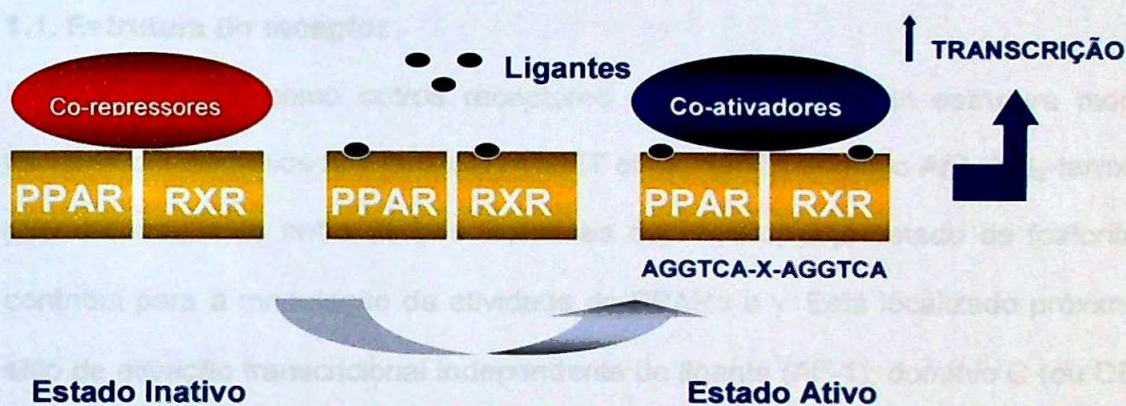
PPARs (*peroxisome proliferators-activated receptors*) são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica. Estruturalmente podem ser incluídos como membros da subfamília de receptores que incluem o receptor do hormônio da tireóide (TR), receptor do ácido retinóico (RAR) e o receptor da vitamina D<sub>3</sub> (VDR).

Três proteínas, codificadas por genes distintos, tem sido identificadas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ . Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam a expressão do gene alvo, pela ligação a específicos PPREs (*peroxisome proliferator response elements*) situados em sítios regulatórios de cada gene. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcricionais, resultando em aumento na transcrição gênica (Figura 1).

O PPAR foi originalmente identificado em 1990 (ISSEMAN & GREEN, 1990) com a primeira clonagem (PPAR $\alpha$ ) ocorrendo durante a pesquisa do alvo molecular para agentes proliferadores do *peroxisoma* em roedores. Desde então, numerosos ácidos graxos e derivados, incluindo uma variedade de eicosanóides e prostaglandinas tem sido identificados como ligantes para os PPARs, tendo também sido demonstrado que são alvos para numerosas classes de compostos sintéticos, utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias. Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos destes receptores torna-se extremamente importante, quer no desenvolvimento como na utilização de drogas para o tratamento de doenças metabólicas.

Neste sentido, vários pesquisadores tem investigado uma relação entre a ação reguladora para o PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$  em uma ampla variedade de tecidos, tais como de relacionamento ao sistema vascular, incluindo a formação e estabilização das placas de aterosclerose, níveis vasculares e angiogênese. Os PPARs também tem sido implicados na regulação da diferenciação celular e na manutenção da homeostase.

### 1.1. Estrutura do receptor



**Figura 1: Mecanismo de ativação transcricional pelo PPAR.** Requer a liberação do complexo co-repressor (atividade deacetilase da histona), feito por um ligante, e o recrutamento de complexo co-ativador (atividade acetiltransferase). Adaptado de AUWERX, 1999.

Neste sentido, vários pesquisadores tem intensificado seus estudos sobre a ação regulatória para o PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$  em uma ampla variedade de eventos, tais como: os relacionados ao sistema vascular, incluindo a formação e estabilidade das placas de aterosclerose, tônus vascular e angiogênese. Os PPARs também tem sido implicados na regulação da diferenciação celular e na fisiopatologia da carcinogênese.

### 1.1. Estrutura do receptor

Os PPARs, como outros receptores nucleares, possuem estrutura modular formada por domínios funcionais (LAUDET *et al.*, 1992): domínio A/B (NH<sub>2</sub>-terminal), pouco conservado entre as três isoformas de PPARs, cujo estado de fosforilação contribui para a modulação da atividade do PPAR $\alpha$  e  $\gamma$ . Está localizado próximo ao sítio de ativação transcricional independente de ligante (AF-1); domínio C (ou DBD – *DNA binding domain*), contém os *zinc finger*, que são dois arranjos protéicos constituídos de uma  $\alpha$ -hélice e uma folha  $\beta$ -pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central, que confere maior estabilidade de dobramento, permitindo associações firmes quando da ligação aos PPREs na região regulatória de genes responsivos ao PPAR; região D, importante como cofator e a região EF (COOH-terminal), a qual possui o domínio LBD (*ligand binding domain*) e o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2) (SCHOONJANS *et al.*, 1996). Os domínios DBD e LBD são as regiões mais conservadas em todos os PPARs. (Figura 2).

### 1.2. RXR e heterodimerização

Os PPARs formam heterodímeros com o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR) (WERMANN *et al.*, 1997). Assim como os PPARs, existem três formas distintas de RXR: RXR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (CHAMBON, 1996), apresentando distribuição distinta nos tecidos (MANGELSDORF & EVANS, 1995). Quanto aos ligantes, são ativados pelo

ácido 9-*cis* retinóico (MANGELSDORF *et al.*, 1992) e por ligantes sintéticos que são mais potentes e específicos (BOEHM *et al.*, 1995).

Entretanto, agonistas sintéticos de RXR podem ativar o complexo e exercer atividade antidiabética similar às observadas com PPARs em modelos de camundongos no diabetes do tipo 2 (MUKHERJEE *et al.*, 1997). É importante também destacar que os PPARs são incapazes de se ligarem ao DNA como monômeros, cuja propriedade tem sido atribuída à região N-terminal.

### **1.3. Cofatores**

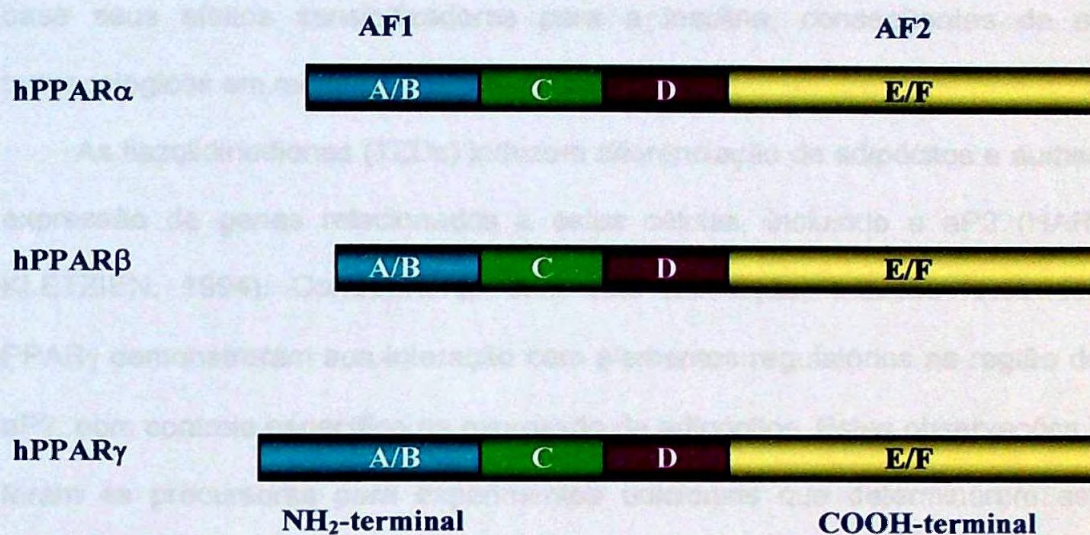
Vários co-fatores, tanto ativadores como repressores, que capacitam os receptores nucleares a iniciar ou suprimir o processo de transcrição foram identificados (XU *et al.*, 1999). Vários co-ativadores, por exemplo, SRC-1 (co-ativador 1 do receptor de esteróides), possuem atividade histona acetilase que pode remodelar a estrutura da cromatina, deixando-a mais frouxa e facilitando a atividade transcricional. O co-repressor N-CoR (co-repressor núcleo receptor) é uma proteína que interage com o receptor nuclear livre, mediando um sinal repressivo para o promotor no qual o complexo está ligado (DIRENZO *et al.*, 1997).

### **1.4. PPREs (*peroxisome proliferator response element*)**

Os PPREs são formados por dois hexanucleotídeos com uma seqüência de consenso AGGTCA A AGGTCA, separada por um único nucleotídeo, também chamado de DR-1 e localizado na região promotora dos genes que estão sob seu controle transcricional (GEARING *et al.*, 1993). Seqüências com estas características tem sido encontradas em numerosos genes relacionados ao PPAR, tais como a acil-CoA oxidase e a proteína de ligação aos ácidos graxos nos adipócitos (aP2) (WAHLI *et al.*, 1995).

### 1.3. Ligandos naturais dos PPARs

Principais moléculas no âmbito de atuação ultravioleta agem como ligandos naturais dos PPARs, como o grupo de ácidos graxos saturados e insaturados (prostaglandina, resorcinóis e retinóis), esteroideamente derivados do ácido colesterol, permitindo determinar seu site primário de ação molecular. Estes ácidos graxos foram descobertos como ligandos naturais dos PPARs em 1992, quando foram descobertos os ácidos graxos como ligandos naturais dos PPARs.



**Figura 2: Domínios funcionais dos PPARs.** Domínio A/B - relacionado a fosforilação que regula diretamente sua atividade. Domínio C - contém os zinc fingers, responsável pela ligação ao DNA; Domínio D - co-fator; Domínio E/F - região terminal COOH. Adaptado de DESVERGNE & WAHLI, 1999.

### **1.5. Ligantes sintéticos dos PPARs**

Pesquisas realizadas na década de noventa utilizando agentes antidiabéticos, como o grupo de drogas denominadas tiazolidinedionas (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona), estruturalmente derivadas do ácido clofibrico, permitiram determinar seu sítio primário de ação molecular. Estas drogas foram desenvolvidas tendo como base seus efeitos sensibilizadores para a insulina, conseqüentes de estudos farmacológicos em modelos animais.

As tiazolidinedionas (TZDs) induzem diferenciação de adipócitos e aumentam a expressão de genes relacionados a estas células, incluindo a aP2 (HARRIS & KLETZIEN, 1994). Corroborando com esta afirmação, estudos realizados com PPAR $\gamma$  demonstraram sua interação com elementos regulatórios na região do gene aP2, com controle específico na expressão de adipócitos. Estas observações iniciais foram as precursoras para experimentos adicionais que determinaram as TZDs como ligantes e agonistas do PPAR $\gamma$  (BERGER *et al.*, 1996).

As TZDs foram desenvolvidas, primeiramente, para melhorar as ações antidiabéticas dos fibratos (drogas hipolipidêmicas). Estas drogas têm efeitos sensibilizadores para a insulina e atividade antidiabética em pacientes com diabetes melito do tipo 2 ou tolerância à glicose diminuída (WILSON *et al.*, 2000).

### **1.6. Ligantes naturais**

Ácidos graxos e derivados eicosanóides ligam e ativam PPAR $\gamma$  em concentrações micromolares, como os ácidos graxos poliinsaturados e os ácidos graxos essenciais linoleico, linolênico, aracdônico e eicosapentaenóico (XU *et al.*, 1999). Derivados da PGD<sub>2</sub>, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), também são agonistas, embora sua relevância fisiológica não esteja esclarecida, haja vista que suas concentrações não podem ser determinadas com segurança.

PPAR $\alpha$  pode ser ativado por uma ampla variedade de ácidos graxos saturados e insaturados, incluindo ácido palmítico, oléico, linoleico e aracdônico.

### 1.7. PPAR $\alpha$

Em humanos, tem sido mapeado no cromossomo 22, adjacente à região 22q12-q13.1 (SHER *et al.*, 1993), sendo o PPAR $\alpha$  de murinos o primeiro membro desta subclasse de receptores a ser clonado. É expresso em numerosos tecidos metabolicamente ativos, tais como: fígado, rins, coração, músculo esquelético, monócitos e células da musculatura vascular lisa (STAELS *et al.*, 1998). Estudos recentes tem mostrado que desempenham função importante na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Induz a expressão da FATP (proteína transportadora de ácidos graxos), responsável pelo transporte destes compostos através da membrana celular, atuando também de maneira direta na transcrição de ácidos graxos de cadeia longa (SCHOONJANS *et al.*, 1995), acetil-CoA oxidase (DREYER *et al.*, 1992), na enzima multifuncional enoil-CoA hidratase/desidrogenase (MARCUS *et al.*, 1993), ceto-acil-CoA tiolase (ZHANG *et al.*, 1993) e enzimas da  $\beta$ -oxidação *peroxisomal*. PPRE funcional tem sido identificado na região do gene codificador da CPT I (carnitina palmitoil transferase I), com grande efeito indutor nesta enzima, através de ligantes que atuam diretamente no PPAR $\alpha$  (BRANDT *et al.*, 1998). Portanto, PPAR $\alpha$  é um importante sensor e regulador no metabolismo energético.

### 1.8. PPAR $\beta$

O gene do PPAR $\beta$  está localizado no cromossomo 6p21.1-p21.2 (YOSHIKAWA *et al.*, 1996), tendo sido clonado no início da década de noventa. É expresso em uma grande variedade de tecidos e células, com níveis mais altos de expressão no

cérebro, tecido adiposo e pele (AMRI *et al.*, 1995). Até o momento, nenhum gene alvo específico foi identificado para este receptor.

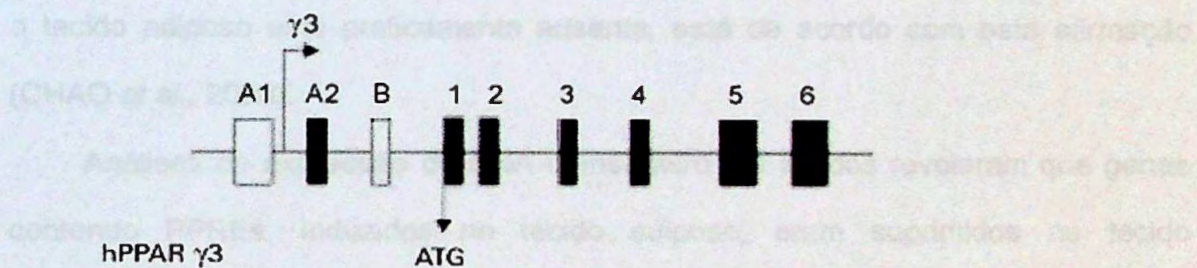
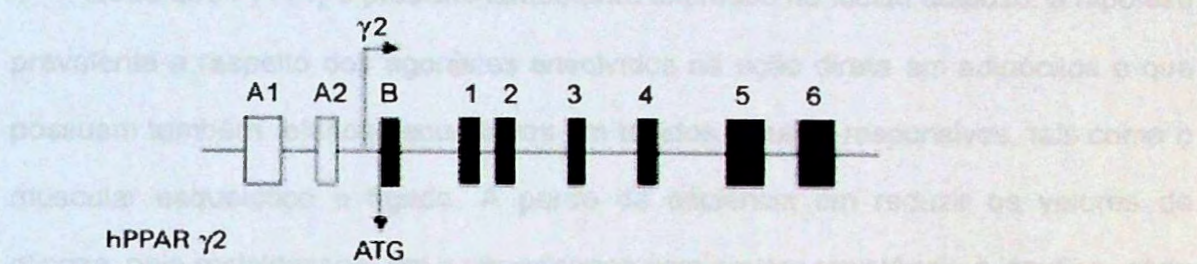
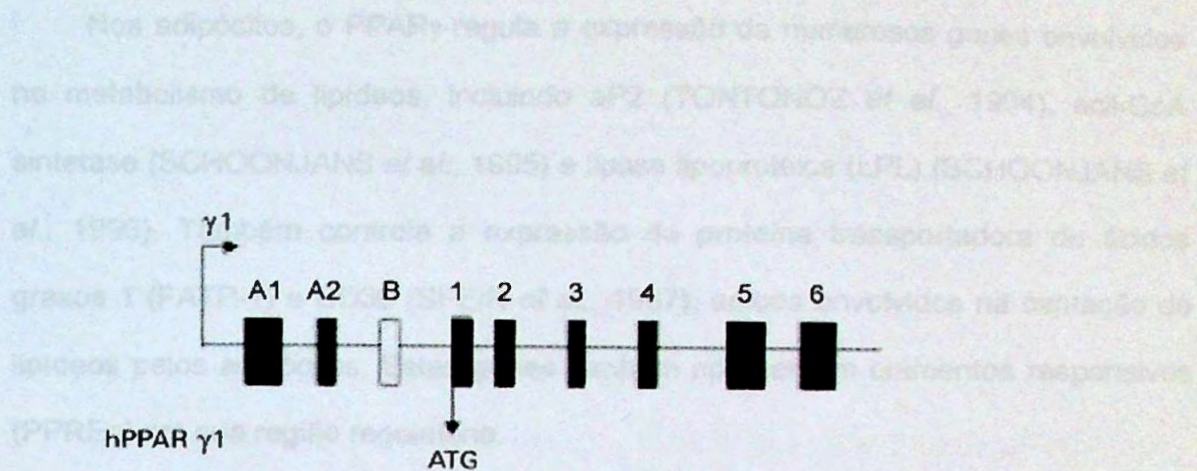
### **1.9. PPAR $\gamma$**

O gene do PPAR $\gamma$  foi mapeado no cromossomo 3 (GREENE *et al.*, 1995), região 3p25, dando origem a três RNA mensageiros: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 e PPAR $\gamma$ 3, que diferem em sua extremidade 5', como consequência de diferentes promotores e ao *splicing* alternativo. O PPAR $\gamma$ 1 é codificado por oito exons, compreendendo dois exons  $\gamma$ 1 específicos na região 5' não traduzida, A1 e A2, e seis exons comuns aos três RNA mensageiros. PPAR $\gamma$ 2, codificado por sete exons, sendo o exon B específico para este receptor, codificando 28 aminoácidos na região N-terminal e PPAR $\gamma$ 3, que codifica a mesma proteína que PPAR $\gamma$ 1, sendo controlado por um promotor distinto, localizado na região 5', próxima a A2 (FAJAS *et al.*, 1998). (Figura 3).

PPAR $\gamma$ 1 é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo o coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço. PPAR $\gamma$ 2 é expresso no tecido adiposo (FAJAS *et al.*, 1997) e PPAR $\gamma$ 3 tem expressão restrita a macrófagos e intestino grosso (FAJAS *et al.*, 1998).

### **1.10. PPARs no mecanismo de sensibilização à insulina – aspectos moleculares**

PPAR $\gamma$  é necessário e suficiente para diferenciar adipócitos. A introdução de PPAR $\gamma$  em fibroblastos, na presença de ligantes fracos para o PPAR, induziu diferenciação destas células em adipócitos (TONTONOV *et al.*, 1994). Outros pesquisadores, trabalhando com camundongos destituídos de PPAR $\gamma$ , observaram que estes apresentavam reduzida quantidade de tecido adiposo (BARAK *et al.*, 1999) ou exibiam extrema lipodistrofia.



**Figura 3: Representação esquemática da organização genômica do PPAR $\gamma$  humano com suas isoformas.** Os exons 1-6 são comuns para os três transcritos. A transcrição dos promotores  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 3 resulta na mesma proteína (477 aminoácidos) e  $\gamma$ 2 numa proteína com 505 aminoácidos. Adaptado de AUWERX, 1999.

Nos adipócitos, o PPAR $\gamma$  regula a expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, incluindo aP2 (TONTONNOZ *et al.*, 1994), acil-CoA sintetase (SCHOONJANS *et al.*, 1995) e lipase lipoprotéica (LPL) (SCHOONJANS *et al.*, 1996). Também controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36 (SFEIR *et al.*, 1997), ambos envolvidos na captação de lipídeos pelos adipócitos. Estes genes também apresentam elementos responsivos (PPREs) em sua região regulatória.

Dado que PPAR $\gamma$  é predominantemente expresso no tecido adiposo, a hipótese prevalente a respeito dos agonistas envolvidos na ação direta em adipócitos é que possuam também efeitos secundários em tecidos insulino responsivos, tais como o muscular esquelético e fígado. A perda da eficiência em reduzir os valores de glicose, pela rosiglitazone, em camundongos com severa resistência à insulina, onde o tecido adiposo está praticamente ausente, está de acordo com esta afirmação (CHAO *et al.*, 2000).

Análises da expressão de RNA mensageiro em tecidos revelaram que genes contendo PPREs, induzidos no tecido adiposo, eram suprimidos no tecido esquelético. Entretanto, agonistas do PPAR $\gamma$ , com ação metabólica benéfica em tecidos distantes (músculo e fígado), provavelmente estão envolvidos com efeitos combinados, pois acentuam a captação, mediada pela insulina, no tecido adiposo, estoque e catabolismo de ácidos graxos livres, induz a produção de fatores derivados dos adipócitos com potencial ação sensibilizadora para a insulina e suprimem os níveis circulantes e/ou ações de fatores derivados do tecido adiposo que causam insulino resistência, como TNF $\alpha$  ou resistina (STEPAN *et al.*, 2001). Portanto, a ativação do PPAR $\gamma$  poderia induzir um aumento do *clearance* de ácidos graxos pelo tecido adiposo, com conseqüente diminuição na concentração plasmática e transporte para o músculo. Esta diminuição de ácidos graxos no

músculo aumenta a sensibilidade à insulina (RANDLE *et al.*, 1991); a atividade adipogênica do PPAR $\gamma$  contribui de forma importante neste efeito.

Evidências da ligação do PPAR $\gamma$  com a ação da insulina, em humanos, também tem sido observada pelo estudo de alterações genéticas, de ocorrência natural, no receptor PPAR $\gamma$ . Foram identificadas até o momento sete mutações pontuais, com fenótipo associado à obesidade (BEAMER *et al.*, 1998; RISTOW *et al.*, 1998), insulino resistência, diabetes e hipertensão (BARROSO *et al.*, 1999), lipodistrofia parcial e doença arterial coronariana. (WANG *et al.*, 1999; HEGELE *et al.*, 2002; AGARWAL & GARG, 2002) (Figura 4).

Um polimorfismo relativamente comum, localizado na porção amino-terminal da isoforma PPAR $\gamma$ 2, substituindo a prolina por alanina no códon 12 (34C>G), tem sugerido apresentar efeito protetor contra o risco de desenvolver diabetes melito do tipo 2. Este alelo, cuja frequência é de aproximadamente 15% em Caucasianos, foi originalmente associado com baixo índice de massa corpórea (IMC) e melhor sensibilidade à insulina (DEEB *et al.*, 1998), porém, alguns questionamentos têm sido propostos em relação a estes estudos (YEN *et al.*, 1997; MANCINI *et al.*, 1999; EK *et al.*, 2001; SÁNCHEZ *et al.*, 2002). Após demonstrarem que portadores do alelo Ala12 possuíam o receptor PPAR $\gamma$  com capacidade deficiente em ligar e transativar genes alvos, DEEB *et al.* (1998) concluíram que um mecanismo molecular estaria envolvido para explicar as diferenças entre os genótipos, sugerindo que a diminuição da massa de tecido adiposo, como evidenciado pelo IMC, poderia melhorar a sensibilidade à insulina. Esta hipótese é consistente com a observação de que PPAR $\gamma$ 2 tem papel regulatório único na adipogênese (REN *et al.*, 2002). No mesmo estudo, uma significativa razão de chances (RC = 4,35;  $P = 0,028$ ) para a associação

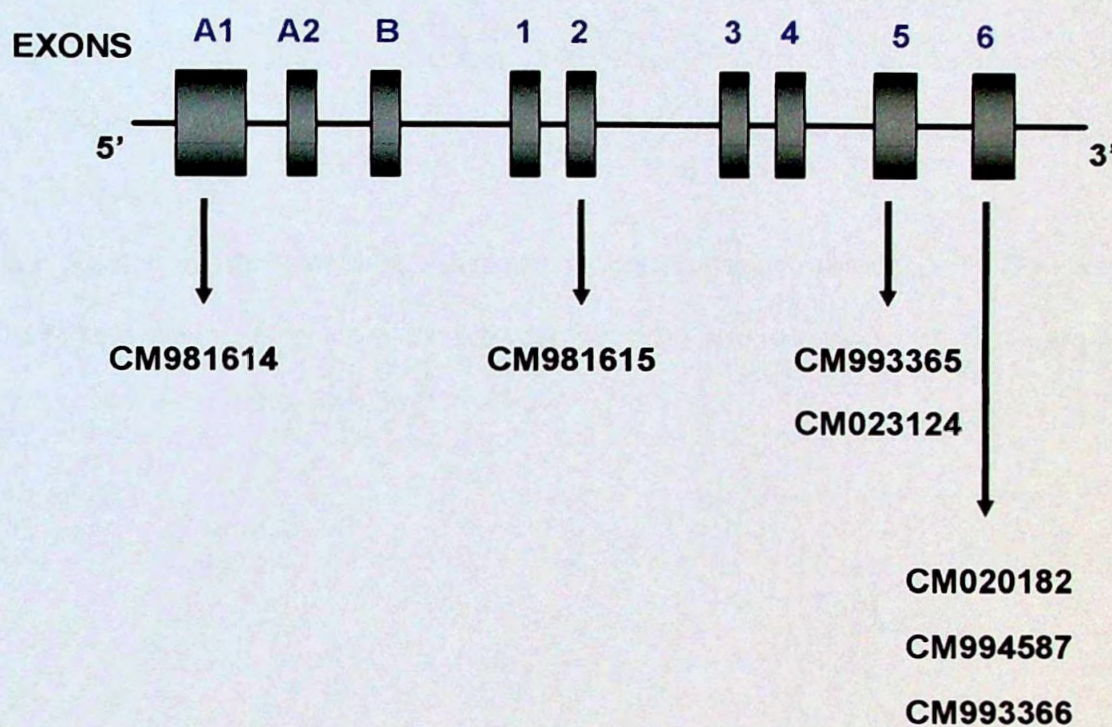
do alelo Pro12 com diabetes melito do tipo 2 foi observado entre grupos de segunda geração de japoneses americanos.

Um grande estímulo inicial em relação ao polimorfismo 34C>G, como um *locus* susceptível ao diabetes, foi evidenciado quando estudos sugeriram associação estatisticamente significativa com o risco da doença (MANCINI *et al.*, 1999; RINGEL *et al.*, 1999; CLEMENT *et al.*, 2000; HARA *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000).

Enquanto o estudo da alteração molecular 34C>G sugeriu forte ligação genética com o diabetes melito do tipo 2, provavelmente a maior evidência da ligação direta entre sensibilidade à insulina e a ação do PPAR $\gamma$ , em humanos, foi o estudo de indivíduos heterozigotos para uma mutação no domínio de ligação LBD, resultando em significativa disfunção do receptor (BARROSO *et al.*, 1999; AGARWAL & GARG, 2002; HEGELE *et al.*, 2002). No trabalho de BARROSO *et al.* (1999), três indivíduos heterozigotos para uma das duas mutações encontradas (Val290Met e Pro467Leu) no PPAR $\gamma$ , apresentavam acentuada resistência à insulina e início de diabetes melito do tipo 2, o que evidenciava a ligação entre a ação do PPAR $\gamma$  e a regulação da homeostase da glicose em mamíferos. Os indivíduos afetados, apresentavam numerosas características de síndrome metabólica, incluindo: dislipidemia, hipertensão e hiperuricemia. Na abordagem molecular, os receptores mutantes demonstravam regulação transcricional prejudicada.

Portanto, somente com o desenvolvimento de técnicas moleculares, como as de *Southern blot*, reação em cadeia pela polimerase (PCR), seqüenciamento de DNA, polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e clonagem, entre outras, permitiu avanços consideráveis nos estudos genéticos do PPAR $\gamma$ , abrindo enormes perspectivas para a análise deste gene e contribuindo de forma acentuada para o estudo molecular do diabetes melito do tipo 2.

Baseado nestas informações e na ausência de dados do estudo na população brasileira, o presente trabalho teve como objetivo verificar a utilidade das alterações moleculares encontradas no gene PPAR $\gamma$  como marcadores genéticos em indivíduos com diabetes tipo 2.



**Figura 4: Pontos de mutação no gene do PPAR $\gamma$  descritos até o momento.** Adaptado de informações obtidas do *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* e *Human Gene Mutation Database, Cardiff (HGMD)* – 2004. CM: número de acesso (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd/search.html>).

Baseados nestas informações e na escassez deste tipo de estudo na população brasileira, o presente trabalho teve como objetivo verificar a utilidade das alterações moleculares encontradas no gene PPAR $\gamma$ , como marcadores genéticos em indivíduos com diabetes melito do tipo 2.

## **2. Objetivos**

---

**2.1.** Aplicar as técnicas da PCR-SSCP e seqüenciamento, na prospecção e caracterização de polimorfismos no gene do PPAR $\gamma$  em pacientes com diabetes melito do tipo 2;

**2.2.** Avaliar as freqüências dos genótipos e alelos de polimorfismos no gene do PPAR $\gamma$ , utilizando-se metodologia de restrição enzimática dos produtos da PCR, em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em comparação com indivíduos normoglicêmicos;

**2.3.** Avaliar a influência das mutações encontradas no gene do PPAR $\gamma$  sobre as características clínicas e parâmetros bioquímicos em pacientes com diabetes melito do tipo 2 e indivíduos normoglicêmicos.

### **3. Materiais e Métodos**

---

#### **3.1. Casuística**

##### **3.1.1. Grupo de estudo:**

O grupo de estudo (GE) foi constituído de 207 indivíduos da raça branca, não aparentados, de ambos os sexos, com idade entre 30 a 75 anos, com diabetes melito do tipo 2, de acordo com os critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2001) da Sociedade Brasileira de Diabetes. Estes pacientes foram seleccionados no Ambulatório do Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Santa Casa de São Paulo.

##### **3.1.2. Grupo controle:**

O grupo controle (GC) foi constituído de 170 indivíduos da raça branca, de ambos os sexos, com idade entre 30 a 75 anos, sem histórico familiar de diabetes melito do tipo 2 em primeiro grau, e que dentro dos critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2001) da Sociedade Brasileira de Diabetes, são considerados normoglicêmicos. Estes indivíduos foram seleccionados no Serviço de Endocrinologia do Hospital Geral de São Paulo.

As características clínicas dos indivíduos envolvidos neste estudo estão resumidas na Tabela 1.

##### **3.1.3. Comissão de ética**

Todos os procedimentos clínicos e provas funcionais foram aprovados pela Comissão de Ética da Santa Casa de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e Hospital Geral de São Paulo. O consentimento para a realização dos mesmos foi obtido, por escrito, dos pacientes ou de seus representantes legais.

### **3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão**

#### **3.2.1. Inclusão**

Utilizaram-se os seguintes critérios de inclusão:

- Pacientes com diabetes melito do tipo 2;
- Homens e mulheres  $\leq 75$  anos;
- Glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL em pelo menos duas determinações;
- Glicemia 2 horas após 75 g de glicose  $> 200$  mg/dL;

#### **3.2.2. Exclusão**

Os seguintes critérios foram adotados para exclusão:

- Gravidez;
- Amamentação;
- História de abuso de álcool ou droga;
- Diagnóstico prévio de diabetes melito do tipo 1;
- Após pancreatectomia;
- Doenças clinicamente relevantes (neoplasias, neurológicas, hepáticas ou renal crônico), que pudessem dificultar a interpretação dos resultados do estudo;
- Uso de drogas hiperglicemiantes (corticóides e imunossupressores);
- Qualquer condição mental que tornasse o paciente incapaz para entender a natureza do estudo;
- Evidência de atitude não cooperativa.

Tabela 1. Características clínicas dos grupos estudados.

	<b>Grupo Controle</b> n = 170	<b>Grupo de Estudo</b> n = 207
<b>Sexo</b>		
Feminino	79 (46%)	150 (73%)
Masculino	91 (54%)	57 (27%)
<b>Idade (anos)</b>		
Média ± DP	53 ± 11	54 ± 13
Faixa	(30 – 75)	(30 – 75)
<b>Raça</b>		
Branca	100%	100%
<b>Peso (kg)</b>		
Média ± DP	74 ± 13	81 ± 18
<b>Altura (m)</b>		
Média ± DP	1,7 ± 0,09	1,6 ± 0,08
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		
Média ± DP	26 ± 3	31 ± 7
<b>ICQ</b>		
Média ± DP	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>PA (mmHg)</b>		
Média ± DP		
Sistólica	126 ± 8	140 ± 25
Diastólica	77 ± 2	88 ± 14

n = número de indivíduos; IMC = índice de massa corpórea; ICQ = índice cintura quadril; PA = pressão arterial.

### **3.3. Materiais**

#### **3.3.1. Amostras biológicas**

As amostras para as determinações bioquímicas foram obtidas após jejum de 12 h, utilizando um sistema de coleta a vácuo, em tubos sem e com anticoagulante (EDTA 1 mg/mL sangue). Os soros obtidos, após centrifugação a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos (centrífuga Fanem modelo 260R, Fanem Ind., São Paulo, Brasil), foram aliqüotados em tubos com tampa e mantidos a -20°C até sua posterior utilização. Dos tubos contendo sangue total, coletados com EDTA, uma alíquota de 1 mL foi retirada e acondicionada em tubos de Eppendorf de 1,5 mL para posterior extração do DNA das células sanguíneas, a serem utilizados nas análises moleculares.

#### **3.3.2. Reagentes**

Foram utilizados os seguintes reagentes: Tris (hidroximetil) aminometano ultrapuro, ácido bórico e EDTA da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.); xilenocianol-FF da Fluka Chemie AG (Suíça); azul de bromofenol, glicerol, cloreto de sódio, cloreto de potássio e etanol absoluto da MERCK S.A. (Ind. Química, R.J., Brasil); hidróxido de sódio e cloreto de magnésio da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.); marcador de pares de bases de DNA de 100 bp, *Taq* DNA polimerase, solução de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), Tampão da reação de amplificação 10X, brometo de etídeo, formamida, agarose ultrapura, gel de poliacrilamida GeneGel Excel a 12,5% da Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, E.U.A.); kit de purificação de produto da PCR (Qiagen Inc, E.U.A.); enzima de restrição BstU-I (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, E.U.A.), tampão de reação 10X da New England Biolabs. Os iniciadores foram sintetizados pela Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.).

#### **3.3.3. Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos: analisador automático para bioquímica ROCHE, modelo Cobas Mira Plus (Basel, Suíça); analisador automático para

hormônios ROCHE, modelo Elecsys 1010 (Basel Suíça); sistema de análise de imagem digital (Multimage Light Cabinet AlphaInnotech, San Leandro, CA, E.U.A.); centrífuga Fanem modelo 260R, Fanem Ind. (São Paulo, Brasil); fonte de eletroforese modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia); espectrofotômetro Gene Quant I (Pharmacia, Uppsala, Suécia); termociclador PTC 200 (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.); sistema para eletroforese GenePhor (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden); sistema para seqüenciamento Mega BACE 1000 (Pharmacia – Upsala, Suécia).

### **3.4. Métodos**

#### **3.4.1. Determinações metabólicas**

As determinações metabólicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de São Paulo e Hospital Geral de São Paulo.

##### **3.4.1.1. Determinação da glicemia e lipídeos séricos**

As determinações de glicose, triacilglicerol, colesterol total e colesterol da HDL foram feitas em um analisador automático ROCHE, modelo Cobas Mira Plus e todos os reagentes utilizados da Roche Diagnóstica (Basel, Suíça).

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático utilizando a hexoquinase (BONDAR & MEAD, 1974); a concentração sérica de triacilglicerol pelo método enzimático GPO/PAP (FOSSATI & PRINCIPE, 1982); as concentrações séricas de colesterol total e do colesterol da HDL pelo método enzimático-colorimétrico (FOSSATI & MEDICCI, 1987).

O colesterol da HDL foi determinado após precipitação dos quilomícrons, VLDL e LDL com a adição de ácido fosfotúngstico e íons de magnésio (BURSTEIN *et al.*, 1970). A concentração do colesterol da LDL foi obtida através da fórmula de Friedwald (FRIEDWALD *et al.*, 1972), quando o conteúdo de triacilglicerol foi menor do que 400 mg/dL. A concentração do colesterol da VLDL pela divisão da concentração sérica de triacilglicerol por cinco.

#### **3.4.1.2. Determinação da insulina sérica**

A concentração de insulina foi determinada por imunoenensaio enzimático do tipo "sanduíche", utilizando-se reagentes da Roche Diagnostics Corporation (Indianápolis, E.U.A.).

#### **3.4.1.3. Resistência à insulina e função das células $\beta$**

Para avaliar a resistência à insulina e função das células beta, utilizou-se o método HOMA (*homeostasis model assessment*), com os índices HOMA-IR para insulino resistência e HOMA- $\beta$  para a função das células beta. Os valores obtidos pelo HOMA-IR possuem correlação positiva e altamente significativa com a técnica de clampe da glicose ( $P < 0,0001$ ) (BONORA *et al.*, 2000). O índice HOMA-IR foi calculado de acordo com a fórmula:  $\text{glicose}(\text{mmol/L}) \times \text{insulina}(\mu\text{U/mL})/22.5$ . HOMA- $\beta$  foi calculado da seguinte maneira:  $20 \times \text{insulina}(\mu\text{U/mL})/\text{glicose}(\text{mmol/L}) - 3,5$  (MATTHEWS *et al.*, 1985).

#### **3.4.1.4. Determinação da porcentagem da hemoglobina glicada**

A determinação da hemoglobina glicada foi realizada por método colorimétrico quantitativo, no qual uma preparação hemolisada do sangue total é misturada com uma resina de troca iônica com baixa capacidade de ligação. A hemoglobina não glicosilada ( $\text{HbA}_0$ ) se liga à resina, deixando a glicohemoglobina ( $\text{HbA}_1$ ) no sobrenadante livre para ser removida com o auxílio do separador de resina. A porcentagem de HbA foi determinada pela medida dos valores de absorvância em 415 nm para as frações  $\text{HbA}_1$  e Hb total, calculando-se o índice das absorvâncias (R) e comparando-os ao do padrão de glicohemoglobina obtido em paralelo aos testes.

#### **3.4.1.5. Interpretação clínica dos valores de glicose e lipídeos**

Para a adequada interpretação clínica dos valores de glicose, foram utilizados os critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes (CONSENSO...2001), da Sociedade Brasileira de Diabetes. Em relação aos valores de lipídeos séricos, os critérios das III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do

Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, apresentados na Tabela 2.

#### **3.4.1.6. Índice aterogênico do plasma (AIP)**

Foi calculado o índice aterogênico do plasma (AIP), para os grupos estudados, conforme tabela 7. O referido cálculo também foi realizado para os genótipos 34C>G (Tabela 11) e 161C>T (Tabela 13). O AIP, definido como  $\log(\text{TAG}/\text{HDL-C})$ , com TAG e HDL-C em mmol/L, tem sido recentemente utilizado como um marcador aterogênico no plasma, estando aumentado em indivíduos com alto risco para doença arterial coronariana (DOBIASOVA & FROHLICH, 2001).

#### **3.4.1.7. Controle de qualidade**

A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das quantificações de lipídeos e glicose foi realizada pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico da ControlLab Ltda (Rio de Janeiro) e Roche (Basel, Suíça). Em relação às determinações de hemoglobina glicada e insulina, foram utilizados soros controle, conforme instruções do fabricante.

---

**Tabela 2. Valores de referência de CT, LDL-C, HDL-C e TAG séricos em adultos (idade  $\geq 20$  anos), de acordo com as III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias – 2001. Valor de referência da glicose, de acordo com o Consenso Brasileiro sobre Diabetes – 2001.**

	Valores (mg/dL)		
	Desejáveis	Limitrofes	Aumentados
<b>Glicose</b>	< 110	> 110 e < 126	$\geq 126$
<b>Lípides</b>			
<b>CT</b>	< 200	200-239	$\geq 240$
<b>LDL-C</b>	< 100	100-159	$\geq 160$
<b>HDL-C</b>	$\geq 40$	-	-
<b>TAG</b>	< 150	150-200	$\geq 201^*$

\* devem ser considerados em conjunto com os valores de LDL-C e HDL-C.

CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da LDL; HDL-C: colesterol da HDL; TAG: triacilglicerol

### **3.5. Métodos moleculares**

#### **3.5.1. Extração do DNA genômico.**

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total, obtidos em tubos Vacutainer® (Becton and Dickson) com EDTA (1mg/mL sangue) como anticoagulante, pelo método de precipitação salina, descrito por LAHIRI & NUNBERGER (1991), modificado em nosso laboratório (CAVALLI *et al.*, 1996; SALAZAR *et al.*, 1997). Um mililitro de sangue total foi submetido à lise celular com 1000 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 200 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0, NaCl 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA, pH 8,0), armazenando-se a -20°C.

#### **3.5.2. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico.**

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Preparou-se o gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) em suporte adaptado para a cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, E.U.A.). O gel foi imerso em tampão TBE e as amostras contendo 2 µL do DNA obtido e 5 µL do tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25%, EDTA 1 mM pH 8,0 e glicerol 50%) foram aplicadas. Utilizou-se um marcador de pares de bases de DNA de 1kb. A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 45 min, utilizando uma fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 300 ng/mL e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta em um sistema de análise de imagem digital (Multimage Light Cabinet AlphaInnotech,

San Leandro, CA, E.U.A.). Os resultados foram digitalizados e arquivados utilizando-se o *software* do mesmo sistema.

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) do DNA extraído foram realizadas em espectrofotômetro Gene Quant I (Pharmacia, Uppsala, Suécia), após diluição das amostras (1:100) em tampão TE, pH 8,0 (SAMBROOK *et al.*, 1989). Foram utilizadas somente preparações de DNA que obtiveram relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1,8.

### 3.5.3. Polimorfismo conformacional de fita simples (PCR-SSCP)

A amplificação foi realizada através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) dos 7 diferentes exons e região promotora. Os iniciadores foram elaborados para obter fragmentos de DNA com até 250 pares de base; desta forma, melhores resultados foram obtidos (maior sensibilidade) com a técnica da PCR-SSCP. Foram construídos 14 pares de iniciadores para amplificar a região dos exons, analisando-se todo o gene do PPAR $\gamma$ , de acordo com informações disponíveis no GenBank e referências bibliográficas (BARROSO *et al.*, 1999) (Tabela 3). Em relação à região promotora, foram elaborados os pares de iniciadores para amplificar seqüências da região promotora do gene PPAR $\gamma$  (FAJAS *et al.*, 1997; FAJAS *et al.*, 1998), conforme tabela 4. Para estabelecer as concentrações ideais dos reagentes e temperaturas de desnaturação e hibridação dos diferentes iniciadores e também dos números de ciclos de amplificação para as amostras, foram realizados estudos baseados nos trabalhos de THORPE *et al.* (1999) e de BARROSO *et al.* (1999). Após otimização, procedeu-se à amplificação, utilizando-se o seguinte protocolo: - exons: 39,4  $\mu$ L de água miliQ; 5,0  $\mu$ L de tampão termofílico 10X (Tris-HCl (pH 9,0) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM); 0,4  $\mu$ L solução dNTPs (10 mM); 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/L); 0,2  $\mu$ L Taq polimerase (5U/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L de DNA genômico (50 ng/ $\mu$ L) para um volume final de reação de 50  $\mu$ L; - região promotora: 41,4  $\mu$ L de água miliQ; 5,0  $\mu$ L de tampão termofílico 10X (Tris-HCl (pH 9,0) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM); 0,4  $\mu$ L solução dNTPs (10 mM); 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/L); 0,2  $\mu$ L Taq polimerase (5U/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L de DNA genômico

(50 ng/ $\mu$ L) para um volume final de reação de 50  $\mu$ L. O protocolo de amplificação foi realizado em termociclador PTC 200™ (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.) e compreendeu: - exons: 1 ciclo de incubação a 98°C por 3 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de incubação a 94°C por 1 min (desnaturação), 56 ou 61°C por 1 min (hibridação) e 72°C por 1 min (polimerização) e 1 ciclo de incubação a 72°C por 10 min (polimerização final); - região promotora: 1 ciclo de incubação a 98°C por 3 min (desnaturação inicial); 35 ciclos de incubação a 94°C por 1 min (desnaturação), 56, 60 ou 61°C por 1 min (hibridação) e 72°C por 1 min (polimerização) e 1 ciclo de incubação a 72°C por 10 min (polimerização final);

As amplificações realizadas pela técnica da PCR, foram monitoradas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o ácido nucléico) em cada conjunto de reações. Também foram repetidas 10% das reações da PCR, aleatoriamente.

#### **3.5.3.1. Avaliação eletroforética dos produtos de amplificação**

Todos os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. O gel foi preparado com agarose (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), aquecido em forno microondas durante trinta segundos para a solubilização da agarose. Após solidificação do gel, aplicou-se 9  $\mu$ L do produto da PCR diluído em 1  $\mu$ L de tampão de amostra 6 X concentrado (Azul de bromofenol a 0,25%, Xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 50%). Como referência, utilizou-se 5  $\mu$ L de marcador de DNA (100 bp, Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), que também foi diluído em tampão de amostra na proporção 1:6. A separação eletroforética foi realizada a 100 Volts durante 45 minutos. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 300 ng/mL e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta em um sistema de análise de imagem digital da AlphaInnotech (San

Leandro, CA, E.U.A.). Os resultados foram digitalizados e arquivados utilizando-se o *software* do mesmo sistema.

**Tabela 3:** Seqüência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos de DNA, amplificados pela PCR, com as respectivas temperaturas de hibridação.

EXON	INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	TAMANHO FRAGMENTO (bp)	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO (°C)
B	PPARG/BF	GTGTGAATTACAGCAAACCCCT	151	61
	PPARG/BR	CGTCCCCAATAGCCGTATCT		
1	PPARG/1AF	CCCAGATGAGATTACTTTGCCA	208	61
	PPARG/1AR	AGGAGTGGGAGTGGTCTTCC		
	PPARG/1BF	AACTTTGGGATCAGCTCCGT		
2	PPARG/1BR	AGGGTACTGAGAGATGAGGTCC	192	61
	PPARG/2AF	TACTATGGTGGCTTGCCCTG		
	PPARG/2AR	GACACGACATTCAATTGCCA		
3	PPARG/2BF	AGAGCCTTCCAACCTCCCTCA	231	56
	PPARG/2BR	GGTCTGGGTGACAGAGCAAG		
	PPARG/3F	GTTGCTGCTTCCATGTGTCA		
4	PPARG/3R	GGCAATGGCTTTAGTGTCCA	276	61
	PPARG/4AF	CTACTGTGTGGGAACGAGGG		
	PPARG/4AR	TCAGCGGGAAGGACTTTATG		
5	PPARG/4BF	GCCCTGGCAAACATTTGTA	153	61
	PPARG/4BR	AAACCCAAAACAACCTCCCG		
	PPARG/5AF	AACCTGGGATGGCATTCACT		
6	PPARG/5AR	GTGATCTCCTGCACAGCCTC	225	61
	PPARG/5BF	CCCTGTTTTATTTGCAGCCA		
	PPARG/5BR	GGAGGCCAGCATTGTGTA		
7	PPARG/5CF	TATGCCAAAAGCATTCTGG	183	61
	PPARG/5CR	AGGCTTTCGCAGGCTCTTTA		
	PPARG/5DF	CAAGGCTTCATGACAAGGGA		
8	PPARG/5DR	CAAAATTCTTTTGCCACCC	222	61
	PPARG/6AF	TTTACTGAACCCCTGTTG		
	PPARG/6AR	CCGTCTTCTTGATCACCTGC		
9	PPARG/6BF	ACGGAACACGTGCAGCTACT	154	61
	PPARG/6BR	CCCTCAGAATAGTGCAACTGGA		

F = Forward; R = Reverse

Fonte: BARROSO *et al.* (1999).

**Tabela 4:** Seqüência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos de DNA, amplificados pela PCR, com as respectivas temperaturas de hibridação (região promotora).

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	TAMANHO FRAGMENTO (bp)	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO (°C)
G2/PRF	CCAAAGCAGTGAACATTATGAC	245	56
G2/PRR	GGAATAGGGGTTTGCTGTAATT		
G3/PRAF	TTGCCTTGCCTAAGTGGTGT	231	60
G3/PRAR	ATGAAGCCCCTTCCATCTT		
G3/PRBF	TCAGGGAAAGCAAACATTCA	205	61
G3/PRBR	CGTTTGACAAAATGGCCTTG		

F = *Forward*; R = *Reverse*

### 3.5.3.2. Triagem de mutações por PCR-SSCP

A triagem de alterações moleculares, no gene do PPAR $\gamma$ , foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Previamente à eletroforese, os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2% conforme item 3.5.3.1. A seguir, 1,0  $\mu$ L do produto da PCR foi desnaturado em 24  $\mu$ L de uma solução contendo formamida 95%, NaOH 10mM, Xilenocianol 0,25% e Azul de Bromofenol 0,25% a uma temperatura de 95°C por 8 minutos, sendo imerso imediatamente em banho de gelo. Os produtos desnaturados foram submetidos à separação eletroforética, 600V – 25mA – 15W, durante 1 hora e 30 minutos, às temperaturas de 5 e 15°C, respectivamente, para cada fragmento, utilizando-se o sistema GenePhor™ com GeneGel Excel 12.5/24 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) que inclui os tampões de eletroforese e os géis de poliacrilamida a 12,5%. As condições de realização de SSCP foram baseadas no trabalho de SALAZAR *et al.* (2002), cuja metodologia tem sensibilidade próxima a 97% na detecção de mutações.

### 3.5.3.3. Coloração dos géis de poliacrilamida

Após a separação eletroforética, os géis foram corados manualmente, utilizando-se de kit (DNA Silver Staining Kit - Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). O processo de coloração consistiu de solução de fixação do DNA contendo ácido benzeno sulfônico 3% e 24% de etanol, durante 30 minutos sob agitação, seguida de impregnação com solução de prata a 1% e ácido benzeno sulfônico a 0,35% durante 30 minutos sob agitação. Os fragmentos de DNA, após lavagem do gel com água destilada para retirar o excesso de prata, foram revelados com formaldeído 37%, tiosulfato de sódio 2% em solução de carbonato de sódio 5x concentrado, durante 6 minutos sob agitação. Os fragmentos corados de marrom escuro puderam ser visualizados, caracterizando os perfis eletroforéticos para a identificação do SSCP.

Os géis foram preservados, sob agitação constante durante 30 minutos, em solução de interrupção e preservação, contendo ácido acético 5%, acetato de sódio 25% e glicerol 50%. Após estes procedimentos, os géis foram colocados entre folhas de papel celofane e deixado secar a temperatura ambiente por 48 horas para preservação.

#### **3.5.3.4. Controle para PCR-SSCP**

O controle normal (CN), previamente seqüenciado – sistema Mega BACE 1000, foi aplicado simultaneamente com as amostras em estudo, para cada fragmento.

#### **3.5.4. Purificação dos produtos da PCR (QIAquick PCR Purification Kit - Qiagen®)**

A qualidade do produto da PCR é um dos fatores mais críticos no seqüenciamento semi-automático, sendo importante estar livre de contaminantes. Os produtos da PCR para seqüenciamento foram purificados, utilizando-se kit para purificação da PCR - QIAGEN™. O processo de purificação consistiu da adição de 250 µL de tampão PB a 45 µL de produto da PCR, com posterior homogeneização por inversão. Após, aplicou-se a mistura no centro da coluna de purificação e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 1 minuto. O produto da centrifugação foi descartado, aplicando-se na coluna 750 µL de tampão PE e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 1 minuto. Descartou-se o produto de centrifugação, submetendo-se a coluna à nova centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto (retirar o etanol residual). Colocou-se a coluna de purificação em um tubo estéril de 1,5 mL, aplicando-se 25 µL do tampão EB, no centro da coluna e centrifugando-se a 13.000 rpm durante 1 minuto.

#### **3.5.5. Seqüenciamento do DNA purificado**

Os fragmentos relativos aos exons que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética, sugerindo mutação, depois de purificados foram submetidos ao seqüenciamento, utilizando-se o sistema Mega BACE 1000 (Pharmacia – Upsala, Suécia). Foram fornecidos 10 µL de produto da PCR a 20 ng/µL e seqüenciadas as fitas *sense* e *antisense*. A reação de seqüenciamento foi realizada no Instituto de Biologia da

Universidade de São Paulo, conforme o seguinte procedimento: foi utilizado aproximadamente 70 ng de produto da PCR num volume de reação de 20  $\mu$ L, adicionando-se 5 pmoles do iniciador (1  $\mu$ L de solução 5  $\mu$ M) aplicando-se o seguinte protocolo: 8,0  $\mu$ L de DYEnamic ET Terminator Reagent Premix; 1,0  $\mu$ L do iniciador (5  $\mu$ M); 3,5  $\mu$ L de produto da PCR (20 ng/ $\mu$ L) e 7,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O miliQ. Para a ciclagem foi utilizado o termociclador PTC 200™ (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.) com o seguinte protocolo: 30 ciclos de incubação a 95°C por 20 s, 50°C por 30 s e 60°C por 2 min.

A purificação pós-reação foi realizada por precipitação com acetato de amônia 7,5M, etanol absoluto e centrifugação, após a secagem. O *pellet* foi ressuscitado em Loading Solution e aplicado no seqüenciador. As amostras foram injetadas no seqüenciador a 3KV (kilovolts) durante 150 segundos e a corrida eletroforética foi realizada a 9 kv por 120 minutos. Para a análise das seqüências foi utilizado o programa BioEdit, versão 5.0.9 e o programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

### **3.5.6. Amplificação da região polimórfica 34C>G do gene do PPAR $\gamma$ 2 pela técnica da PCR.**

Através da reação em cadeia pela polimerase, foi amplificada a região polimórfica do gene do receptor PPAR $\gamma$ 2: 34C>G situada no exon B (Figura 3). Os iniciadores utilizados na amplificação deste sítio polimórfico foram baseados em informações disponíveis no GenBank e estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Seqüência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos de DNA, amplificados pela PCR, com as respectivas temperaturas de hibridação para o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2.

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	TAMANHO FRAGMENTO (bp)	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO (°C)
PPAR34F	CCAATTCAAGCCCAGTCCTTTC	244	62,5
PPAR34R	CAGTGAAGGAATCGCTTTCCG		

F = *Forward*; R = *Reverse*

### **3.5.6.1. Condições de amplificação da região polimórfica 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2.**

A amplificação da região polimórfica 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 foi realizada utilizando o seguinte protocolo: 41,4  $\mu$ L de água miliQ; 5,0  $\mu$ L de tampão termofílico 10X (Tris-HCl (pH 9,0) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM); 0,4  $\mu$ L solução dNTPs (10 mM); 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/L); 0,2  $\mu$ L Taq polimerase (5U/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L de DNA genômico (50 ng/ $\mu$ L) para um volume final de reação de 50  $\mu$ L. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclador PTC 200™ (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.) programado da seguinte forma: 1 ciclo de incubação a 98°C por 3 min (desnaturação inicial); 30 ciclos de incubação à 94°C por 45 s (desnaturação), 62,5°C por 90 s (hibridação) e 72°C por 90 s (polimerização) e 1 ciclo de incubação à 72°C por 10 min (polimerização final);

### **3.5.6.2. Avaliação dos produtos de amplificação.**

Conforme descrito no item 3.5.3.1

### **3.5.6.3. Restrição enzimática dos produtos da PCR**

Os produtos da PCR do exon B, onde está localizado o polimorfismo 34C>G, foram digeridos com a enzima de restrição BstU-I (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, E.U.A.), na concentração final de 1,0 U, em tubos de 0,5 mL, contendo 8,5  $\mu$ L do produto da PCR, 1  $\mu$ L do tampão de reação 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM e DTT 1 mM pH 7,99), em um volume final de 10  $\mu$ L. Após incubou-se em banho de água a 60°C por 2 horas.

### **3.5.6.4. Análise dos fragmentos de restrição**

Os produtos da digestão enzimática da região polimórfica do Exon B (34C>G), do gene PPAR $\gamma$ 2, foram identificados em gel de poliacrilamida 8% e corado com prata. Após a corrida eletroforética observou-se a presença de três fragmentos de diferentes tamanhos. Os indivíduos que apresentaram um fragmento de 244 bp foram

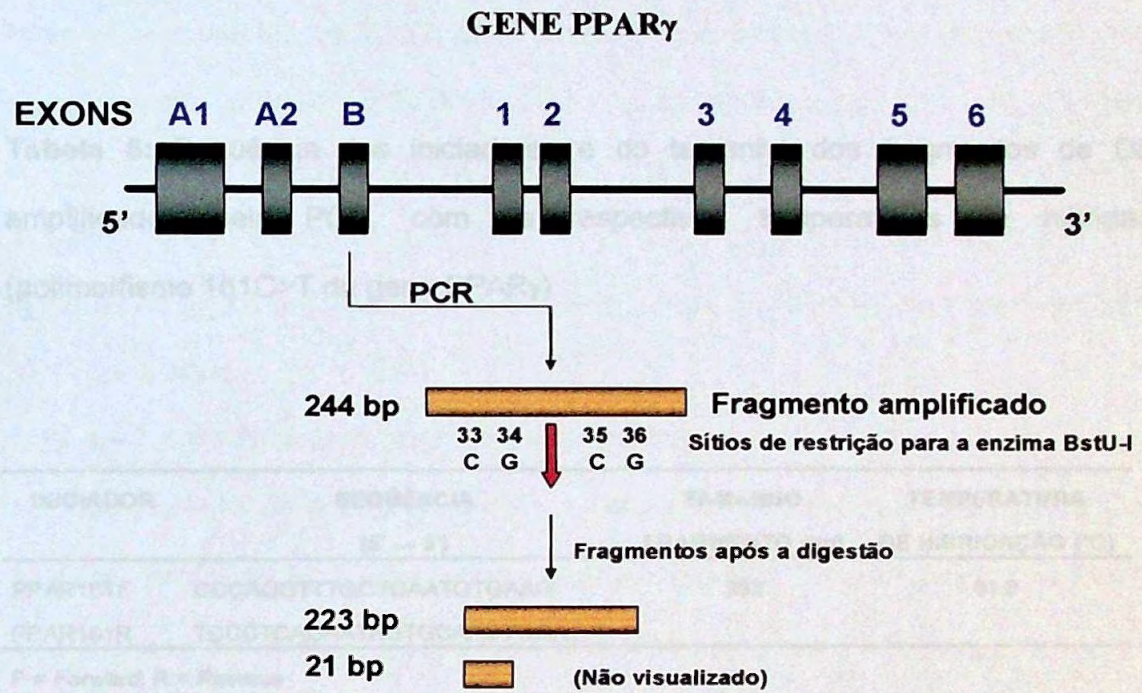
caracterizados como homozigotos com o genótipo Pro/Pro, que indica ausência de sítios de restrição para a enzima BstU-I. Os indivíduos que apresentaram dois fragmentos de 223 e 21 bp (não visualizado), foram identificados como homozigotos com o genótipo Ala/Ala, que indica a presença de sítio de restrição. Os indivíduos heterozigotos classificados com o genótipo Pro/Ala apresentaram três fragmentos: 244, 223 e 21 bp (não visualizado) (Figura 5).

### **3.5.7. Amplificação da região polimórfica 161C>T do gene PPAR $\gamma$ pela PCR.**

Através da reação em cadeia pela polimerase foi amplificada a região polimórfica do gene do receptor PPAR $\gamma$ : 161C>T situada no exon 6. Os iniciadores utilizados na amplificação deste sítio polimórfico estão apresentados na Tabela 6.

#### **3.5.7.1. Condições de amplificação da região polimórfica 161C>T do gene PPAR $\gamma$ .**

A amplificação da região polimórfica 161C>T do gene PPAR $\gamma$  foi realizada utilizando o seguinte protocolo: 41,4  $\mu$ L de água miliQ; 5,0  $\mu$ L de tampão termofílico 10X (Tris-HCl (pH 9,0) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 500mM); 0,4  $\mu$ L solução dNTPs (10 mM); 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (10 pmol/L); 0,2  $\mu$ L Taq polimerase (5U/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L de DNA genômico (50 ng/ $\mu$ L) para um volume final de reação de 50  $\mu$ L. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclador PTC 200™ (MJ Research, Watertown, MA, E.U.A.) programado da seguinte forma: 1 ciclo de incubação a 98°C por 3 min (desnaturação inicial); 30 ciclos de incubação à 94°C por 45 s (desnaturação), 61,8°C por 90 s (hibridação) e 72°C por 90 s (polimerização) e 1 ciclo de incubação à 72°C por 10 min (polimerização final);



**Figura 5: Representação esquemática da análise do polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2.**

**Tabela 6:** Seqüência dos iniciadores e do tamanho dos fragmentos de DNA, amplificados pela PCR, com as respectivas temperaturas de hibridação (polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ ).

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	TAMANHO FRAGMENTO (bp)	TEMPERATURA DE HIBRIDAÇÃO (°C)
PPAR161F	CCCAGGTTTGCTGAATGTGAAG	303	61,8
PPAR161R	TCCCTCAGAATAGTGCAACTGGA		

F = *Forward*, R = *Reverse*

### **3.5.7.2. Avaliação dos produtos de amplificação.**

Conforme descrito no item 3.5.3.1

### **3.5.7.3. Restrição enzimática dos produtos da PCR**

Os produtos da PCR do exon 6 (303 bp), onde está localizado o polimorfismo 161C>T, foram digeridos com a enzima de restrição *Nla* III (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, E.U.A.), na concentração final de 1,0 U, em tubos de 0,5 mL, contendo 7,0 µL do produto da PCR, 1,8 µL de água mili Q, 1,0 µL do tampão de reação 10X (Tris-acetato 20 mM , Acetato de magnésio 10 mM, acetato de potássio 50 mM e DTT 1 mM pH 7,9 à 25°C), 0,1 µL BSA (10mg/mL) e 0,1 µL Enzima *Nla* III em um volume final de 10 µL. Após incubou-se em banho de água a 37°C por 1 hora.

### **3.5.7.4. Análise dos fragmentos de restrição**

Os produtos da digestão enzimática da região polimórfica do Exon 6 (161C>T), do gene PPAR $\gamma$ , foram identificados em gel de agarose 2% após terem sido corados com brometo de etídeo. Após a corrida eletroforética observou-se a presença dos seguintes fragmentos: 104 e 199 bp para os indivíduos caracterizados como homozigotos (genótipo CC); 41 (fragmento não visualizado no gel), 104, 158 e 199 bp para os indivíduos caracterizados como heterozigotos (genótipo CT); 41 (fragmento não visualizado no gel), 104 e 158 bp para os indivíduos caracterizados como homozigotos (genótipo TT) (Figura 6). Os fragmentos 104 e 199 bp indicam a presença do sítio constitutivo e os fragmentos 41 e 158 bp a presença do sítio de restrição (transição de C  $\rightarrow$  T - códon 161).

### **3.5.7.5. Controle de qualidade das análises de restrição enzimática**

As restrições enzimáticas foram controladas utilizando-se um controle positivo, previamente seqüenciado, que consistiu da análise de uma amostra de genótipo homozigoto para a presença do sítio de restrição em estudo. Com isso, evitam-se

interpretações erradas dos genótipos por digestão parcial dos produtos da PCR com a enzima de restrição. Outra forma de controlar a qualidade da identificação dos genótipos foi a interpretação de genótipos conhecidos por dois analistas separadamente.

### **3.5.8. Distribuição de genótipos e frequência relativa de haplótipos para a associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$ .**

Para o cálculo da frequência de haplótipos e desequilíbrio de ligação foi utilizado o programa para a análise de dados em genética populacional Arlequin©, versão 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

A análise do efeito da associação entre os respectivos polimorfismos sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos foram determinados para todos os genótipos, exceto para o duplo heterozigoto Pro/Ala-CT, que possui um conjunto desconhecido de quatro possíveis haplótipos: Pro-C, Pro-T, Ala-C e Ala-T.

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se do programa SigmaStat para Windows, versão 2.03 (SPSS, Inc., Evanston, IL) e GraphPad Prism, versão 1.03 (Sigma, CA, EUA). Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas, a análise foi feita por observação dos valores mínimos e máximos, cálculo de médias e desvios padrões. A análise das distribuições de todas as variáveis quantitativas foram feitas com o teste de Kolmogorov-Smirnov e os valores que apresentaram distribuição anormal foram submetidos à transformação logarítmica para posterior análises por testes paramétricos. Para as variáveis classificatórias calcularam-se frequências absolutas e relativas. Foi realizada a análise por regressão linear múltipla para investigar a interação dos polimorfismos com idade, sexo, IMC e ICQ. Razão de chances (RC) e

intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados e a existência de interações foi avaliada.

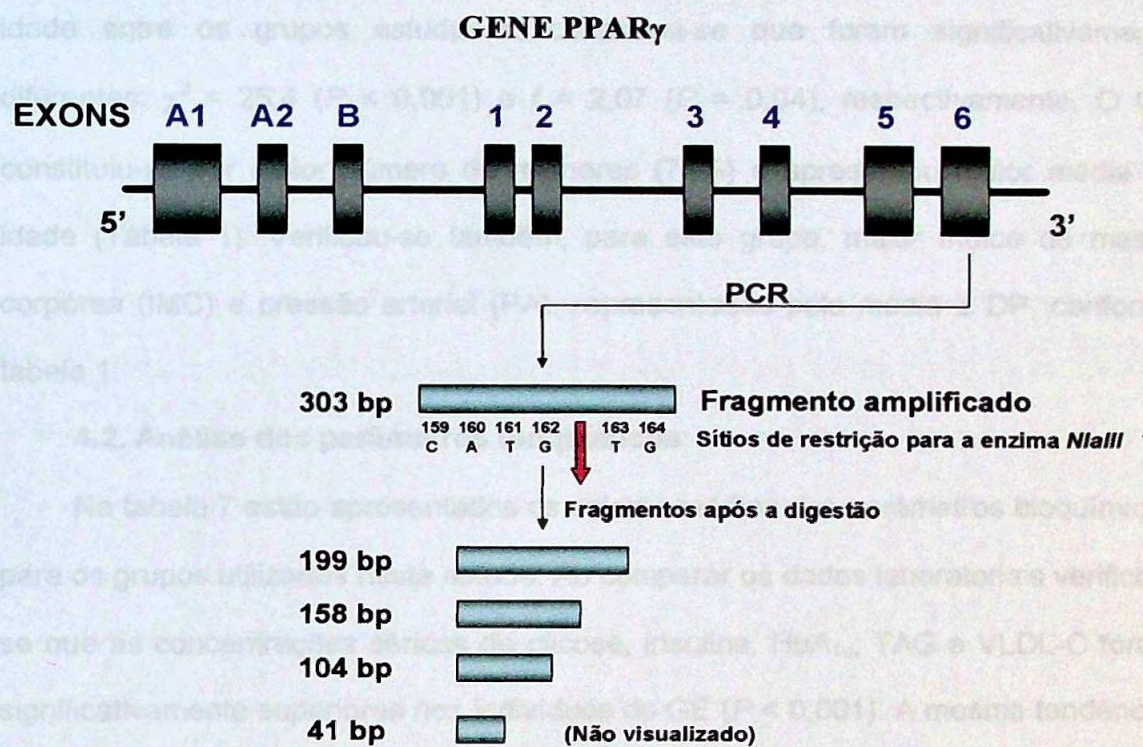
A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada utilizando-se teste *t* de *Student* e análise de variância (ANOVA). A comparação entre proporções foi avaliada pelo teste de  $\chi^2$ . O nível de significância considerado para os testes foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

---

## 4. Resultados

## 4.1. Análise dos parâmetros clínicos

Nos parâmetros clínicos, ao comparar a distribuição por sexo e a relação de idade entre os grupos achamos diferenças que são estatisticamente significativas para o GE em relação ao GC (Tabela 7). Os indivíduos do GE apresentaram níveis significativamente superiores de colesterol total (P = 0,001), HDL-C (P = 0,001), TAG (P = 0,001) e VLDL-C (P = 0,001) quando comparados ao GC. Já os indivíduos do GE apresentaram níveis significativamente inferiores de LDL-C (P = 0,001) quando comparados ao GC.



**Figura 6: Representação esquemática da análise do polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ .**

Para avaliar a função das células beta e resistência à insulina, utilizou-se o teste de tolerância à glicose e HOMA- $\beta$  para a função das células beta. Observando-se a tabela 7, em relação ao GE, o índice HOMA- $\beta$  foi significativamente superior (P < 0,001) e o índice HOMA- $\beta$  significativamente inferior (P < 0,001) nos indivíduos do GE quando comparados ao GC.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Análise dos parâmetros clínicos

Nos parâmetros clínicos, ao comparar a distribuição por sexo e a média de idade entre os grupos estudados, constatou-se que foram significativamente diferentes:  $\chi^2 = 25,4$  ( $P < 0,001$ ) e  $t = 2,07$  ( $P = 0,04$ ), respectivamente. O GE constituiu-se por maior número de mulheres (73%) e apresentou maior média de idade (Tabela 1). Verificou-se também, para este grupo, maior índice de massa corpórea (IMC) e pressão arterial (PA), representados pela média  $\pm$  DP, conforme tabela 1.

### 4.2. Análise dos parâmetros bioquímicos

Na tabela 7 estão apresentados os valores médios dos parâmetros bioquímicos para os grupos utilizados neste estudo. Ao comparar os dados laboratoriais verificou-se que as concentrações séricas de glicose, insulina, HbA<sub>1c</sub>, TAG e VLDL-C foram significativamente superiores nos indivíduos do GE ( $P < 0,001$ ). A mesma tendência, porém não significativa, foi observada para o CT ( $P = 0,494$ ) e LDL-C ( $P = 0,702$ ). Em relação à concentração de HDL-C, foi significativamente inferior para o GE ( $P < 0,001$ ).

Para avaliar a função das células beta e resistência à insulina, utilizou-se o método HOMA (*homeostasis model assessment*), com os índices HOMA-IR para resistência à insulina e HOMA- $\beta$  para a função das células beta. Observando-se a tabela 7, em relação ao GE, o índice HOMA-IR foi significativamente superior ( $P < 0,001$ ) e o índice HOMA- $\beta$  significativamente inferior ( $P < 0,001$ ) nos indivíduos do GE quando comparados ao GC.

No cálculo do índice aterogênico do plasma (AIP), conforme tabela 7, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ) para os grupos estudados.

#### **4.3. Análise da extração de DNA genômico**

Foram realizadas extrações de DNA genômico de amostras de sangue total de 207 pacientes e 170 indivíduos com glicemia de jejum normal (grupo controle). O material genético extraído de todos os pacientes e controles foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose e corado com brometo de etídeo para avaliação da integridade. Também foi realizada a análise por espectrofotometria em luz UV para quantificação e avaliação da pureza. Todas as amostras se mostraram apropriadas para amplificação pela PCR. A figura 7 representa alguns exemplos de DNA genômico, obtidos após extração, em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

#### **4.4 Análise da amplificação pela PCR**

Após obtenção do DNA genômico, o mesmo foi submetido à amplificação pela PCR, utilizando-se dos pares de iniciadores construídos especificamente para cada região estudada. A figura 8 representa os produtos de amplificação obtidos pela utilização destes iniciadores.

#### **4.5. Análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)**

Os produtos de amplificação, obtidos pela utilização de cada par de iniciadores, foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida para avaliação da migração (SSCP). As figuras 9 a 14 representam alguns exemplos dos perfis obtidos, pelos produtos de amplificação, de cada região analisada. Os resultados obtidos pela técnica da PCR-SSCP, apresentados nas figuras 9 a 14 e com alteração de mobilidade eletroforética, estão resumidos na Tabela 8.

**Tabela 7. Parâmetros bioquímicos (Média ± DP) dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).**

Parâmetros	GE <sup>a</sup> (207)	GC <sup>a</sup> (170)	P <sup>b</sup>
Glicemia jejum (mg/dL)	146 ± 56,0	92 ± 11	< 0,001
Insulinemia jejum (μU/mL)	13,0 ± 9,8	7,7 ± 3,2	< 0,001
HbA1c (%)	7,5 ± 1,8	5,0 ± 0,6	< 0,001
HOMA-IR	4,8 ± 4,7	1,7 ± 0,8	< 0,001
HOMA-β (%)	86,4 ± 118,3	114,7 ± 75,9	< 0,001
AIP	0,22 ± 0,25	0,06 ± 0,26	< 0,001
TAG (mg/dL)	179,2 ± 88,1	133,5 ± 62,3	< 0,001
CT (mg/dL)	217,6 ± 57,7	208,7 ± 31,1	0,494
HDL-C (mg/dL)	42,9 ± 11,7	46,8 ± 11,7	< 0,001
LDL-C (mg/dL)	132,6 ± 46,8	124,8 ± 31,2	0,702
VLDL-C (mg/dL)	34,1 ± 17,1	25,6 ± 8,5	< 0,001

<sup>a</sup> Valores representados pela média ± desvio padrão. Número de indivíduos em parênteses.

<sup>b</sup> P, valores do teste t

GE: Grupo de estudo; GC: Grupo controle.

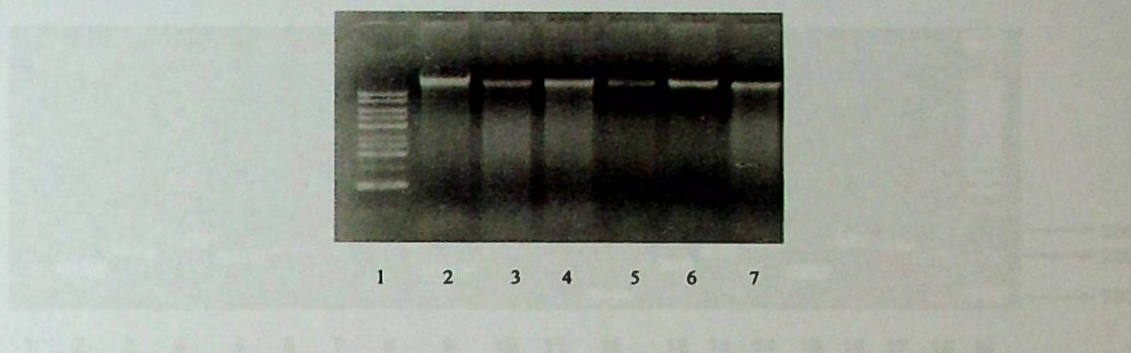
HbA1c: Hemoglobina glicada.

HOMA: *Homeostasis model assessment*.

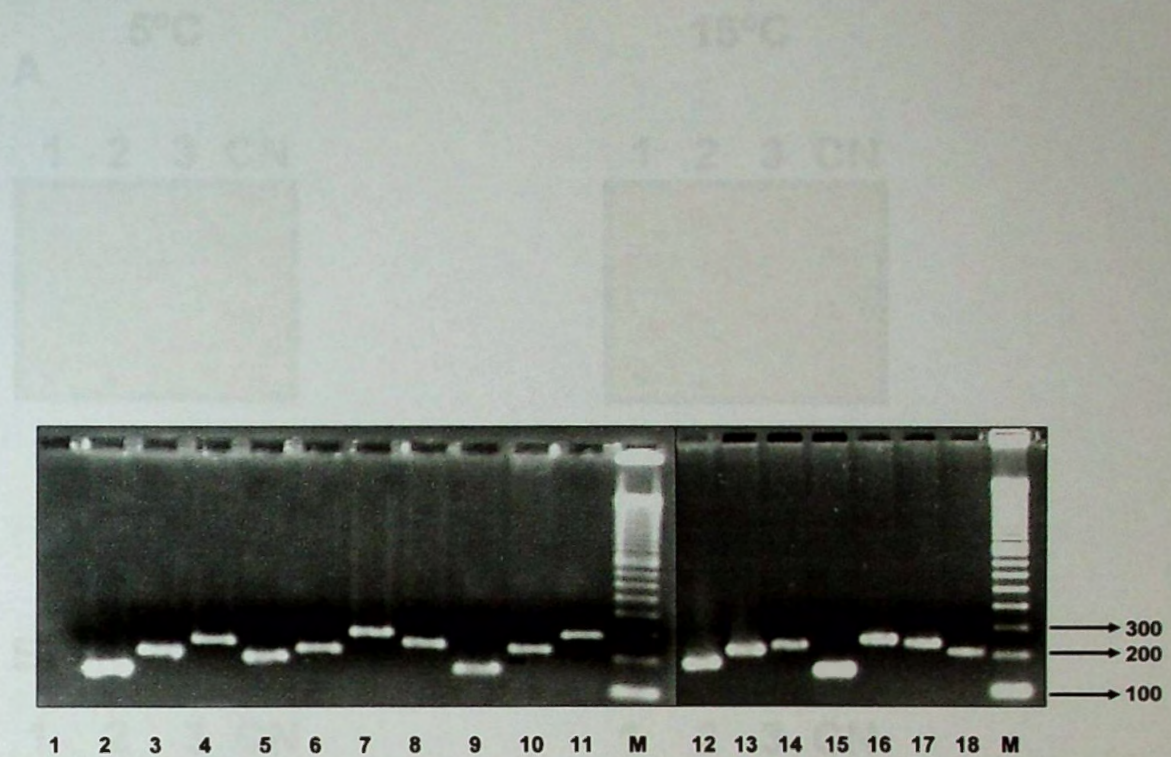
AIP: Índice aterogênico do plasma.

TAG: triacilglicerol; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL;

VLDL-C: colesterol da VLDL.



**Figura 7: Fotografia do gel de eletroforese em agarose, corado com brometo de etídeo, do DNA genômico. Na posição 1 está o marcador de peso molecular de 1 kb. Nas demais, as amostras de DNA.**



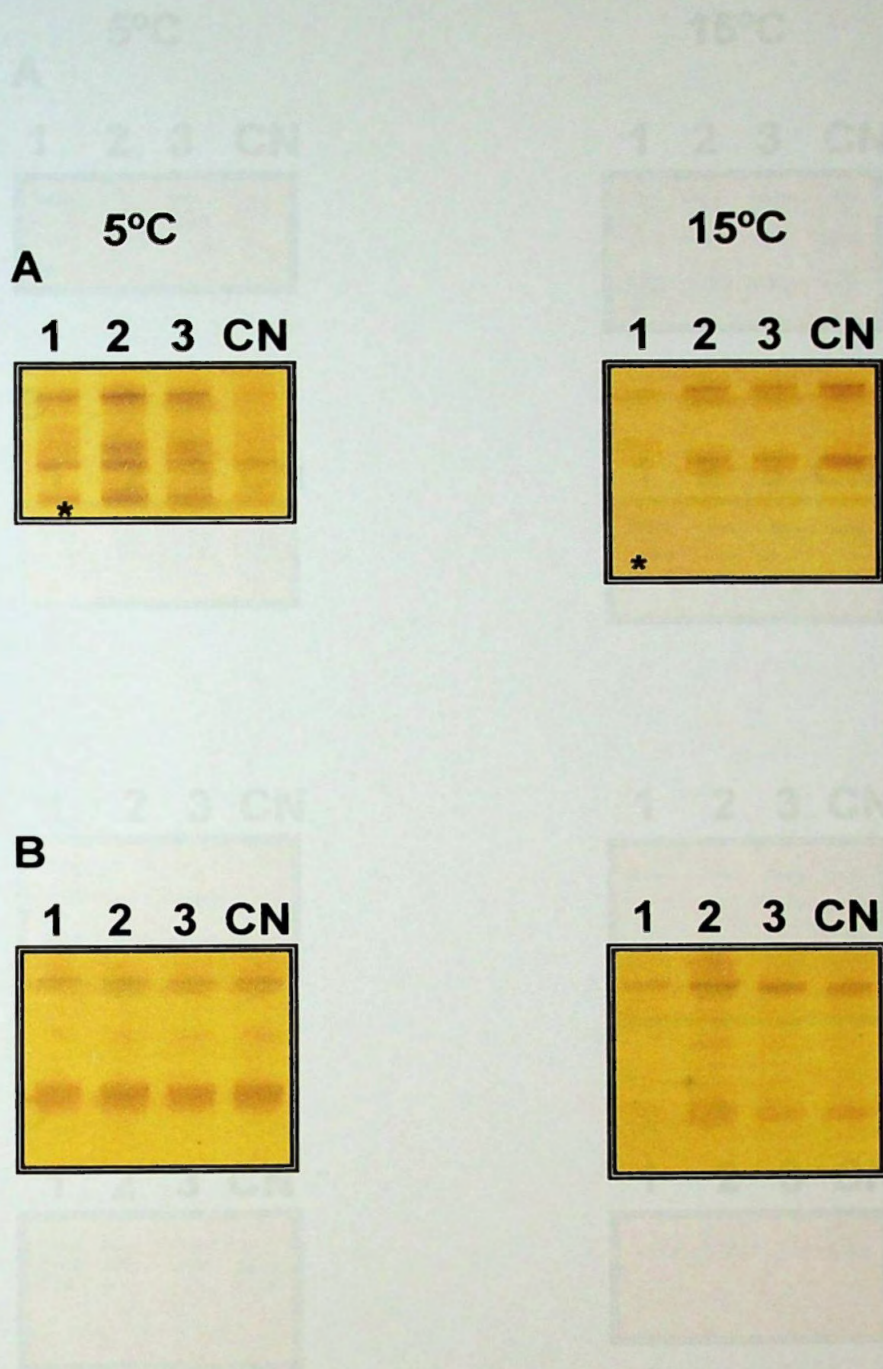
**Figura 8: Fotografia do gel de agarose demonstrando produtos de amplificação obtidos pela utilização dos 14 pares de iniciadores para o gene PPAR $\gamma$  e 3 pares para a região promotora. Branco (coluna 1); Exon B (coluna 2); Exon 1 (colunas 3 e 4); Exon 2 (colunas 5 e 6); Exon 3 (coluna 7); Exon 4 (colunas 8 e 9); Exon 5 (colunas 10, 11, 12 e 13); Exon 6 (colunas 14 e 15); Região promotora (colunas 16, 17 e 18). Marcador de pares de bases de DNA de 100 bp (coluna M).**

Figura 9: Perfil de SSCP dos produtos de amplificação do exon B (Palmeira A) e exon 1 (Palmeira B e C) do gene PPAR $\gamma$  em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com prata, em duas temperaturas (5 e 15°C). C<sup>+</sup> indica amostra com perfil de SSCP alterado. CN = controle normal.



Figura 9: Perfis de SSCP dos produtos de amplificação do exon B (Painel A) e exon 1 (Painéis B e C) do gene PPAR $\gamma$  em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com prata, em duas temperaturas (5 e 15°C). (\*) indicam amostras com perfil de SSCP alterado. CN = controle normal.





**Figura 11: Perfis de SSCP dos produtos de amplificação do exon 4 (Painéis A e B) do gene PPAR $\gamma$  em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com prata, em duas temperaturas (5 e 15°C). (\*) indicam amostras com perfil de SSCP alterado. CN = controle normal.**

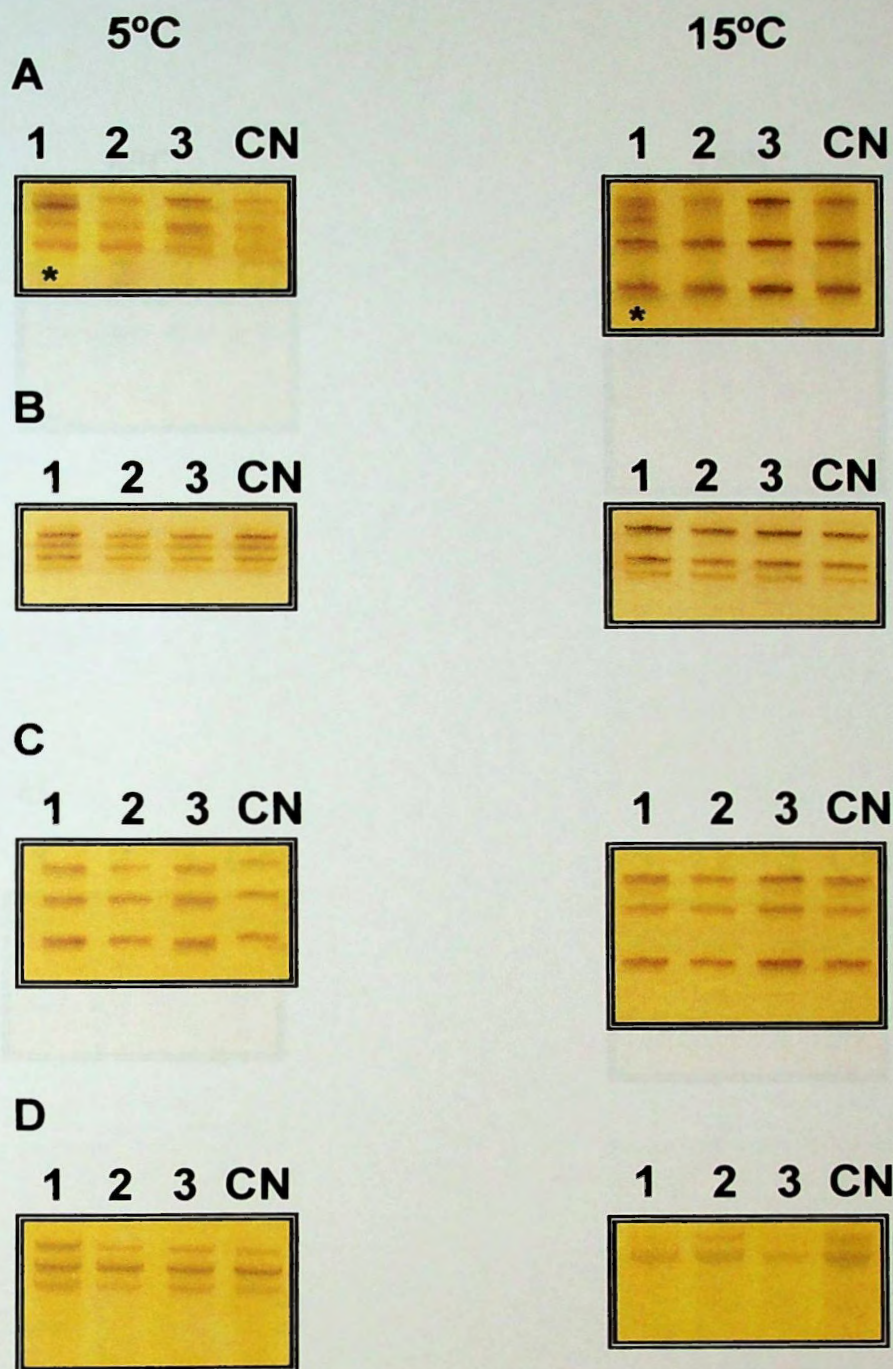
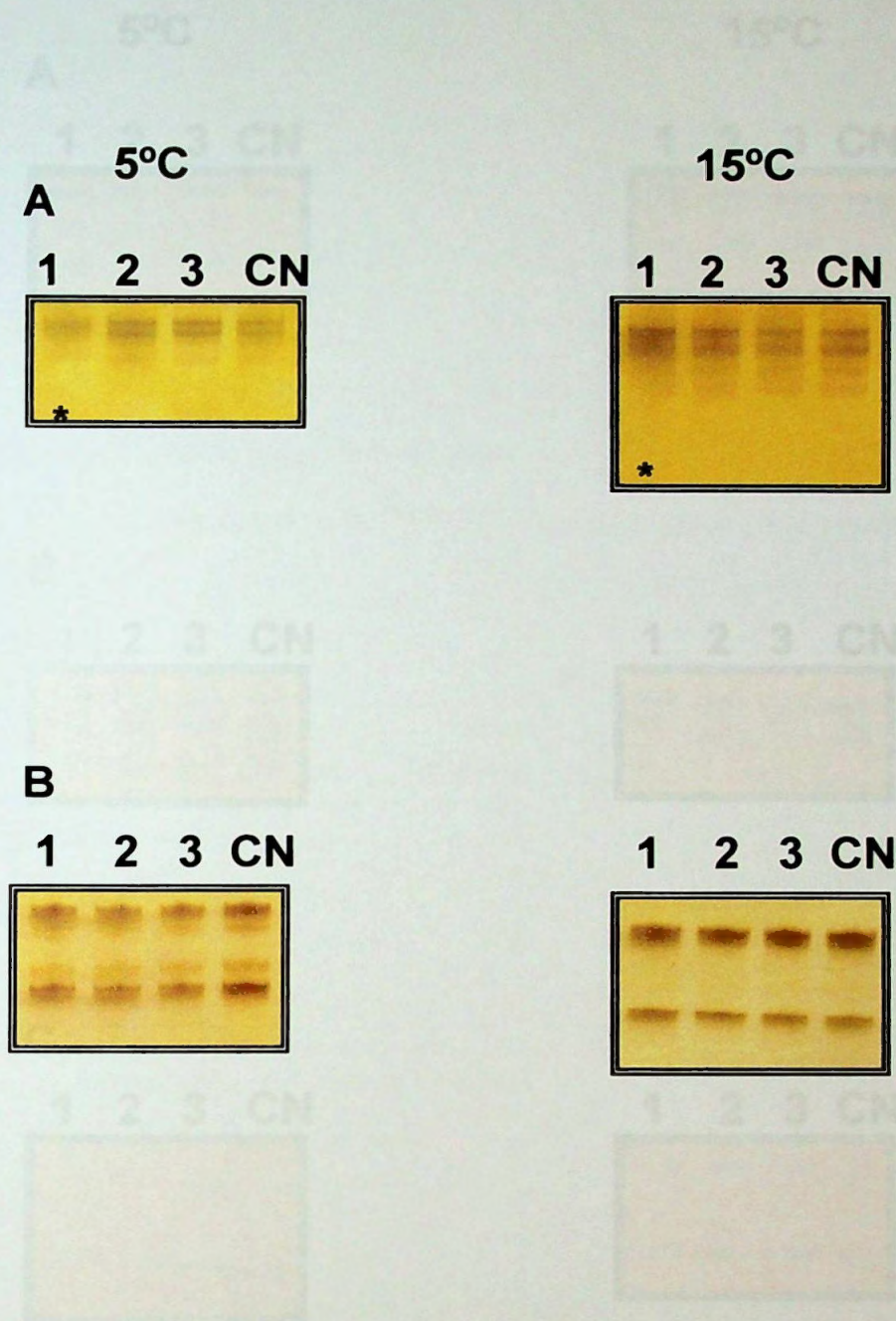


Figura 12: Perfis de SSCP dos produtos de amplificação do exon 5 (Painéis A, B, C e D) do gene  $PPAR\gamma$  em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com prata, em duas temperaturas (5 e 15°C). (\*) indicam amostras com perfil de SSCP alterado. CN = controle normal.



**Figura 13: Perfis de SSCP dos produtos de amplificação do exon 6 (Painéis A e B) do gene PPAR $\gamma$  em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com prata, em duas temperaturas (5 e 15°C). (\*) indicam amostras com perfil de SSCP alterado. CN = controle normal.**



**Tabela 8: Mobilidade eletroforética alterada, encontradas no presente estudo, por exon, pela técnica da PCR-SSCP, para o grupo de estudo.**

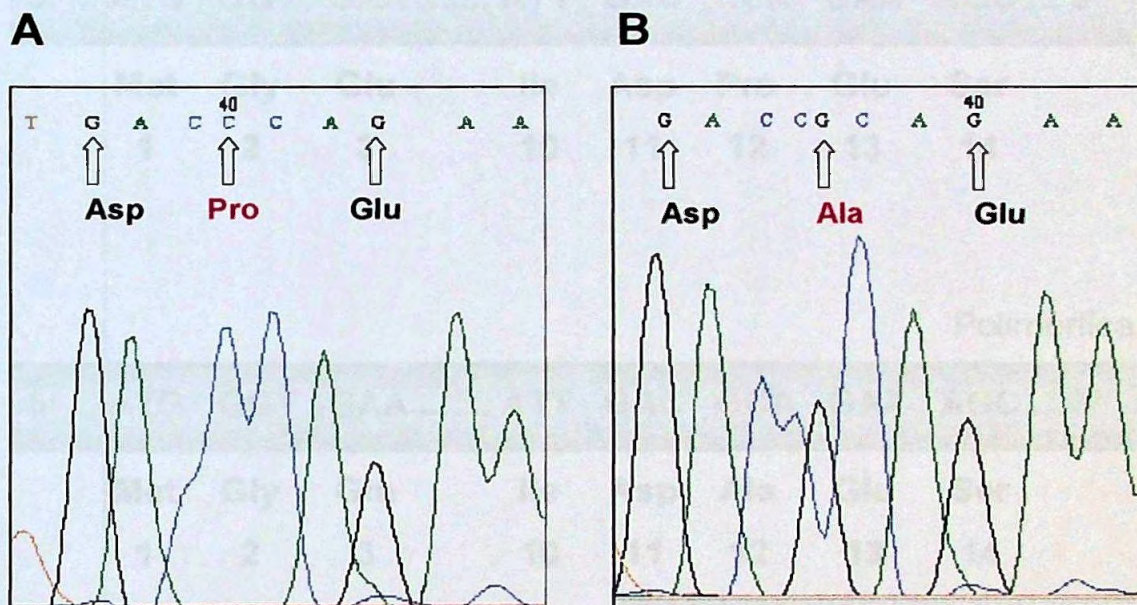
Posição	Exon	Tamanho fragmento (bp)	Temperatura de eletroforese	
			5°C	15°C
34C>G	B	151	+	+
90C>A	1	208	+	+
159C>T	1	254	+	+
IVS3+21A>T	3	276	+	+
NC	4	243	+	+
NC	5	225	+	+
161C>T	6	236	+	+

NC: não confirmado no seqüenciamento.

+: mobilidade eletroforética detectada.

#### **4.6. Ciclo-seqüenciamento do DNA genômico**

Os fragmentos relativos aos exons que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética, no estudo de rastreamento pela técnica da PCR-SSCP, foram seqüenciados em ambas as direções (5' → 3' e 3' → 5'), por iniciadores que flanquearam estes fragmentos. Os resultados obtidos por ciclo-seqüenciamento do DNA genômico, para o gene PPAR $\gamma$ , encontram-se nas figuras 15, 17, 19, 21 e 23 e resumidos na tabela 9.



**Figura 15: Eletroferograma representativo da análise de seqüência do Exon B – PPAR $\gamma$ .** A. Seqüência normal. B. Observa-se a substituição de C para G, em heterozigose, na região codificadora (exon).

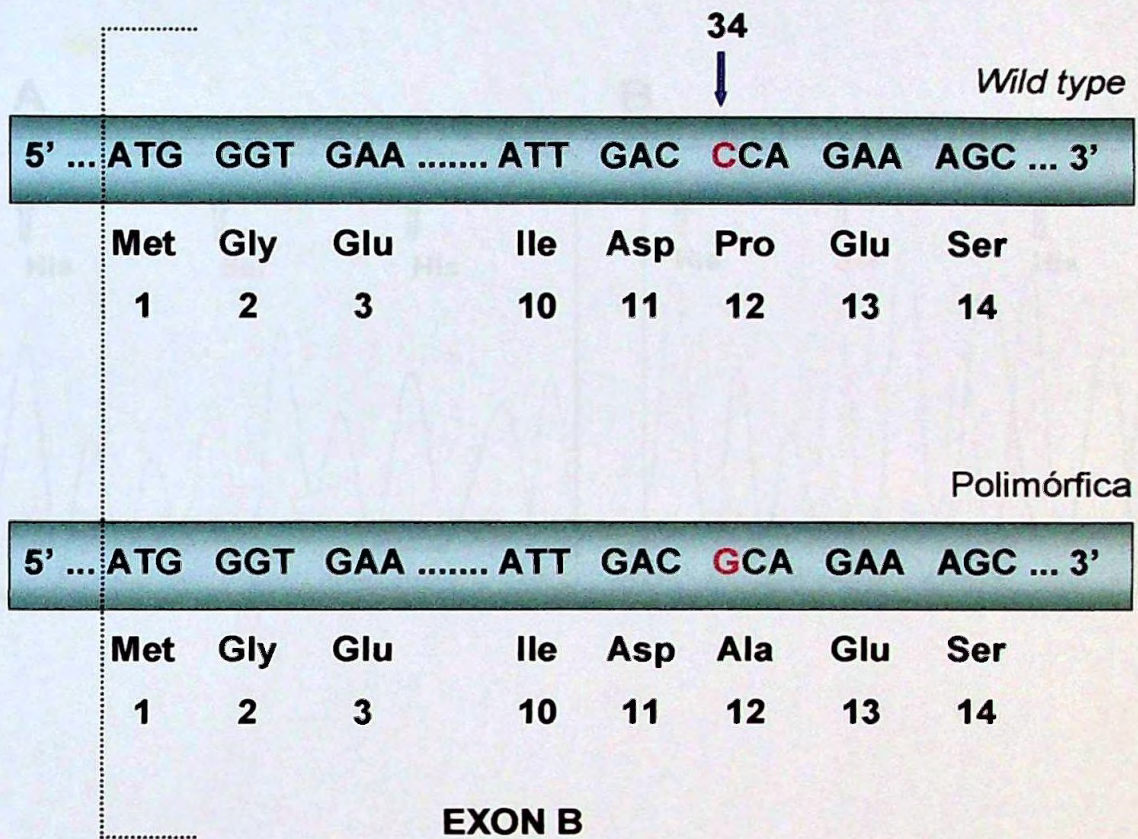
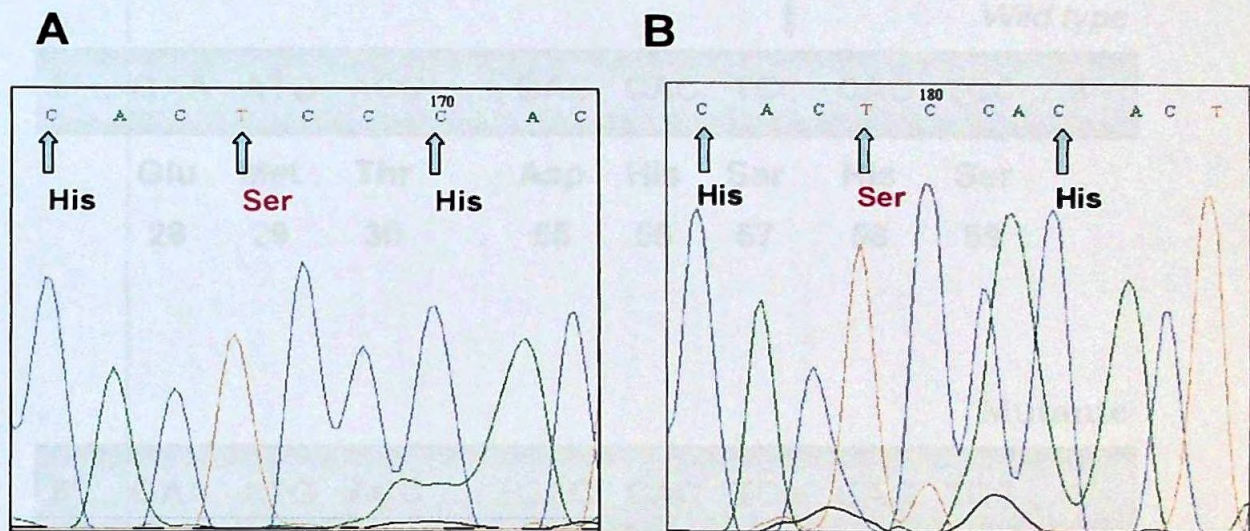


Figura 17: Eletroferograma representativo da análise de sequência do Exon 1 - PPAR $\gamma$ . A: Sequência normal. B: Observa-se a substituição de C para A, em heterozigose, na região codificante (causa).

**Figura 16: Representação esquemática da substituição C  $\rightarrow$  G.** Está localizada no exon B do gene PPAR $\gamma$ , nucleotídeo 34, códon 12.



**Figura 17: Eletroferograma representativo da análise de seqüência do Exon 1 – PPAR $\gamma$ . A. Seqüência normal. B. Observa-se a substituição de C para A, em heterozigose, na região codificadora (exon).**

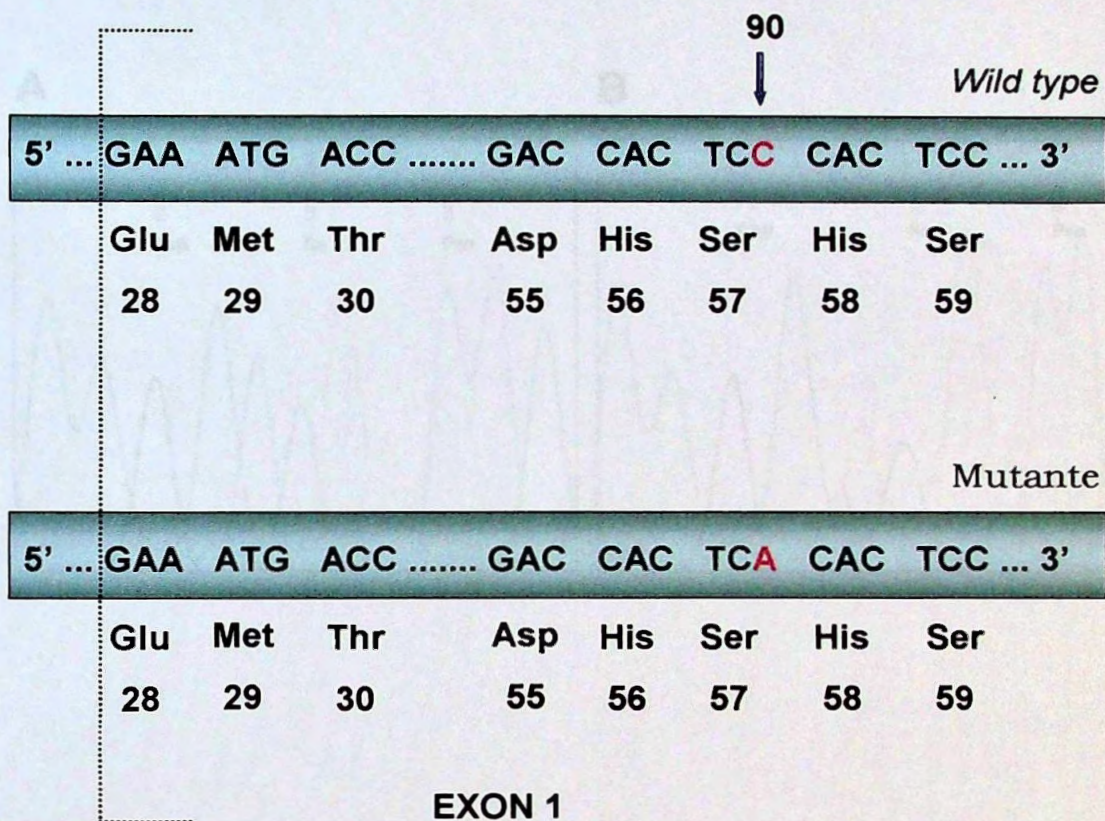
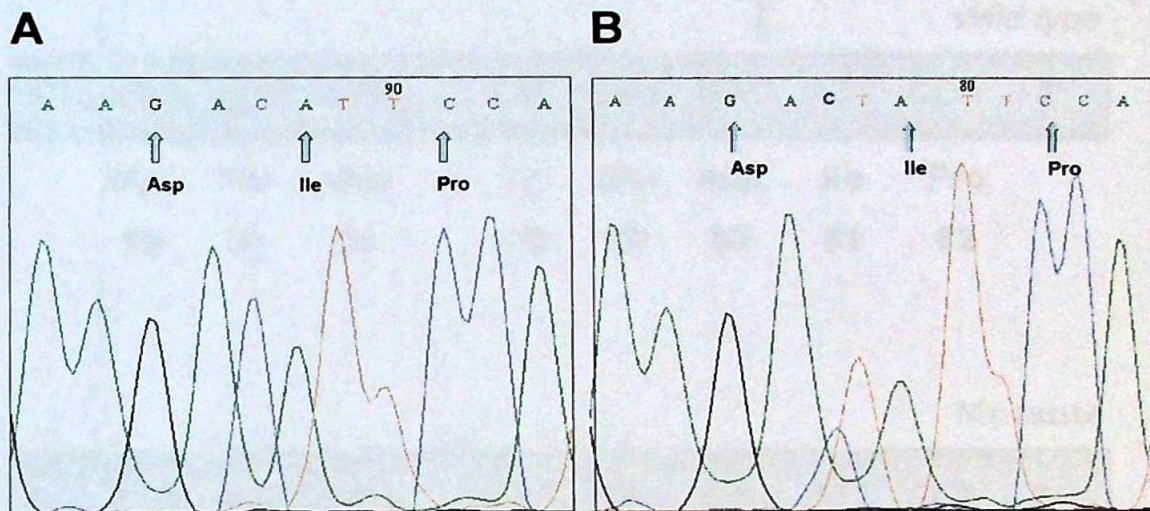


Figure 18: Eletroferograma representativo da análise de sequência do Exon 1 - PPAR $\gamma$ . A: Sequência normal. B: Observe-se a substituição de C para T, em heteroduplexa, na região codificante (em vermelho).

**Figura 18: Representação esquemática da substituição C  $\rightarrow$  A.** Está localizada no exon 1 do gene PPAR $\gamma$ , nucleotídeo 90, códon 57.



**Figura 19: Eletroferograma representativo da análise de seqüência do Exon 1 – PPAR $\gamma$ . A. Seqüência normal. B. Observa-se a substituição de C para T, em heterozigose, na região codificadora (exon).**

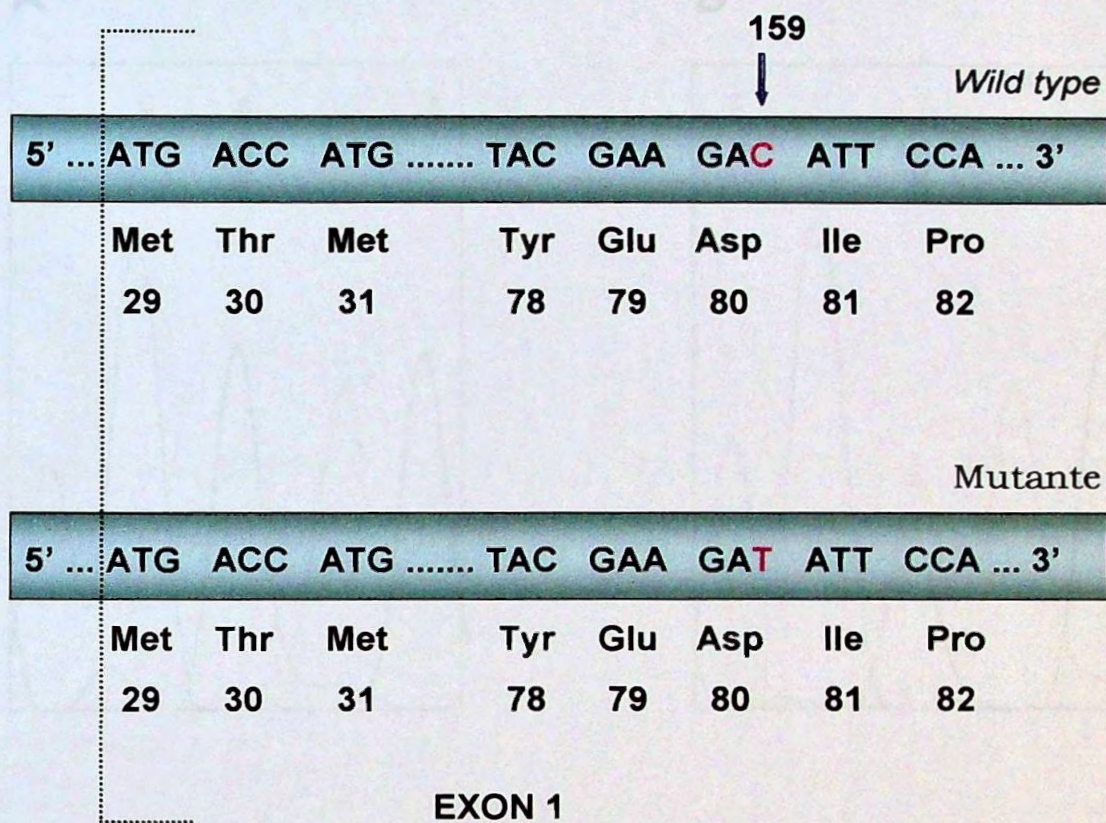
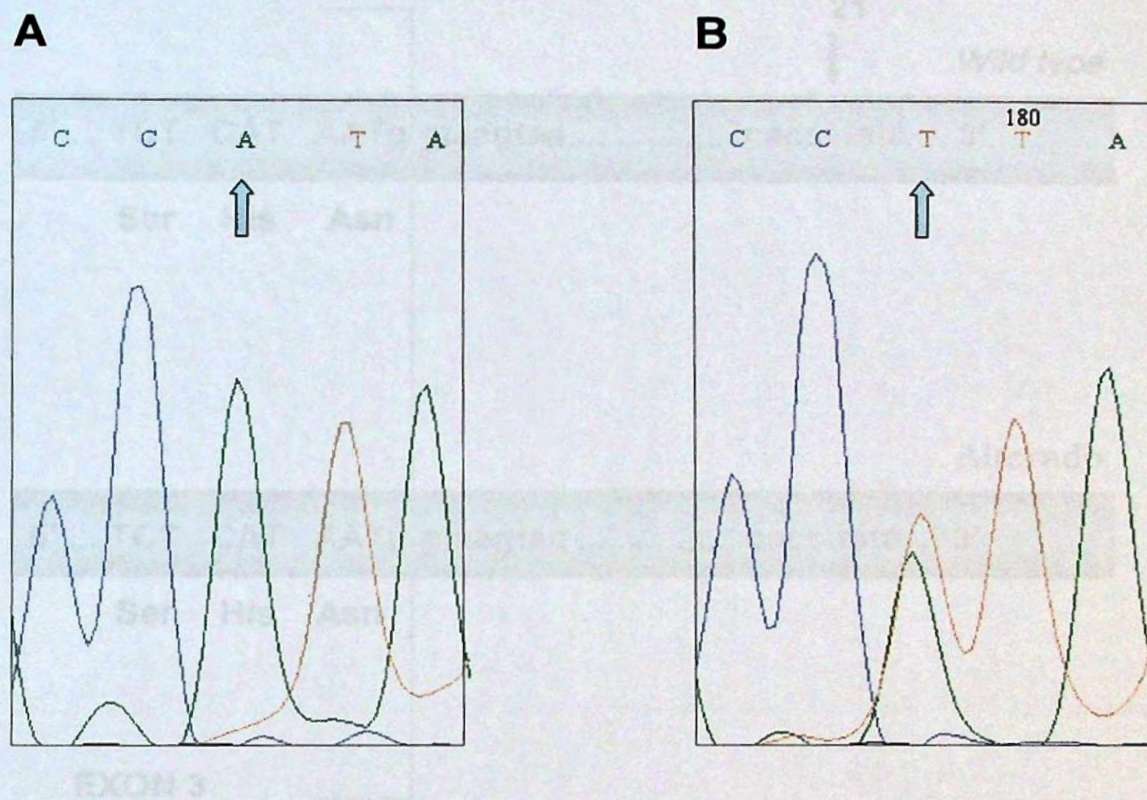


Figura 20: Representação esquemática da substituição C → T. Está localizada no exon 1 do gene PPAR $\gamma$ , nucleotídeo 159, códon 80.

Figura 20: Representação esquemática da substituição C → T. Está localizada no exon 1 do gene PPAR $\gamma$ , nucleotídeo 159, códon 80.



**Figura 21: Eletroferograma representativo da análise de seqüência do Exon 3 – PPAR $\gamma$ .** A. Seqüência normal. B. Observa-se a substituição de A para T, em heterozigose, na região intrônica.

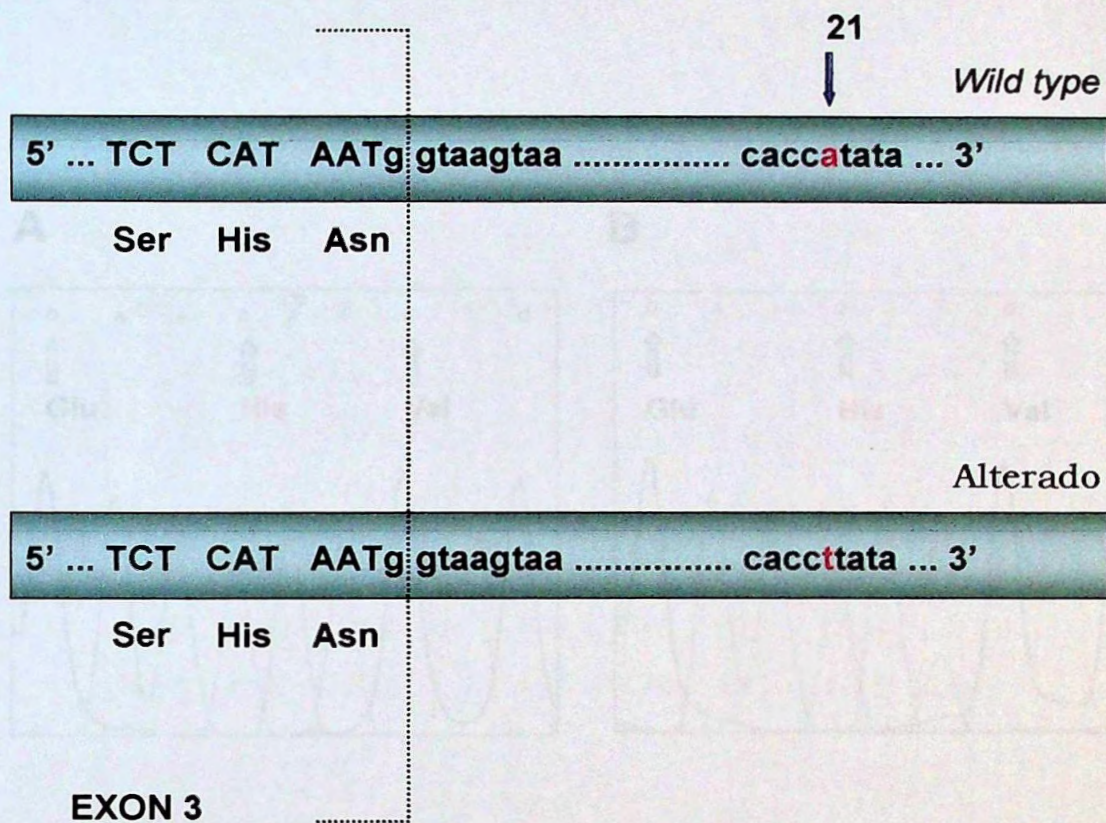
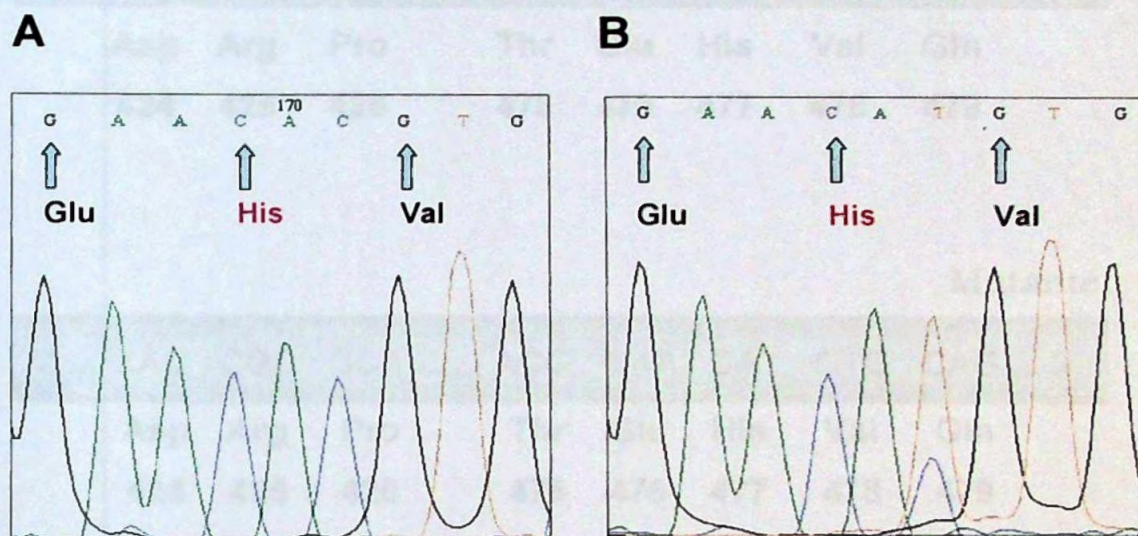
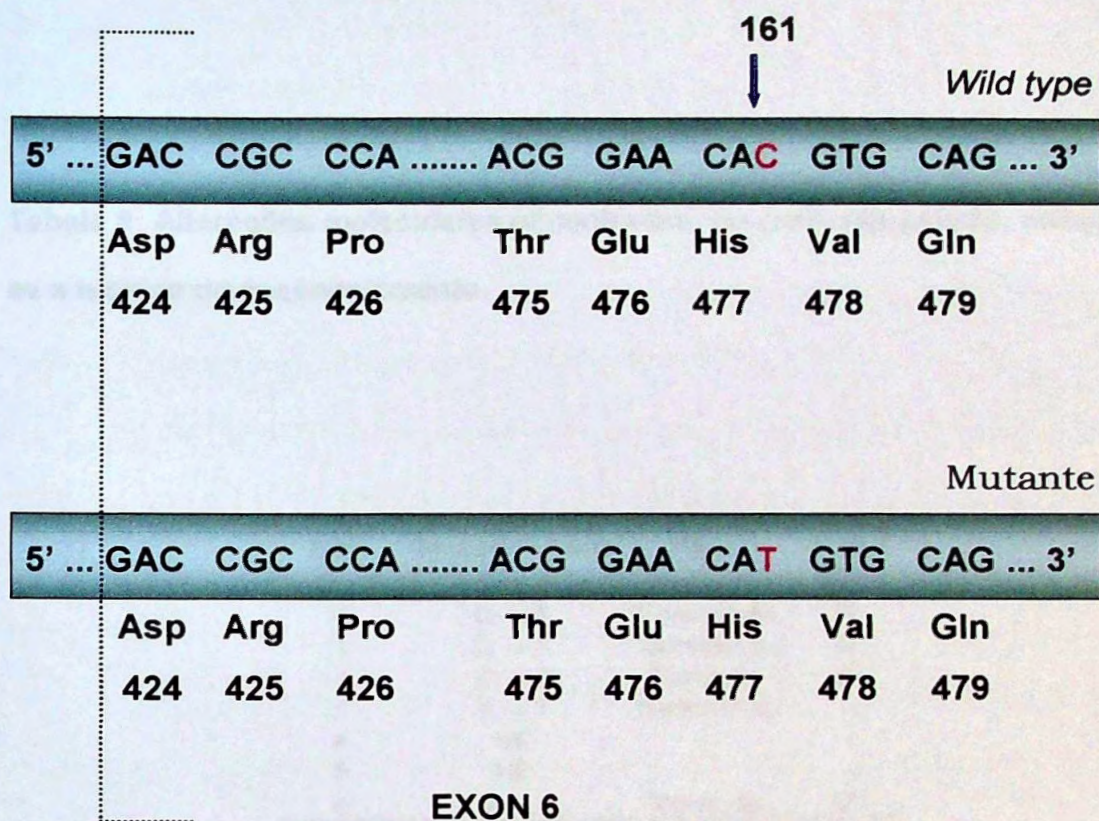


Figura 22: Representação esquemática da substituição A → T. Está localizada no 21 nucleotídeo, após a região de *splicing*, entre os exons 3 e 4 do gene PPAR $\gamma$ .



**Figura 23: Eletroferograma representativo da análise de seqüência do Exon 6 – PPAR $\gamma$ . A. Seqüência normal. B. Observa-se a substituição de C para T, em heterozigose, na região codificadora (exon).**



**Figura 24: Representação esquemática da substituição C → T.** Está localizada no exon 6 do gene PPAR $\gamma$ , nucleotídeo 161, códon 477.

**Tabela 9: Alterações moleculares encontradas, no presente estudo, utilizando-se a técnica de seqüenciamento.**

Exon	Seqüenciamento	Tipo	Codon
B	C → G	Transversão	12
1	C → A	Transversão	57
1	C → T	Transição	80
3*	A → T	Transversão	-
4	NE	-	-
5	NE	-	-
6	C → T	Transição	477

\*intron

NE: não encontrada

A figura 15 mostra o seqüenciamento do Exon B do gene PPAR $\gamma$ 2, para todas as alterações encontradas. Observam-se as trocas de bases C para G (transversão), correspondente ao nucleotídeo 34 (34C>G), conforme representação esquemática da figura 16.

No seqüenciamento do Exon 1 (Figura 17) observa-se a substituição C para A (transversão), correspondente ao nucleotídeo 90 (90C>A), conforme representação esquemática da figura 18. Observa-se também em relação a este exon, a substituição C para T (transição) (Figura 19), correspondente ao nucleotídeo 159 (159C>T), conforme representação esquemática da figura 20.

A figura 21 mostra o seqüenciamento do Exon 3. Verifica-se a substituição de A para T (transversão), correspondente ao nucleotídeo 21 (IVS3+21A>T) após a região de *splicing* entre os exons 3 e 4, conforme representação esquemática da figura 22.

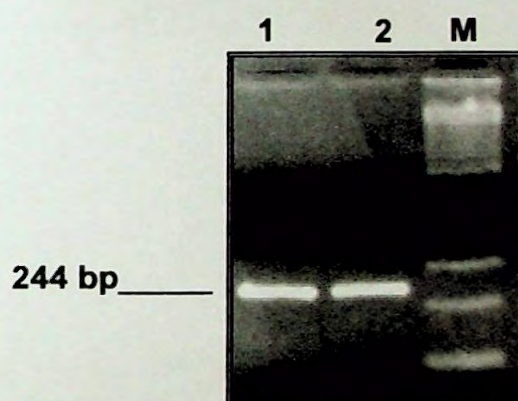
A figura 23 apresenta o seqüenciamento do Exon 6. Observa-se a substituição de C para T (transição), correspondente ao nucleotídeo 161 (161C>T), conforme representação esquemática da figura 24.

Todas as mutações encontradas foram confirmadas por uma segunda amplificação da região genômica alterada e novamente seqüenciada em outro dia, de acordo com sugestões de COTTON & HORAITIS (2000), sendo identificadas conforme recomendações de ANTONARAKIS (1998).

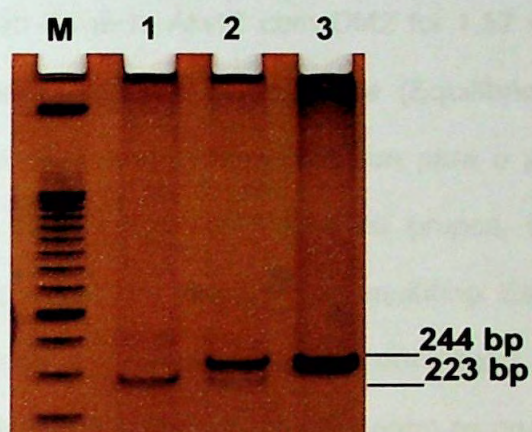
Observando-se os resultados apresentados pelas duas técnicas (PCR-SSCP e seqüenciamento) no presente estudo, obteve-se confirmação no seqüenciamento em 85/87 das alterações de mobilidade eletroforética encontradas na PCR-SSCP, correspondendo a 100% de sensibilidade. Para os exons 4 e 5, não foram encontradas alterações moleculares, em região codificadora ou intron no seqüenciamento.

#### 4.7. Análise do polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 em indivíduos do grupo de estudo e controle.

A análise dos produtos de amplificação e de restrição enzimática do polimorfismo 34C>G estão apresentadas nas figuras 25 e 26. A amplificação do sítio polimórfico resultou em um produto de 244 bp (Figura 25). Na presença do sítio de restrição foram obtidos dois fragmentos: 223 e 21 bp (não visualizado), caracterizando o genótipo homozigoto Ala/Ala (Figura 26 - coluna 1). A ausência do sítio de restrição produz apenas um fragmento de 244 bp caracterizando o genótipo homozigoto Pro/Pro (Figura 26 - coluna 3). A presença de três fragmentos: 244, 223 e 21 bp (não visualizado) caracteriza o genótipo heterozigoto Pro/Ala (Figura 26 - coluna 2).



**Figura 25: Amplificação da região polimórfica 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2.** Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo dos produtos da PCR (colunas 1 e 2). Marcador de pares de bases de DNA de 100 bp (coluna M).



**Figura 26: Polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2.** Gel de poliacrilamida 8%, corado com prata, dos fragmentos digeridos com a enzima BstU-I. Genótipo: Ala/Ala (coluna 1); Pro/Ala (coluna 2) e Pro/Pro (coluna 3). Marcador de pares de bases de DNA de 100 bp (coluna M).

A análise das freqüências dos alelos do polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 nos indivíduos dos GE e GC (Tabela 10) mostrou que a freqüência do alelo Ala12 foi 0,09 (IC 95%: 0,06-0,11) no GE comparado a 0,06 (IC 95%: 0,03-0,08) do GC ( $P = 0,185$ ). Com relação aos genótipos, a freqüência destes também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados ( $P = 0,120$ ), mesmo quando foram separados por sexo: GE ( $P = 0,610$ ) e GC ( $P = 0,415$ ). Razão de chances (RC) para a associação do alelo Ala12 com DM2 foi 1,52 (IC 95%: 0,86-2,68). A relação entre a freqüência gênica e genotípica (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), avaliada pelo teste de qui-quadrado, mostrou que para o polimorfismo 34C>G, o número de genótipos observados em ambos os grupos, obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Esse resultado indica que a amostragem analisada é representativa da população, permitindo, de forma confiável, a comparação das freqüências gênicas entre os grupos avaliados.

A representação gráfica da distribuição de genótipos para o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2, nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC), pode ser observada na Figura 27.

A influência dos genótipos do polimorfismo 34C>G sobre as variáveis do perfil antropométrico e bioquímico, nos indivíduos do GE e GC estão representadas na tabela 11. Não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros antropométricos entre os genótipos estudados (GE e GC). Em relação aos parâmetros bioquímicos, para o GE, verifica-se que o valor médio da insulinemia foi significativamente superior para o genótipo Pro/Pro do que Pro/Ala + Ala/Ala ( $P = 0,036$ ). A mesma tendência pôde ser observada para o índice HOMA-IR ( $P = 0,049$ ) e HOMA- $\beta$  ( $P = 0,054$ ), mesmo após o ajuste para idade, sexo, IMC e ICQ. Portanto, as concentrações séricas de insulina e o índice HOMA-IR nos

indivíduos com o genótipo Pro/Pro foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) que nos indivíduos apresentando o genótipo Pro/Ala + Ala/Ala.

Os indivíduos para os dois grupos estudados também foram agrupados em não obesos ( $n = 262$ ,  $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ ) e obesos ( $n = 115$ ,  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). A distribuição dos genótipos 34C>G foi similar em obesos e não obesos para os respectivos grupos: GE ( $P = 0,348$ ) e GC ( $P = 0,416$ ).

**Tabela 10: Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).**

Grupos	Frequência de genótipos			Frequência de alelos		
	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	Pro12	Ala12	IC 95%
GE (n = 207)	171 (83%)	36 (17%)	- -	378 (0,91)	36 (0,09)	0,09 (0,06-0,11)
GC (n = 170)	151 (89%)	18 (10%)	1 (1%)	320 (0,94)	20 (0,06)	0,06 (0,03-0,08)
$\chi^2 = 2,42 - P = 0,120$			$\chi^2 = 1,76 - P = 0,185$			

Razão de Chances (RC) para a associação do alelo Ala12 com DM2: 1,52 (IC 95%: 0,86-2,68).

Quando o número de homozigotos, em um grupo, foi menor que 5, este foi incorporado ao grupo de heterozigotos antes da análise do  $\chi^2$ .

n = número de indivíduos; GE = Grupo de estudo; GC = Grupo controle.

#### **Equilíbrio de Hardy-Weinberg:**

34C>G: GE,  $\chi^2 = 2,12$  ( $P = NS$ ).

34C>G: GC,  $\chi^2 = 0,06$  ( $P = NS$ ).

Tabola 11. Dados clínicos e parâmetros bioquímicos (Basta 2, DP) de acordo com os genótipos do polimorfismo 34C>G dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).

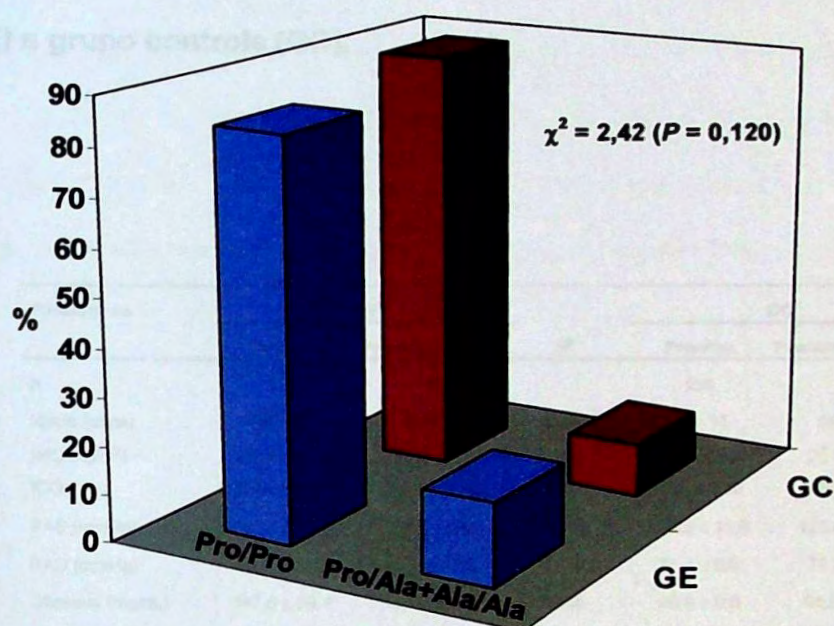


Figura 27: Distribuição de genótipos (%) para o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 no grupo de estudo (GE) e controle (GC).

**Tabela 11. Dados clínicos e parâmetros bioquímicos (Média ± DP) de acordo com os genótipos do polimorfismo 34C>G dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).**

Parâmetros	GE <sup>a</sup>		p <sup>b</sup>	GC <sup>a</sup>		p <sup>b</sup>
	Pro/Pro	Pro/Ala + Ala/Ala		Pro/Pro	Pro/Ala + Ala/Ala	
n	171	36		151	19	
Idade (anos)	54 ± 13	55 ± 11	0,617	53 ± 11	56 ± 13	0,405
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,6 ± 7,3	30,5 ± 5,7	0,837	25,9 ± 3,5	25,0 ± 3,9	0,283
ICQ	0,93 ± 0,11	0,96 ± 0,14	0,511	0,93 ± 0,12	0,90 ± 0,14	0,391
PAS (mmHg)	140,7 ± 25,1	135,8 ± 22,5	0,300	125,5 ± 11,9	126,8 ± 14,0	0,381
PAD (mmHg)	88,8 ± 14,2	85,8 ± 12,5	0,336	76,6 ± 5,0	79,3 ± 8,9	0,923
Glicemia (mg/dL)	147,6 ± 59,4	136,8 ± 39,6	0,255	90,0 ± 9,0	91,8 ± 10,8	0,445
Insulinemia (μUI/mL)	13,7 ± 10,2	9,9 ± 6,6	0,036	7,8 ± 3,3	6,7 ± 1,7	0,313
HbA1c (%)	7,5 ± 1,9	7,5 ± 1,7	0,797	5,0 ± 0,6	4,9 ± 0,6	0,798
HOMA-IR	5,1 ± 5,0	3,3 ± 2,2	0,049	1,8 ± 0,8	1,5 ± 0,4	0,481
HOMA-β (%)	92 ± 67	81 ± 54	0,054	117 ± 79	96 ± 44	0,592
AIP	0,23 ± 0,24	0,17 ± 0,27	0,197	0,07 ± 0,26	0,04 ± 0,29	0,076
TAG (mg/dL)	178 ± 80	160 ± 80	0,243	133 ± 62	125 ± 89	0,093
CT (mg/dL)	217,6 ± 62,2	213,1 ± 35,5	0,134	208,7 ± 31,1	195,4 ± 26,6	0,195
HDL-C (mg/dL)	42,9 ± 11,7	46,8 ± 11,7	0,097	46,8 ± 11,7	50,7 ± 11,7	0,172
LDL-C (mg/dL)	132,6 ± 50,7	124,8 ± 31,2	0,700	128,7 ± 31,2	109,2 ± 23,4	0,314
VLDL-C (mg/dL)	34,1 ± 17	34,1 ± 17	0,224	25,6 ± 8,5	25,6 ± 17	0,089

<sup>a</sup>Valores representados pela média ± desvio padrão; <sup>b</sup>P, valores do teste t; n: número de indivíduos.

GE: Grupo de estudo; GC: Grupo controle.

IMC: Índice de massa corpórea; ICQ: Índice cintura quadril; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA: *homeostasis model assessment*; AIP: índice aterogênico do plasma.

TAG: triacilglicerol; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL.

#### 4.8. Análise do polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ em indivíduos do grupo de estudo e controle.

A análise dos produtos de amplificação e de restrição enzimática do polimorfismo 161C>T estão apresentadas na figura 28. A amplificação do sítio polimórfico resultou em um produto de 303 bp (Coluna 2). A digestão deste produto da PCR com a enzima *Nla* III produziu os seguintes fragmentos: 104 e 199 bp, caracterizando o genótipo homozigoto CC (Coluna 3); 41 (fragmento não visualizado), 104, 158 e 199 bp para o genótipo heterozigoto CT (Coluna 4); 41 (fragmento não visualizado), 104 e 158 para o genótipo homozigoto TT (Coluna 5).



**Figura 28: Polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ .** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo do produto da PCR (coluna 2) e digerido com a enzima *Nla* III. Genótipos: CC (coluna 3); CT (coluna 4) e TT (coluna 5). Marcador de pares de bases de DNA de 50 bp (coluna 1).

A análise das freqüências dos alelos do polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos dos GE e GC (Tabela 12) mostrou que a freqüência do alelo 161T foi 0,10 (IC 95%: 0,07-0,13) no GE comparado a 0,07 (IC 95%: 0,04-0,09) do GC ( $P = 0,210$ ). Com relação aos genótipos, a freqüência destes também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados ( $P = 0,173$ ), mesmo quando foram separados por sexo: GE ( $P = 0,558$ ) e GC ( $P = 0,415$ ). Razão de Chances (RC) para a associação do alelo 161T com DM2 foi 1,45 (IC 95%: 0,86-2,45). A relação entre a freqüência gênica e genotípica (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), avaliada pelo teste de qui-quadrado, mostrou que para o polimorfismo 161C>T, o número de genótipos observados em ambos os grupos, obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio.

A representação gráfica da distribuição de genótipos para o polimorfismo C161T do gene PPAR $\gamma$ , nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC), pode ser observada na Figura 29.

A influência dos genótipos do polimorfismo 161C>T sobre as variáveis do perfil antropométrico e bioquímico, nos indivíduos do GE e GC estão representadas na tabela 13. Não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros antropométricos, bioquímicos e índices HOMA entre os genótipos estudados (GE e GC). Entretanto, no GE, portadores do alelo 161T (genótipos CT + TT) apresentaram valores séricos reduzidos de TAG, VLDL-C ( $P = 0,064$ ) e índice AIP ( $P = 0,021$ ) do que não portadores (genótipo CC). Além disso, quando para cada grupo houve a separação por sexo, essas diferenças foram significativas para TAG, VLDL-C ( $P = 0,040$ ) e índice AIP ( $P = 0,003$ ) em mulheres do GE, mesmo após o ajuste para idade, IMC e ICQ (Figura 30). Quando todo o grupo foi analisado (GE + GC) mulheres com o alelo 161T também apresentaram menores valores séricos de TAG ( $P = 0,052$ ), VLDL-C ( $P = 0,038$ ) e AIP ( $P = 0,031$ ) do que portadores do alelo 161C.

Os indivíduos para os dois grupos estudados também foram agrupados em não obesos ( $n = 262$ ,  $\text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$ ) e obesos ( $n = 115$ ,  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). A distribuição dos genótipos 161C>T foi similar em obesos e não obesos para os respectivos grupos: GE ( $P = 0,995$ ) e GC ( $P = 0,748$ ).

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade de São Paulo

---

**Tabela 12: Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).**

Grupos	Frequência de Genótipos			Frequência de alelos		
	CC	CT	TT	C	T	IC 95%
GE (n = 207)	167 (80,7%)	39 (18,8%)	1 (0,5%)	373 (0,90)	41 (0,10)	0,10 (0,07-0,13)
GC (n = 170)	147 (86,5%)	22 (12,9%)	1 (0,6%)	316 (0,93)	24 (0,07)	0,07 (0,04-0,09)
$\chi^2 = 1,85 - P = 0,173$			$\chi^2 = 1,57 - P = 0,210$			

Razão de Chances (RC) para a associação do alelo 161T com DM2: 1,45 (IC 95%: 0,86-2,45).

Quando o número de homozigotos, em um grupo, foi menor que 5, este foi incorporado ao grupo de heterozigotos antes da análise do  $\chi^2$ .

GE = Grupo de estudo; GC = Grupo controle.

#### **Equilíbrio de Hardy-Weinberg:**

161C>T: GE,  $\chi^2 = 0,614$  ( $P = NS$ ).

161C>T: GC,  $\chi^2 = 0,001$  ( $P = NS$ ).

Tabela 1.3: Dados clínicos e parâmetros bioquímicos (Média ± DP) de acordo com os genótipos do polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$  no grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).

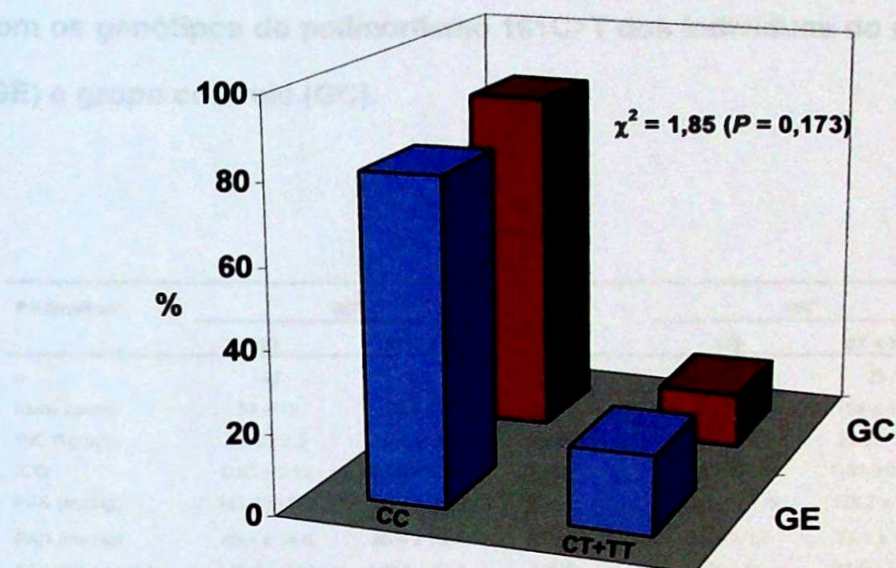


Figura 29: Distribuição de genótipos (%) para o polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$  no grupo de estudo (GE) e controle (GC).

**Tabela 13. Dados clínicos e parâmetros bioquímicos (Média ± DP) de acordo com os genótipos do polimorfismo 161C>T dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).**

Parâmetros	GE <sup>a</sup>		P <sup>b</sup>	GC <sup>a</sup>		P <sup>b</sup>
	CC	CT + TT		CC	CT + TT	
n	167	40		147	23	
Idade (anos)	54 ± 13	55 ± 11	0,551	53 ± 11	54 ± 11	0,405
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,6 ± 7,3	30,5 ± 5,7	0,837	25,9 ± 3,5	25,0 ± 3,9	0,532
ICQ	0,93 ± 0,12	0,95 ± 0,14	0,998	0,93 ± 0,12	0,93 ± 0,15	0,970
PAS (mmHg)	141,3 ± 25,8	133,7 ± 18,5	0,153	125,4 ± 7,6	126,7 ± 7,7	0,445
PAD (mmHg)	89,1 ± 14,6	85,0 ± 10,1	0,237	76,9 ± 1,7	77,1 ± 1,9	0,550
Glicemia (mg/dL)	145,8 ± 57,6	147,6 ± 52,2	0,675	90 ± 9	93,6 ± 10,8	0,126
Insulinemia (μUI/mL)	10,5 ± 6,4	9,4 ± 6,0	0,469	7,7 ± 3,1	8,0 ± 4,1	0,849
HbA1c (%)	7,5 ± 1,8	7,6 ± 1,8	0,581	5,0 ± 0,6	4,9 ± 0,6	0,891
HOMA-IR	4,9 ± 4,8	4,4 ± 4,7	0,452	1,7 ± 0,7	1,9 ± 1,1	0,544
HOMA-β (%)	91,1 ± 68,3	66,6 ± 57,7	0,231	116,9 ± 79,4	100,8 ± 46,4	0,430
AIP	0,24 ± 0,24	0,14 ± 0,27	0,021	0,06 ± 0,25	0,05 ± 0,31	0,919
TAG (mg/dL)	182,4 ± 88,1	158,4 ± 86,3	0,064	135,3 ± 61,4	141,5 ± 93,4	0,746
CT (mg/dL)	217,6 ± 61,7	212,2 ± 35,5	0,807	209,6 ± 32,4	196,7 ± 26,2	0,109
HDL-C (mg/dL)	42,9 ± 11,7	46,8 ± 11,7	0,821	46,8 ± 11,7	46,8 ± 11,7	0,715
LDL-C (mg/dL)	132,6 ± 50,7	124,8 ± 31,2	0,859	128,7 ± 31,2	117 ± 23,4	0,387
VLDL-C (mg/dL)	34,1 ± 17	25,6 ± 17	0,064	25,6 ± 8,5	25,6 ± 17	0,707

<sup>a</sup>Valores representados pela média ± desvio padrão; <sup>b</sup>P, valores do teste t; n: número de indivíduos.

GE: Grupo de estudo; GC: Grupo controle.

IMC: Índice de massa corpórea; ICQ: Índice cintura quadril; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

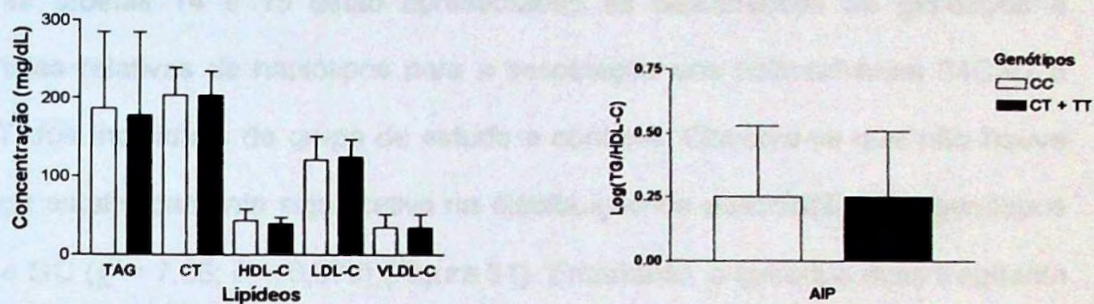
HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA: *homeostasis model assessment*; AIP: Índice aterogênico do plasma.

TAG: triacilglicerol; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL.

## 4.9. Análise da distribuição de genótipos e fenótipos relativos ao

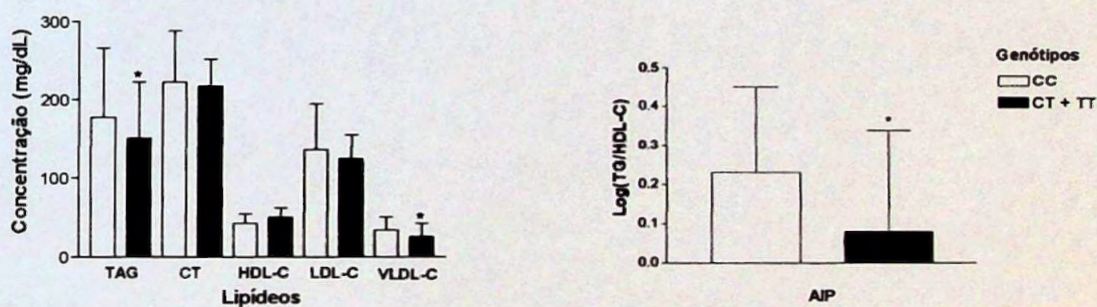
polimorfismo 161C>T, para a associação dos genótipos CC e CT+TT com os níveis de lipídios e com o índice aterogênico do plasma (AIP), nos indivíduos do grupo de estudo.

## HOMENS - GE



Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney para o teste de associação entre os níveis de lipídios e o índice aterogênico do plasma (AIP) com os genótipos CC e CT+TT. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney para o teste de associação entre os níveis de lipídios e o índice aterogênico do plasma (AIP) com os genótipos CC e CT+TT.

## MULHERES - GE



**Figura 30: Concentrações médias de lipídeos e índice aterogênico do plasma (AIP), por sexo, no soro dos pacientes do Grupo de estudo (GE) de acordo com os genótipos do polimorfismo 161C>T. \*P < 0,05; TAG: triacilglicerol; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL.**

**4.9. Análise da distribuição de genótipos e frequência relativa de haplótipos para a associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos do grupo de estudo.**

Nas tabelas 14 e 15 estão apresentadas as distribuições de genótipos e frequências relativas de haplótipos para a associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T dos indivíduos do grupo de estudo e controle. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição da associação dos genótipos do GE e GC ( $\chi^2 = 7,06$ ;  $P = 0,070$ ) (Figura 31). Entretanto, o genótipo mais frequente no grupo GE (77,7%) e controle (82,3%) foi o Pro/Pro-CC, confirmando-se os resultados obtidos para as frequências isoladas nos polimorfismos 34C>G e 161C>T. Os dois polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação ( $P < 0,001$ ), conforme tabelas 14 e 15, sugerindo que os fenótipos observados para um determinado polimorfismo podem ser devidos à ligação com o outro.

**Tabela 14: Distribuição de genótipos e frequência relativa de haplótipos para a associação dos genótipos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos do grupo de estudo.**

GENÓTIPOS	N	%	HAPLÓTIPO	FREQÜÊNCIA	IC 95%
Pro/Pro - CC	161	77,7	Pro - C	0,89	0,85 - 0,92
Pro/Pro - CT	10	4,8			
Pro/Pro - TT	0	0	Pro - T	0,03	0,02 - 0,07
Pro/Ala - CC	6	2,9	Ala - C	0,01	0,003 - 0,03
Pro/Ala - CT	29	14			
Pro/Ala - TT	1	0,6	Ala - T	0,07	0,05 - 0,10
<b>TOTAL</b>	<b>207</b>	<b>100</b>			

#### **Desequilíbrio de Ligação**

$P < 0,001$

**Tabela 15: Distribuição de genótipos e frequência relativa de haplótipos para a associação dos genótipos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos do grupo controle.**

GENÓTIPOS	N	%	HAPLÓTIPO	FREQÜÊNCIA	IC 95%
Pro/Pro - CC	140	82,3	Pro - C	0,91	0,87 - 0,94
Pro/Pro - CT	11	6,5			
Pro/Pro - TT	0	0	Pro - T	0,04	0,01 - 0,05
Pro/Ala - CC	7	4,1	Ala - C	0,02	0,005 - 0,03
Pro/Ala - CT	10	5,9			
Pro/Ala - TT	1	0,6	Ala - T	0,03	0,01 - 0,05
Ala/Ala - CT	1	0,6			
<b>TOTAL</b>	<b>170</b>	<b>100</b>			

### Desequilíbrio de Ligação

$P < 0,001$

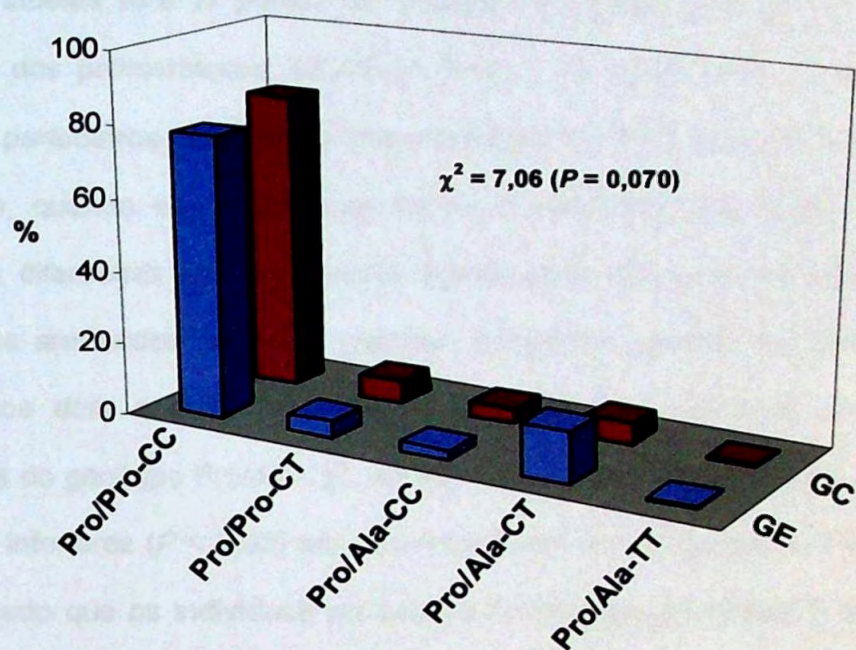


Figura 31: Distribuição de genótipos (%) para a associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC).

**4.10. Análise do efeito da associação entre os polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos nos indivíduos do grupo de estudo.**

Nas tabelas 16 e 17 podem ser verificados os efeitos da associação entre os genótipos dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos dos indivíduos do GE e controle. Como pode ser observado, quando se compararam todos os genótipos pelo teste ANOVA, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas no presente estudo, para os parâmetros analisados no GE e controle. Entretanto, quando os genótipos foram comparados dois a dois, utilizando-se o teste-*t*, os indivíduos do grupo GE, portadores do genótipo Pro/Ala-CC, apresentaram concentração de insulina e índice HOMA-IR inferiores ( $P < 0,05$ ) aos indivíduos com outros genótipos. Por outro lado, foi observado que os indivíduos portadores do genótipo Pro/Pro-CT, no grupo GE, apresentaram valores de HDL-C superiores ( $P < 0,05$ ) aos outros genótipos.

Neste estudo de associação, quando foram separados por sexo, não se observou nenhuma contribuição dos genótipos em relação aos resultados individuais previamente encontrados.

Esses achados confirmam os resultados individuais, encontrados anteriormente para o polimorfismo 34C>G e 161C>T, demonstrando a contribuição destes polimorfismos no metabolismo de lipídeos e carboidratos nos indivíduos estudados.

**Tabela 16: Efeito da associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos do grupo de estudo (GE).**

Parâmetros	Genótipos <sup>a</sup>			P <sup>b</sup>
	Pro/Pro - CC (1)	Pro/Pro - CT (2)	Pro/Ala - CC (3)	
n	161	10	6	
Idade (anos)	54 ± 13	52 ± 9	51 ± 7	0,750
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,7 ± 7,3	28,9 ± 7,1	31,0 ± 9,4	0,734
ICQ	0,93 ± 0,11	0,90 ± 0,14	0,94 ± 0,18	0,355
PAS (mmHg)	141,2 ± 25,4	133,0 ± 18,9	145,0 ± 37,3	0,619
PAD (mmHg)	89,0 ± 14,4	85,0 ± 9,7	90,0 ± 20,9	0,779
Glicose (mg/dL)	146,8 ± 58,3	172,0 ± 71,0	127,2 ± 14,3	0,345
Insulina ( $\mu$ UI/mL)	13,6 ± 10,2 <sup>c</sup>	15,3 ± 11,9 <sup>c</sup>	7,0 ± 5,9 <sup>c</sup>	0,186
HbA <sub>1c</sub> (%)	7,5 ± 1,9	7,9 ± 2,0	7,6 ± 1,9	0,757
HOMA-IR	4,9 ± 4,8 <sup>d</sup>	7,2 ± 8,3 <sup>d</sup>	2,2 ± 1,9 <sup>d</sup>	0,088
HOMA- $\beta$ (%)	93 ± 63	72 ± 64	41 ± 33	0,174
AIP	0,24 ± 0,24	0,08 ± 0,30	0,24 ± 0,32	0,152
TAG (mg/dL)	183,6 ± 87,5	160,8 ± 95,9	202,8 ± 105,0	0,469
CT (mg/dL)	213,3 ± 57,0	209,3 ± 23,2	214,0 ± 31,1	0,967
HDL-C (mg/dL)	42,8 ± 11,0 <sup>e</sup>	53,4 ± 14,2 <sup>e</sup>	48,7 ± 20,7 <sup>e</sup>	0,065
LDL-C (mg/dL)	132,6 ± 50,5	123,7 ± 25,8	123,6 ± 39,5	0,755
VLDL-C (mg/dL)	36,7 ± 17,6	27,9 ± 10,9	40,7 ± 21,1	0,225

<sup>a</sup>Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão; <sup>b</sup>Teste de ANOVA; n: número de indivíduos; IMC: índice de massa corpórea.

ICQ: índice cintura quadril; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; HOMA: *homeostasis model assessment*.

AIP: índice aterogênico do plasma; TAG: triacilglicerol; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; VLDL-C: colesterol da VLDL.

<sup>c</sup>Genótipos 1 vs. 3 e 2 vs. 3 ( $P^* < 0,05$ ); <sup>d</sup>Genótipos 1 vs. 3 e 2 vs. 3 ( $P^* < 0,05$ ); <sup>e</sup>Genótipos 1 vs. 2 e 2 vs 3 ( $P^* < 0,05$ ).

P<sup>\*</sup>: valores do teste t.

**Tabela 17: Efeito da associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos do grupo controle (GC).**

Parâmetros	Genótipos <sup>a</sup>			p <sup>b</sup>
	Pro/Pro - CC (1)	Pro/Pro - CT (2)	Pro/Ala - CC (3)	
n	140	11	7	
Idade (anos)	52 ± 11	55 ± 11	59 ± 14	0,281
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 ± 3,4	26,5 ± 4,4	24,4 ± 4,0	0,419
ICQ	0,93 ± 0,12	0,95 ± 0,16	0,90 ± 0,14	0,418
PAS (mmHg)	125,2 ± 7,5	127,4 ± 7,3	129,5 ± 9,6	0,295
PAD (mmHg)	76,8 ± 1,7	77,2 ± 1,9	77,7 ± 1,7	0,440
Glicose (mg/dL)	90,5 ± 9,9	96,6 ± 8,3	93,0 ± 8,3	0,116
Insulina ( $\mu$ UI/mL)	7,7 ± 3,1	9,7 ± 5,2	7,2 ± 1,3	0,806
HbA <sub>1c</sub> (%)	5,0 ± 0,6	5,0 ± 0,4	5,0 ± 0,5	0,993
HOMA-IR	1,7 ± 0,7	2,4 ± 1,4	1,6 ± 0,3	0,158
HOMA- $\beta$ (%)	118 ± 81	104 ± 46	93 ± 39	0,765
AIP	0,06 ± 0,26	0,17 ± 0,24	0,02 ± 0,22	0,259
TAG (mg/dL)	136,5 ± 61,2	153,6 ± 79,4	112,7 ± 54,0	0,362
CT (mg/dL)	204,9 ± 31,8	199,0 ± 31,5	191,8 ± 38,3	0,499
HDL-C (mg/dL)	48,4 ± 12,6	42,2 ± 9,9	50,3 ± 18,1	0,270
LDL-C (mg/dL)	127,8 ± 30,4	126,0 ± 22,2	119,0 ± 27,8	0,740
VLDL-C (mg/dL)	28,7 ± 15,2	30,7 ± 15,9	22,1 ± 9,9	0,372

<sup>a</sup>Valores representados pela média  $\pm$  desvio padrão; <sup>b</sup>Teste de ANOVA; n número de indivíduos; IMC: índice de massa corpórea.

ICQ: Índice cintura quadril; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; HOMA: *homeostasis model assessment*.

AIP: Índice aterogênico do plasma; TAG: triacilgliceríd; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da HDL; VLDL-C: colesterol da VLDL.

## 5. Discussão

---

Atualmente, o diabetes melito constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, onde são observados os maiores índices de prevalência e incidência (DIAMANT & HEINE, 2003). A Organização Mundial de Saúde estima que no ano de 2025 existirão trezentos milhões de indivíduos afetados pela doença em todo o mundo (KING *et al.*, 1998). De acordo com os dados do primeiro Censo Nacional de Diabetes, 7,6% da população brasileira na faixa etária de 30 a 69 anos é portadora de diabetes melito do tipo 2 (DM2), forma mais freqüente de diabetes melito, responsável por mais de 90% dos casos. O aumento desta prevalência tem sido relacionado à urbanização, industrialização, sedentarismo, alimentação desequilibrada, à maior incidência de obesidade, ao aumento da expectativa de vida da população em geral e à maior sobrevida dos pacientes diabéticos.

Com a recente evolução científica e o rápido crescimento na identificação de novas doenças genéticas, verifica-se o aumento do interesse na caracterização de mutações responsáveis por esses acometimentos, ou ainda, a identificação de polimorfismos no DNA. Desta forma, crescem as expectativas em relação às pesquisas de novas seqüências variantes no genoma humano e a identificação de genes que conferem suscetibilidade ou resistência a determinadas doenças humanas. Neste sentido, a descrição de polimorfismo nos genes é extremamente importante, com possibilidades de associações das diversas variações e sua relação ou não com manifestações de doenças, possibilitando melhoria na eficácia de fármacos e outras terapias. Esta tarefa, porém, tem sido muito difícil, haja vista que para a localização de genes que contribuem no risco de doenças comuns, tais como o diabetes, doenças cardíacas e neoplasias, tem-se observado a ação de múltiplos

genes que interferem nestes fenótipos, tendo cada qual um pequeno efeito que também está associado a fatores ambientais.

Com as técnicas moleculares, através de estudos mais detalhados, tem sido possível mostrar que fatores genéticos estão envolvidos (mutações e polimorfismos) nas alterações do metabolismo de carboidratos e lipídeos, porém, enquanto as bases moleculares de várias formas incomuns de DM2 tem sido definida (VIONNET *et al.*, 1992; YAMAGATA *et al.*, 1996; HORIKAWA *et al.*, 1997; STOFFERS *et al.*, 1997; BARROSO *et al.*, 1999; MALECKI *et al.*, 1999; SAVAGE *et al.*, 2002), a natureza das variantes alélicas que conferem susceptibilidade às formas mais comuns desta doença são pobremente definidas.

Neste contexto, pode-se destacar a importância do estudo do gene do receptor PPAR $\gamma$  que atualmente se revela de grande importância, pois desempenha função significativa no metabolismo de lipídeos e carboidratos, haja vista que a descoberta de drogas que aumentam a sensibilidade à insulina (tiazolidinedionas) tem seus efeitos mediados pela expressão alterada de genes dependentes do PPAR $\gamma$ . Conseqüentemente, este gene tomou-se um excelente candidato para a pesquisa de mutações que causam insulino resistência e diabetes (AUWERX, 1999).

Vários métodos para detecção de mutação foram desenvolvidos e utilizados no diagnóstico clínico de grande número de doenças genéticas, como o câncer, análise do genoma viral e estudos farmacogenéticos (MCKECHNIE & MCCRUDE, 2001; SHI, 2001). Das técnicas mais empregadas nestes estudos, podemos citar: DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), SSCP (*single strand conformational polymorphism*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e seqüenciamento de DNA. Entre estes métodos, destaca-se o SSCP (ORITA *et al.*, 1989), por ser o mais utilizado em triagem de mutações e por sua simplicidade, rapidez,

praticabilidade, custo e eficiência (HUMPHRIES, *et al.*, 1997), tomando-se desnecessário o seqüenciamento de todos os exons para um determinado gene.

Neste trabalho, utilizando-se de uma metodologia de rastreamento de mutações e polimorfismos, com praticidade e sensibilidade adequadas, a técnica da PCR-SSCP foi otimizada, visando sua utilização na triagem da região promotora e exons do gene PPAR $\gamma$ .

Vários fatores podem influenciar na sensibilidade da PCR-SSCP (SAVOV *et al.*, 1992; TESCHAUER *et al.*, 1996): temperatura, pH, tempo de eletroforese, composição e utilização de aditivos no gel (glicerol e acrilamida), tipo de seqüência, posição da substituição, tipo de mutação e tamanho dos fragmentos. A primeira estratégia foi obter iniciadores que permitissem produtos da PCR com alta sensibilidade de detecção (151 a 338 bp para a região promotora e gene do PPAR $\gamma$ ), haja vista que melhores resultados são alcançados com fragmentos menores do que 200 bp (HAYASHI, 1992; SHEFFIELD *et al.*, 1993), pois evidências sugerem que a detecção de uma única troca de base é menos sensível em grandes fragmentos (SARKAR *et al.*, 1992). Posteriormente, todos os 17 fragmentos foram amplificados após otimização, de maneira a se obter produtos da PCR com única banda, quando avaliados por eletroforese em gel de agarose (Figura 8).

Na otimização das condições de eletroforese em gel de poliacrilamida, devido à influência da temperatura por ocasião da corrida (HAYASHI & YANDELL, 1993), foram utilizadas duas temperaturas: 5 e 15 °C, baseado na descrição de SALAZAR *et al.* (2002), em que mostraram um alto poder de detecção de alteração molecular no estudo do gene do receptor da LDL (aproximadamente 97%). O gel de poliacrilamida utilizado neste experimento foi a 12,5% GeneGel Excel em sistema semi-automatizado GenePhor® (Amersham Biosciences) e as condições de voltagem foram as preconizadas pelo fabricante.

Em relação aos resultados obtidos pela técnica da PCR-SSCP, várias alterações de mobilidade eletroforética foram encontradas, para os diferentes fragmentos (Tabela 8), com os mesmos resultados, tanto para 5 e 15°C, em todos os experimentos. Portanto, obteve-se a mesma sensibilidade para as duas temperaturas empregadas na triagem do gene PPAR $\gamma$ . Ressalta-se também o alto poder de detecção de alterações moleculares obtidas com a otimização desta técnica (100%), estando de acordo com SALAZAR *et al.* (2002); outros autores preconizam este poder em torno de 80% (ORITA *et al.*, 1989; SARKAR *et al.*, 1992). Ocorre também que em relação aos exons 4 e 5, não obtivemos qualquer alteração no seqüenciamento, apesar da mobilidade eletroforética apresentar-se alterada na PCR-SSCP, como encontrado em alguns experimentos que utilizaram esta técnica para detecção de mutações (ALBITAR *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1997). Segundo ORITA *et al.* (1989), a mobilidade dos fragmentos pode variar por provável alteração na conformação da própria molécula. Portanto, por este procedimento foi possível caracterizar alterações moleculares apresentadas neste estudo, para o gene PPAR $\gamma$ , com a triagem de mutações em indivíduos da população brasileira com DM2.

Os resultados obtidos pelo seqüenciamento, para os fragmentos que apresentaram alteração de mobilidade eletroforética na PCR-SSCP, estão apresentados na tabela 9.

Ao analisar as freqüências relativas de alelos para o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2, verificou-se que a freqüência do alelo Ala12 (0,09) nos indivíduos do GE foi similar à observada no GC (0,06). Observou-se também que a distribuição dos genótipos foi similar no GE e GC, obedecendo a lei de Hardy-Weinberg em ambos os grupos (GE e GC). Além disso, as freqüências relativas de alelos para este polimorfismo, no GE, foi similar à observada previamente em um estudo brasileiro (CARAMORI *et al.*, 2003).

Comparando-se a frequência do alelo Ala12 (0,09) com outras populações, verificou-se que foi semelhante à encontrada em caucasianos com DM2 na França (0,10) (ALTSHULER *et al.*, 2000; CLEMENT *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000), porém um pouco menor do que na população da Alemanha (0,14) (RINGEL *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2000), Itália (0,13) (MANCINI *et al.*, 1999) e Finlândia (0,14) (VALVE *et al.*, 1999). Ressalta-se ainda que nestas investigações, o alelo predominante foi o Pro12, sugerindo maior frequência do genótipo homozigoto Pro/Pro, conforme encontrado em nossos estudos.

O polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2, inicialmente descrito por BEAMER *et al.* (1998), é a variante genética de maior prevalência para o PPAR $\gamma$ 2, com a substituição do aminoácido prolina por alanina, no códon 12, com frequência aproximada de 15% em algumas populações de caucasianos (ALTSHULER *et al.*, 2000; STUMVOLL & HARING, 2002; GURNELL, 2003). Em algumas análises funcionais, o polimorfismo 34C>G exibiu reduzida ligação ao DNA e moderado prejuízo na ativação transcricional, tendo estas propriedades funcionais sido correlacionadas, inicialmente, com reduzido índice de massa corpórea (IMC) (DEEB *et al.*, 1998). Em oposição a este estudo, MASUD *et al.* (2003) sugere que o polimorfismo 34C>G tem efeito no IMC somente em indivíduos com acentuada obesidade. No presente estudo, nenhum resultado significativo foi encontrado para a associação do polimorfismo 34C>G com IMC ou outros dados clínicos, podendo ser atribuído a aumento de influências do meio ambiente, fatores genéticos desconhecidos ou da própria obesidade (NICKLAS *et al.*, 2001; LUAN *et al.*, 2001).

Outras investigações sugeriram a relação deste polimorfismo como um *locus* potencial para susceptibilidade ao diabetes, mostrando associação significativa com o risco desta doença (MANCINI *et al.*, 1999; RINGEL *et al.*, 1999; CLEMENT *et al.*, 2000; HARA *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000).

Na análise da influência do polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 sobre os parâmetros bioquímicos, observou-se que portadores do alelo Ala12, no GE, foram associados a menor concentração sérica de insulina, maior sensibilidade à insulina (HOMA-IR) e tendência à capacidade diminuída de secreção da insulina (HOMA- $\beta$ ), porém, sem diferença estatisticamente significativa, quando comparados aos portadores do alelo Pro12. Verificou-se também, após ajuste por regressão linear múltipla, que o efeito deste polimorfismo sobre a concentração sérica de insulina e índice HOMA-IR, foi independente da idade, sexo, índice de massa corpórea e índice cintura quadri.

A associação do alelo Ala12 com alta sensibilidade a insulina foi o resultado mais consistente em relação aos estudos com o polimorfismo 34C>G no gene PPAR $\gamma$ 2 (DEEB *et al.*, 1998; KOCH *et al.*, 1999; HARA *et al.*, 2000; EK *et al.*, 2001; POULSEN *et al.*, 2003), tendo-se também estudos na qual esta associação não foi encontrada (HASSTEDT *et al.*, 2001; STEFAN *et al.*, 2001). As razões para estas divergências podem estar relacionadas às diferenças étnicas, modelos estudados, tamanhos da amostra, efeitos do gênero e IMC (KAO *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 influenciam no DM2 são desconhecidos. Desde que a resistência à insulina é um fator de risco para o DM2, o aumento da sensibilidade à insulina pode ser um dos fatores pelos quais o alelo Ala12 possa estar envolvido na proteção ao DM2, embora os portadores deste alelo tenham risco aumentado para a deficiência de insulina e severidade da doença (TAVARES *et al.*, 2004a). Corroborando com esta possibilidade, STEFAN *et al.* (2001) verificaram que portadores normoglicêmicos do alelo Ala12, com peso normal, apresentavam a segunda fase da secreção de insulina diminuída, após elevação experimental no soro de ácidos graxos livres, quando comparada com indivíduos portadores do alelo Pro12. Os referidos autores

concluíram que a razão para esta alteração pode estar associada com distúrbios na secreção de insulina ao invés de sua ação prejudicada. Além disso, melhora na sensibilidade à insulina pode não estar relacionada somente com alterações no metabolismo do tecido adiposo (BURANT *et al.*, 1997).

O gene PPAR $\gamma$ 2 também é expresso nas células  $\beta$  pancreáticas (DUBOIS *et al.*, 2000), portanto, os portadores do alelo Ala12 podem ter a função destas células comprometidas pela reduzida capacidade em ativar a transcrição, com provável diminuição na secreção de insulina (MORI *et al.*, 2001). Também tem sido proposto que o gene PPAR $\gamma$ 2 seja um dos mediadores da interação gene-ambiente e que, mudanças benéficas na dieta e aumento da atividade física com concomitante perda de peso e interações gene-exercício e gene-nutrientes, diminuam o efeito prejudicial para os portadores do alelo Ala12 em relação às formas mais severas de DM2.

Para as alterações moleculares encontradas no exon 1 (90C>A e 159C>T), até o momento não descritas, estão sendo estudadas estratégias para o estudo destes achados em relação ao possível impacto na homeostase da glicose e lipídeos, assim como, o estudo de associação das frequências de genótipos e alelos com os dados clínicos e laboratoriais.

O mesmo poderá ser feito em relação à alteração molecular encontrada e ainda não descrita, na região intrônica (IVS3+21A>T), haja vista que estas regiões podem albergar modificações nucleotídicas que interferem na quebra da seqüência exon-intron, com provável retenção do intron, pois nestes locais existem regiões conservadas que são reconhecidas de maneira exata por pequenas nucleoproteínas (UsnRNA – *small nuclear RNA*), cuja finalidade está relacionada ao mecanismo de *splicing*, em que os introns são retirados, dando origem ao transcrito maduro de RNA formado apenas por exons.

Enquanto a maioria das mutações resultam em alterações de resíduos de aminoácidos, num pequeno número destas isto não ocorre, sendo classificadas como mutações silenciosas (por exemplo, o polimorfismo 161C>T). Mutações silenciosas têm sido relacionadas com algumas patologias (GOLDSMITH *et al.*, 1983; BERG *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1995), principalmente por afetar o processamento do RNA, atuando no mecanismo de *splicing*, com conseqüente alteração da função de sítios específicos de *splice* (COOPER & MATTOX, 1997; CHAO *et al.*, 2001). Outros estudos sugerem que determinadas mutações silenciosas podem estar ligadas a diferentes polimorfismos, provavelmente alterando os níveis de expressão gênica (SALAZAR *et al.*, 1999).

Ao analisar as freqüências relativas de alelos para o polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ , verificou-se que a freqüência do alelo 161T (0,10) nos indivíduos do GE foi similar à observada no GC (0,07). Observou-se também que a distribuição dos genótipos foi similar entre GE e GC, obedecendo a lei de Hardy-Weinberg.

Comparando-se a freqüência do alelo 161T (0,10) com outras populações, verificou-se que foi semelhante à encontrada em caucasianos com DM2 da Alemanha (0,09) e em gêmeos da Dinamarca (0,09) (BLÜHER *et al.*, 2002; POULSEN *et al.*, 2003). Nos estudos com este polimorfismo, observa-se predominância do alelo 161C (MEIRHAEGHE *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999; BLÜHER *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2003; ARASHIRO *et al.*, 2003; POULSEN *et al.*, 2003), sugerindo maior freqüência do genótipo homozigoto CC, portanto, de acordo com os nossos estudos.

O polimorfismo 161C>T, exon 6, do gene PPAR $\gamma$ , foi inicialmente descrito por MEIRHAEGHE *et al.* (1998), demonstrando que caucasianos obesos franceses, portadores do alelo 161T, apresentavam maior concentração plasmática de leptina em comparação com os portadores do alelo 161C. Em oposição a este achado,

ARASHIRO *et al.* (2003) não encontraram esta associação quando estudaram crianças obesas no Japão.

Na análise da influência do polimorfismo 161C>T sobre os parâmetros bioquímicos, observou-se que no GE, os portadores do alelo 161T foram associados com reduzido índice aterogênico do plasma (AIP). Quando este grupo foi separado por sexo, mulheres portadoras do alelo 161T foram associadas a concentrações séricas diminuídas de TAG, VLDL-C e reduzido AIP. A associação do alelo 161T com TAG e VLDL-C é biologicamente provável, haja vista que o gene PPAR $\gamma$  desempenha função importante na diferenciação de adipócitos e resistência à insulina (DEEB *et al.*, 1998), porém, estes resultados diferem das pesquisas realizadas por BLÜHER *et al.* (2002) na Alemanha e por POULSEN *et al.* (2003) na Dinamarca, onde não encontraram associação do polimorfismo 161C>T e variáveis relacionadas ao metabolismo de lipídeos e DM2. As razões para estas divergências podem ser relacionadas a diferenças étnicas, modelos de estudo, efeitos do gênero, tamanho da amostra, interações do gene com o ambiente e IMC (DONEY *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual este polimorfismo influencia as concentrações séricas de TAG e VLDL-C não está elucidado. Este pode estar em desequilíbrio de ligação com outras alterações no gene do PPAR $\gamma$  ou em locos gênicos adjacentes, que tenha efeitos diretos sobre os valores de lipídeos circulantes (TAVARES *et al.*, 2004b). Também está claro que a extensão deste desequilíbrio pode ser variada em populações geográfica e etnicamente distintas e, como tal, os efeitos deste polimorfismo podem ser diversos nos diferentes grupos étnicos (DONEY *et al.*, 2002).

Nossos estudos também indicaram que mulheres portadoras do alelo 161T, no GE, estavam associadas com menor AIP. Segundo DOBIASOVA & FROHLICH

(2001), indivíduos com AIP aumentado tem maior risco para doença arterial coronariana (DAC), sendo este índice utilizado como um excelente marcador aterogênico plasmático em pacientes com DM2 (TAN *et al.*, 2004). Corroborando com este resultado, WANG *et al.* (1999) reportaram que em caucasianos australianos com DAC (incluindo pacientes com DM2) e controles, portadores do alelo 161T, apresentavam reduzida associação com DAC, concluindo que o gene PPAR $\gamma$  possa ter significativa função na aterogênese. Portanto, a forte associação entre o alelo 161T e índices reduzidos de AIP, no GE, fornece provável evidência de que o polimorfismo C161T do gene PPAR $\gamma$ , tenha efeitos na concentração de lipídeos, porém, por mecanismos ainda desconhecidos. É provável também, que neste caso, o polimorfismo C161T esteja em desequilíbrio de ligação com uma mutação funcional no gene PPAR $\gamma$ , que possivelmente tenha efeito direto no metabolismo de lipídeos. Estudos são necessários para esclarecer a função do polimorfismo C161T no metabolismo de TAG e risco para DAC.

Posteriormente foi analisado o efeito da associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$  sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos nos grupos estudados (GE e GC). Ao analisar as freqüências relativas para a associação dos polimorfismos, verificou-se que a freqüência dos haplótipos Pro-C (GE = 0,89; GC = 0,91) e Ala-T (GE = 0,07; GC = 0,03) foram similares em ambos os grupos. O mesmo ocorreu com a distribuição dos genótipos (GE e GC), obedecendo a lei de Hardy-Weinberg.

Comparando-se a freqüência do haplótipo Ala-T (0,07) com outra população, verificou-se que foi semelhante à encontrada em caucasianos com DM2 da Escócia (0,08) (DONEY *et al.*, 2002). Observou-se também predominância do haplótipo Pro-C neste estudo, confirmando-se os resultados individuais e da associação dos polimorfismos no presente estudo.

Os dados observados individualmente para cada polimorfismo foram confirmados ao analisar o efeito da associação dos dois polimorfismos, do gene PPAR $\gamma$ , sobre os dados clínicos e parâmetros bioquímicos (GE e GC) em relação ao metabolismo de lipídeos e carboidratos. Foi verificado que os indivíduos portadores do genótipo Pro/Ala-CC apresentaram valores inferiores de insulina e índice HOMA-IR e portadores do genótipo Pro/Pro-CT valores superiores de HDL-C em comparação aos outros genótipos no GE.

Alguns estudos também têm documentado o efeito da associação destes polimorfismos no metabolismo de lipídeos e carboidratos. VALVE *et al.* (1999) estudando indivíduos obesos na Finlândia, encontraram associação do genótipo Ala/Ala-TT com valores elevados de IMC em mulheres, porém, não encontrou associação dos genótipos com valores séricos elevados de glicose e insulina, apesar de severa obesidade. Os dois polimorfismos estavam em desequilíbrio de ligação, não sendo possível determinar isoladamente seus efeitos sobre os parâmetros clínicos e laboratoriais. Os autores concluíram que mecanismos desconhecidos poderiam estar modificando os efeitos destes polimorfismos no gene PPAR $\gamma$  em relação a adipogênese e que alterações na atividade e/ou estrutura deste gene *in vivo* poderia alterar outros fatores de transcrição e conseqüente expressão de diversos genes.

Nos estudos de DONEY *et al.* (2002) em caucasianos com DM2 e controles na Escócia, demonstraram que valores elevados de IMC estavam associados com o haplótipo Pro-T, enquanto o haplótipo Ala-C estava associado com valores reduzidos de IMC. A conclusão do referido estudo foi que a demonstração de interações opostas destes polimorfismos (IMC vs. Pro-T e IMC vs Ala-C) ajudam a explicar estudos anteriores inconsistentes em relação à associação do PPAR $\gamma$  com

peso corporal. Nenhum resultado foi apresentado pelos autores em relação aos parâmetros relacionados com DM2.

No presente estudo, apesar dos resultados individuais para cada polimorfismo (34C>G e 161C>T), em relação aos efeitos no metabolismo de lipídeos e carboidratos terem sido confirmados quando foram associados, deve-se ter cautela na interpretação dos mesmos, pois estão em desequilíbrio de ligação, portanto, os efeitos observados sobre os parâmetros analisados são resultantes do polimorfismo 34C>G ou 161C>T e os mecanismos pelos quais essas alterações afetam os valores de insulina, lipídeos sanguíneos, índices HOMA e AIP, ainda não foram esclarecidos. Possivelmente, essas variações são segregadas juntamente com uma mutação funcional, presente no gene PPAR $\gamma$  ou em locos gênicos adjacentes, que predispõe os indivíduos a desenvolverem alterações nestes parâmetros.

Portanto, o resultado do presente trabalho com indivíduos da população brasileira, contribuiu sobremaneira na avaliação e confirmação dos dados obtidos da literatura, sugerindo significativa associação entre o polimorfismo 34C>G do gene PPAR $\gamma$ 2 e sensibilidade à insulina em pacientes com DM2. Em relação ao polimorfismo 161C>T do gene PPAR $\gamma$ , seria importante estudos posteriores, com grupos maiores, para avaliar as associações encontradas. Também foi possível a otimização das técnicas da PCR, RFLP e PCR-SSCP, resultando em alta sensibilidade quer na amplificação dos fragmentos do gene PPAR $\gamma$ , genotipagem ou triagem de mutações.

Finalizando, mais pesquisas serão necessários para compreender a complexa relação dos mecanismos moleculares entre estes polimorfismos ou mutações e a função do PPAR $\gamma$  como um importante regulador no metabolismo de carboidratos, lipídeos e sensibilidade à insulina.

## 6. Conclusões

---

- A técnica da PCR-SSCP apresentou alta sensibilidade na detecção de polimorfismo ou mutação nas duas temperaturas avaliadas.
- As frequências dos alelos Ala12 e 161T para os polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$ , respectivamente, foram semelhantes nos grupos estudados.
- O efeito independente do polimorfismo 34C>G foi contribuir para a variabilidade da concentração plasmática, secreção e sensibilidade à insulina, nos pacientes com DM2.
- O efeito independente do polimorfismo 161C>T foi contribuir para a variabilidade na concentração plasmática de TAG, VLDL-C e índice AIP em mulheres com DM2.
- No estudo de associação dos polimorfismos 34C>G e 161C>T do gene PPAR $\gamma$ , os resultados obtidos individualmente, para cada polimorfismo, foram confirmados em relação ao metabolismo de lipídeos e carboidratos.

## 7. Referências bibliográficas\*

---

- AMRI, E.Z.; BONINO, F.; AILHAUD, G. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferators-activated receptors. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.2367-71, 1995.
- AGARWAL, A.K.; GARG, A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.408-11, 2002.
- AUWERX, J. PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. **Diabetologia**, v.42, p.1033-49, 1999.
- ALTSHULER, D.; HIRSCHHORN, J.N.; KLANNEMARK, M.; LINDGREN, C.M.; VOHL, M.C.; NEMESH, J. The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. **Nat. Genet.**, v.26, p.76-9, 2000.
- ALBITAR, M.; WU, W.I.; FELTZ, E.; JIN, G.; HIRSCH-GINSBERG, C.; KANTARJIAN, H.; BERAN, M. Simplified Reverse Dot Blot Analyses for Detecting of ras Oncogene Mutations. **Mol. Diagn.**, v.2, p.169-73, 1997.
- ANTONARAKIS, S.E. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. **Hum. Mutat.**, v.11, p.1-3, 1998.
- ARASHIRO, R.; KATSUREN, K.; FUKUYAMA, S.; OHTA, T. Effect of Trp64Arg mutation of the  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene and C161T substitution of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  gene on obesity in Japanese children. **Pediatr. Int.**, v.45, p.135-41, 2003.

---

\* De acordo com a norma NBR 6023/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1998.

- BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H.R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid Res.**, v.11, n.6, p.583-95, 1970.
- BONDAR, R.J.; MEAD, D.C. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from leuconostoc mesenteroides in the hexokinase method for determining glucose in serum. **Clin. Chem.**, v.20, p.586-90, 1974.
- BERGER, J.; BAILEY, P.; BISWAS, C. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferators-activated receptor- $\gamma$ : binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. **Endocrinology**, v.137, p.4189-95, 1996.
- BRANDT, J.M.; DJOUADI, F.; KELLY, D.P. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferators-activate receptor alpha. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.23786-92, 1998.
- BARAK, Y.; NELSON, M.C.; ONG, E.S. PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Mol. Cell.**, v.4, p.585-95, 1999.
- BARROSO, I.; GURNELL, M.; CROWLEY, V.E.F.; AGOSTINI, M.; SCHWABEL, J.W.; SOOS, M.A.; MASIEN, G.L.; WILLIAMS, T.D.M.; LEWIS, H.; SCHAFER, A.J.; CHATTERJEE, V.K.K.; O'RAHILLY, S. Dominant negative mutations in human PPAR-gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, v.402, p.880-3, 1999.
- 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- $\gamma$ 2 gene with obesity in two Caucasian populations. **Diabetes**, v.47, n.11, p.1806-8, 1998.

- BOEHM, M.; ZHANG, L.; ZHI, L.; McCLURG, M.; BERGER, E.; WAGONER, M.; MAIS, D.; SUTO, C.; DAVIES, J.; HEYMAN, R.; NADZAN, A.M. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. **J. Med. Chem.**, v.38, p.3146-55, 1995.
- BONORA, E.; SAGGIANI, F.; TARGHER, G.; ZENERE, M.B.; ALBERICHE, M.; MONAUNI, T. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v.23, p.57-63, 2000.
- BLÜHER, M.; KLEMM, T.; GERIKE, T.; KRANKENBERG, H.; SCHULER, G.; PASCHKE, R. Lack of association between peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -2 gene variants and the occurrence of coronary heart disease in patients with diabetes mellitus. **Eur. J. Endocrinol.**, v.146, p.545-551, 2002.
- BURANT, C.F.; SREENAN, S.; HIRANO, K.; TAI, T.A.; LOHMILLER, J.; LUKENS, J. Troglitazone action is independent of adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.2900-08, 1997.
- BERG, M.A.; GUEVARA-AGUIRRE, J.; ROSENBLOOM, A.L.; ROSENFELD, R.G.; FRANCKE, U. Mutation creating a new splice site in the growth hormone receptor genes of 37 Ecuadorian patients with Laron syndrome. **Hum. Mutat.**, v.1, p.24-34, 1992.
- CONSENSO brasileiro sobre diabetes: diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, 2001.
- CAVALLI, S.A.; OTTA, M.I.; HIRATA, R.D.C.; HUYEN, N.Y.; HIRATA, M.H. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normolipidemic individuals. **Clin. Chem.**, v.42, p.S298, 1996.

- CHAO, L.; MARCUS-SAMUELS, B.; MASON, M.M. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. **J. Clin. Invest.**, v.106, p.1221-8, 2000.
- COOPER, T.A.; MATTOX, W. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.61, p.259-66, 1997.
- CLEMENT, K.; HERCBERG, S.; PASSINGE, B.; GALAN, P.; VARROUD-VIAL, M.; SHULDINER, A.R.; BEAMER, B.A.; CHARPENTIER, G.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P.; VAISSE, C. The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR $\gamma$  gene mutations in obesity and type 2 diabetes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.24, n.3, p.391-3, 2000.
- COTTON, R.; HORAITIS, O. Quality control in the discovery, reporting, and recording of genomic variation. **Human Mutat.**, v.15, p.16-21, 2000.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J.**, v.10, p.940-54, 1996.
- CARAMORI, M.L.; CANANI, L.H.; COSTA, L.A.; GROSS, J.L. The human peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.52, p.3010-13, 2003.
- DIRENZO, J.; SODERSTROM, M.; KUROKAWA, R.; OGLIASTRO, M.H.; RICOTE, M.; INGREY, S.; HORLEIN, A.; ROSENFELD, M.G.; GLASS, C.K. Peroxisome proliferators-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid x receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, p.2166-76, 1997.
- DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v.68, p.879-87, 1992.

- DOBIASOVA, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log(TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER<sub>HDL</sub>). **Clin. Biochem.**, v.34, p.583-8, 2001.
- DEEB, S.S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMAKI, J.; MYKKANEN, L.; KUUSISTO, J.; LAAKSO, M.; AUWERX, J. A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nat. Genet.**, v.20, p.284-7, 1998.
- DUBOIS, M.; PATTOU, F.; KERR-CONTE, J. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] (PPAR[gamma]) in normal human pancreatic islet cells. **Diabetologia**, v.43, p.1165-9, 2000.
- DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr. Rev.**, v.20, n.5, p.649-85, 1999.
- DONEY, A.; FISCHER, B.; FREW, D.; CUMMING, A.; FLAVELL, D.M.; WORLD, M.; MONTGOMERY, H.E.; BOYLE, D.; MORRIS, A.; PALMER C.N.A. Haplotype analysis of the PPAR $\gamma$  Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. **BMC Genetics**, v.3, p.1-8, 2002.
- DIAMANT, M.; HEINE, R.J. Thiazolidinediones in Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v.63, n.13, p.1373-1405, 2003.
- EVANS, D.; MANN, W.A.; DE HEER, J.; MICHEL, U.; WENDT, D. ; KORTNER, B. Variation in the gene for human peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not play a major role in the development of morbid obesity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.24, p.647-51, 2000.
- EK, J.; ANDERSEN, G.; URHAMMER, S.A.; HANSE, L.; CARSTENSEN, B.; BORCH, J.K. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. **Diabetologia**, v.44, p.1170-6, 2001.
-

- FOSSATI, P.; MEDICCI, R. Abstract Book. **International Symposium on Cholesterol Control and Cardiovascular Disease: Prevention and Therapy.** Milan, Italy, 1987. Apud: Bayer Corporation, Diagnostic Division, Tarrytown, N.Y., Cholesterol-Fast color [Bula].
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v.18, p.499-502, 1972.
- FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v.28, p.2077-80, 1982.
- FAJAS, L.; FRUCHART, J.C.; AUWERX, J. PPAR $\gamma$ 3 RNA mensageiro: a distinct PPAR $\gamma$  RNA mensageiro subtype transcribed from an independent promoter. **Febs Letts**, v.438, p.55-60, 1998.
- FAJAS, L.; AUBOEUF, D.; RASPE, E. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.18779-89, 1997.
- GREENE, M.F.; BLUMBERG, B.; McBRIDE, O.W.; YI, A.F.; KRONQUIST, K.; KWAN, K.; HSIEH, L.; NIMER, S.D. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cell, and chromosomal mapping. **Gene Expr.**, v.4, p.281-99, 1995.
- GEARING, K.L.; GÖTTLICHER, M.; TEBOUL, M.; WIDMARK, E.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.1440-4, 1993.
- GURNELL, M. PPAR $\gamma$  and metabolism: insights from the study of human genetic variants. **Clin. Endocrinol.**, v.59, p.267-77, 2003.
-

- GOLDSMITH, M.E.; HUMPHRIES, R.E.; LEY, T.; CLINE, A.; KANTOR, J.A.; NIENHUIS, A.W. Silent nucleotide substitution in a  $\beta^+$ -thalassemia globin gene activates splice site in coding sequence RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.80, p.2318-22, 1983.
- HARRIS, P.K.; KLETZIEN, R.F. Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. **Mol. Pharmacol.**, v.45, p.439-45, 1994.
- HARA, K.; OKADA, T.; TOBE, K.; YASUDA, K.; MORI, Y.; KADOWAKI, H.; HAGURA, R.; AKANUMA, Y.; KIMURA, S.; ITO, C.; KADOWAKI, T. The Pro12Ala polymorphism in PPAR $\gamma$ 2 may confer resistance to type 2 diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 271, p.212-6, 2000.
- HASSTEDT, S.J.; REN, Q.F.; TENG, K.; ELBEIN, S.C. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-[gamma]2 Pro12Ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindred's. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.536-41, 2001.
- HEGELE, R.A.; HENIAN, C.; FRANKOWSKI, C.; MATHEWS, S.T.; LEFF, T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. **Diabetes**, v.51, p.3586-90, 2002.
- HAYASHI, K. A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Appl.**, v.1, p.34-8, 1992.
- HAYASHI, K.; YANDELL, D.W. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum. Mutat.**, v.2, p.338-46, 1993.
- HUMPHRIES, S.E.; GUDNASON, V. Single-strand conformational polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. **Clin. Chem.**, v.43, p.427-35, 1997.

- HORIKAWA, Y.; IWASAKI, N.; HARA, M.; FURUTA, H.; HINOKIO, Y. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. **Nat. Genet.**, v.17, p.384-5, 1997.
- ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v.347, p.645-9, 1990.
- KIM, B.J.; KIM, S.Y.; PARK, B.H.; LIU, M.A.; PARK, I.K.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-Single Strand Conformational Polymorphism Analysis for Rifampin susceptibility Testing. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.492-4, 1997.
- KOCH, M.; RETT, K.; MAEKER, E.; VOLK, A.; HAIST, K.; DENINGER, M.; RENN, W.; HÄRING, HU. The PPAR $\gamma$ 2 amino acid polymorphism Pro12Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. **Diabetologia**, v.42, p.758-62, 1999.
- KAO, W.H.L.; CORESH, J.; SHULDINER, A.R.; BOERWINKLE, E.; BRAY, M.S.; BRANCTI, F.L. Pro12Ala of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ 2 gene is associated with lower serum insulin levels in nonobese African Americans. **Diabetes**, v.52, p.1568-72, 2003.
- LAHIRI, D.; NUNBERGER, J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.19, p.5444, 1991.
- LAUDET, V.; HANNI, C.; COLL, J. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J.**, v.11, p.1003-13, 1992.
- LUAN, J.; BROWNE, P.O.; HARDING, A.H.; HALSALL, D.K.; O'RAHILLY, S.; CHATTERJEE, V.K.K. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR $\gamma$  locus. **Diabetes**, v.50, p.686-9, 2001.
-

- LI, X.; PARK, W.J.; PYERITZ, R.E.; JABS, E.W. Effect on splicing of a silent FGFR2 mutation in Crouzon syndrome. **Nat. Genet.**, v.9, p.232-33, 1995.
- MANGELSDORF, D.J.; BORGMEYER, U.; HEYMAN, R.A. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. **Genes Dev.**, v.6, p.329-44, 1992.
- MUKHERJEE, R.; DAVIES, P.J.A.; CROMBIE, D.L. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. **Nature**, v.386, p.407-10, 1997.
- MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, D.F.; TURNER, D.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, p.412-9, 1985.
- MARCUS, S.L.; MIYATA, K.S.; ZHANG, B. Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferators-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-Coa oxidase genes but differentially induce expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.5723-7, 1993.
- MANCINI, F.P.; VACCARO, O.; SABATINO, L.; TUFANO, A.; RIVELLESE, A.A.; RICCARDI, G.; COLANTUONI, V. Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-  $\gamma$ 2 is not associated with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, p.1466-8, 1999.
- MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AUWERX, J.; DEEB, S.S.; AMOUYEL, P. Impact of the peroxisome proliferator activated receptor-  $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.24, n.2, p.195-9, 2000.
- MCKECHNIE, V.M.; MCCRUDEN, A.B. Optimization and sensitivity of single-stranded conformation polymorphism for the detection of hepatitis C virus quasi-species. **J. Virol. Methods**, v. 92, p.131-9, 2001.

- MANGELSDORF, D.J.; EVANS, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v.83, p.841-50, 1995.
- MORI, H.; IKEGAMI, H.; KAWAGUCHI, Y. The Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$  is associated with resistance to development of diabetes in the general population. **Diabetes**, v.50, p.891-4, 2001.
- MALECKI, M.T.; JHALA, U.S.; ANTONELLIS, A.; FIELDS, L.; DORIA, A. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. **Nat. Genet.**, v.23, p.323-8, 1999.
- MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; LEBEL, P.; DALLONGEVILLE, J.; DEEB, S.; AUWERX, J.; AMOUYEL, P. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferators-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum. Mol. Genet.**, v.7, n.3, p.435-40, 1998.
- MASUD, S.; YE, S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. **J. Med. Genet.**, v.40, p.773-80, 2003.
- NICKLAS, B.J.; VAN ROSSUM, E.F.; BERMAN, D.M.; RYAN, A.S.; DENNIS, K.E.; SHULDINER, A.R. Genetic variation in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain. **Diabetes**, v.50, p.2172-6, 2001.
- ORITA, M.Y.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction **Genomics**, v.5, p.874-9, 1989.

- POULSEN, P.; ANDERSEN, G.; FENGER, M.; HANSEN, T.; ECHWALD, S.M.; VOLUND, A.; BECK-NIELSEN, H.; PEDERSEN, O.; VAAG, A. Impact of two common polymorphisms in the PPAR- $\gamma$  gene on glucose tolerance and plasma insulin profiles in monozygotic and dizygotic twins: thrifty genotype, thrifty phenotype, or both? **Diabetes**, v.52, p.194-8, 2003.
- REN, D.; COLLINGWOOD, T.N.; REBAR, E.J.; WOLFE, A.P.; CAMP, H.S. PPAR $\gamma$  knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR $\gamma$ 2 but not PPAR $\gamma$ 1 reactivates adipogenesis. **Gene Deve.**, v.16, p.27-32, 2002.
- RINGEL, J.; ENGELI, S.; DISTLER, A.; SHARMA, A.M. Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and diabetes mellitus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.254, p.450-3, 1999.
- RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N.; NEWSHOLME, E.A. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, p.785-9, 1991.
- RISTOW, M.; MULLER-WIELAND, D.; PFEIFFER, A.; KRONE, W.; KAHN, C.R. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. **N. Engl. J. Med.**, v.339, p.953-9, 1998.
- SANTOS, R.D.; MARANHÃO, R.C.; LUZ, P.L.; LIMA, J.C.; FILHO, W.S.; AVEZUM, A.; DUNCAN, B.; LOURES-VALE, A.; SANTOS, J.E.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; FONSECA, F.I. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v.77 n.3, p.4-48, 2001.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; MACHADO, M.O.; CAVALLI, S.A.; GUZMAN, E.C.; HGUYEN, N.Y.; HIRATA, R.D.C. Extração de DNA de coágulo sanguíneo humano como método alternativo para estudos de genotipagem. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.9, p.151-4, 1997.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.E10-E14.
- SÁNCHEZ, J.L.G.; RÍOS, M.S.; PÉREZ, C.F.; LAAKSO, M.; LARRAD, M.T.M. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. **Eur. J. Endocrinol.**, v.147, p.495-501, 2002.
- SHER, T.; YI H.; McBRIDE, O.W.; GONZALEZ, F.J. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferators activated receptor. **Biochemistry**, v.32, p.5598-604, 1993.
- STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A. Activation of human aortic smooth muscle cells is inhibited by PPAR $\alpha$  but not by PPAR $\gamma$  activators. **Nature**, v.393, p.790-3, 1998.
- SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in the C promoter. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.19269-76, 1995.
- SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **J. Lipid Res.**, v.37, p.907-25, 1996.
- SFEIR, Z.; IBRAHIMI, A.; AMRI, E. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids**, v.57, p.17-21, 1997.
- STEPPAN, C.M.; BAILEY, S.T.; BHAT, S. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v.409, p.307-12, 2001.
-

- SHEFFIELD, V.C.; BECK, J.S.; KWITEK, A.E.; SANDSTROM, D.W.; STONE, E.M.  
The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, v.16, p.325-32, 1993.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Increasing the sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis of the LDLR gene mutations in Brazilian patients with familial hypercholesterolemia. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.40, p.441-5, 2002.
- SHI, M.M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. **Clin. Chem.**, v.47, p.164-72, 2001.
- STUMVOLL, M.; HARING, H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. **Diabetes**, v.51, p.2341-7, 2002.
- SARKAR, G.; YOON, H.S.; SOMMER, S.S. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphisms (rSSCP): Comparison with DNA-SSCP. **Nucleic Acids Res.**, v.20, p.871-8, 1992.
- SAVOV, A.; ANGELICHEVA, D.; JORDANOVA, A.; EIGEL, A.; KALAYDIJIEVA, L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. **Nucleic Acids Res.**, v.20, p.6741-2, 1992.
- STEFAN, N.; FRITSCH, A.; HÄRING, H.; STUMBOLL, M. Effect of experimental elevation of free fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity in healthy carriers of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-[gamma]2 gene. **Diabetes**, v.50, p.1143-8, 2001.
- SAVAGE, D.B.; AGOSTINI, M.; BARROSO, I.; GURNELL, N.; LUAN, J. Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. **Nat. Genet.**, v.31, p.379-84, 2002.

STOFFERS, D.A.; FERRER, J.; CLARKE, W.L.; HABENER, J.F. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. **Nat. Genet.**, v.17, p.138-9, 1997.

SONG, J.; SAKATSUME, M.; NARITA, I.; GOTO, S.; OMORI, K.; TAKADA, T.; SAITO, N.; UENO, M.; GEJYO, F. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  C161T polymorphisms and survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. **Clin. Genet.**, v.64, p.398-403, 2003.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; GIANNINI, S.D.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; ISSA, J.S.; HIRATA, R.D.C. Effects of Ava II and Hinc II Polymorphisms at the LDL Receptor Gene on Serum Lipid Levels of Brazilian Individuals With High Risk for Coronary Heart Disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.13, p.251-8, 1999.

THORPE, K.L.; SCHAFER, A.J.; GENIN, E.; TROWSDALE, J.; BECK, S. Detection of polymorphism in the RING3 gene by high-throughput fluorescent SSCP analysis. **Immunogenetics**, v.49, p.256-65, 1999.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid activated transcription factor. **Cell**, v.79, p.1147-56, 1994.

TESCHAUER, W.; MUSSACK, T.; BRAUN, A.; FINK, E. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v.34, p.125-31, 1996.

- TAN, M.H.; JOHNS, D.; GLAZER, N.B. Pioglitazone reduces Atherogenic Index of Plasma in patients with Type 2 Diabetes. *Clinical Chemistry*, v.50, p.1184-88, 2004.
- TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C.; RODRIGUES, A.C.; MONTE, O.; SALLES, J.E.N.; SCALLISSI, N.; SPERANZA, A.C.; HIRATA, M.H. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR- $\gamma$ 2 gene and insulin sensitivity in Brazilian Patients with type 2 diabetes mellitus. ***Diabetes, Obesity and Metabolism***, 2004a.
- TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C.; RODRIGUES, A.C.; MONTE, O.; SALLES, J.E.N.; SCALLISSI, N.; SPERANZA, A.C.; GOMES, S.; HIRATA, MH. Effect of the Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  C161T polymorphism on lipid profile in Brazilian Patients with type 2 diabetes mellitus. ***Journal of Endocrinological Investigation***, 2004b.
- VALVE, R.; SIVENIUS, K.; MIETTINEN, R.; PIHLAJAMIAKI, J.; RISSANEN, A.; DEEB, S.S. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene are associated with severe overweight among obese women. ***J. Clin. Endocrinol. Metab.***, v.84, p.3708-12, 1999.
- VIONNET, N.; STOFFEL, M.; TAKEDA, J.; YASUDA, K.; BELL, G.I. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset noninsulin-dependent diabetes mellitus. ***Nature***, v.356, p.721-2, 1992.
- XU, L.; GLASS, C.K.; ROSENFELD, M.G. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. ***Curr. Opin. Genet. Dev.***, v.9, p.140-7, 1999.
- WERMAN, A.; HOLLENBERT, A.; SOLANES, G. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferators-activated receptor gamma. Differential activity of PPAR $\gamma$ 1 and 2 isoforms and influence of insulin. ***J. Biol. Chem.***, v.272, p.20230-5, 1997.

- WAHLI, W.; BRAISSANT, O.; DESVERGNE, B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. **Chem. Biol.**, v.2, p.261-6, 1995.
- WILLSON, T.M.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; HENKE, B.R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J. Med. Chem.**, v.43, p.527-50, 2000.
- WANG, X.L.; OOSTERHOF, J.; DUARTE, N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161-T polymorphism and coronary artery disease. **Cardiovasc. Res.**, v.44, p.588-94, 1999.
- YOSHIKAWA, T.; BRKANAC, Z.; DUPONT, B.R. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPAR $\beta$ ), to chromosome 6p21.1-p21.2. **Genomics**, v.35, p.637-8, 1996.
- YEN, C.J.; BEAMER, B.A.; NEGRI, C.; SILVER, K.; BROWN, K.A.; YAMALL, D.P.; ROTH, J.; SHULDINER, A.R. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 missense mutation. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v.241, p.270-4, 1997.
- YAMAGATA, K.; FURUTA, H.; ODA, N.; KAISAKI, P.J.; MENZEL, S. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). **Nature**, v.384, p.458-60, 1996.
- YAMAGATA, K.; ODA, N.; KAISAKI, P.J.; MENZEL, S.; FURUTA, H. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). **Nature**, v.384, p.455-8, 1996b.
- ZHANG, B.; MARCUS, S.L.; MIYATA, K.S. Characterization of protein-DNA interactions within the peroxisome proliferator-responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.12939-45, 1993.
-