

PADRONIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS PARA PREDISPOSIÇÃO DE OBESIDADE E SUAS COMORBIDADES

AMANDA BARBOSA ATRIB¹; CLÉDIA FLORES DA SILVA²; ALICE KUNZGEN SCHEER³; NELSON IAHNKE⁴; CARLOS CASTILHO DE BARROS⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – amanda_b_atrib@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – clediajag@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alicekunzgen@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – niahnke@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – barroscpел@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é amplamente definida como o excesso de peso corporal para uma determinada altura. É uma preocupação de saúde global, pois está relacionada ao aumento do risco de várias doenças crônicas não transmissíveis como diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (GADDE et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 650 milhões de adultos em todo o mundo são considerados obesos (KHODARAHMI et al., 2020).

A obesidade é considerada uma doença complexa envolvendo vários fatores como ambiental, comportamental e genético. Muitos genes associados à obesidade estão envolvidos na regulação da ingestão de energia, metabolismo lipídico, adipogênese, termogênese, síntese de adipocitocinas e fatores de transcrição. (CROVESY et al., 2019).

O fenótipo da obesidade vem aumentando nas últimas décadas e acredita-se que as causas para este distúrbio complexo estejam relacionadas com um desequilíbrio entre a ingestão de energia e o gasto energético devido a mudanças nos estilos de vida, incluindo a exposição a um ambiente não favorável (ALBUQUERQUE et al., 2014).

A análise do genoma humano vem sugerindo que variações estruturais também podem desempenhar papéis importantes na variação fenotípica entre os seres humanos, podendo estar ligada ao desenvolvimento de doenças, predisposições genéticas e até mesmo ao modo como respondemos a determinados medicamentos. Futuramente, testes específicos poderão fornecer previsões exatas sobre a resposta de um indivíduo a uma determinada dieta (PEREIRA FILHO et al., 2021).

Um gene que vem sendo bastante estudado em relação à obesidade e suas comorbidades é a Apolipoproteína A2. Ela é a segunda apolipoproteína mais comum no HDL humano e foi considerada de grande importância fisiológica no metabolismo das lipoproteínas. Um estudo anterior relatou que a deficiência de APOA2 tem uma influência menor nos perfis de lipídios e lipoproteínas ou na ocorrência de doença cardíaca coronária em humanos (TAILLEUX, et al. 2002).

Portanto, o objetivo deste estudo foi padronizar em um laboratório com poucos recursos uma ferramenta biotecnológica simples, eficiente, com baixo custo e de fácil aplicação para genotipagem por tetra-primers ARMS-PCR para polimorfismos genéticos ligados à obesidade e suas comorbidades.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de material biológico

Para coleta de material biológico, foi utilizada raspagem de células das bochechas com “Swab” de voluntários conhecidos, pois a coleta foi repetida mais de uma vez. As amostras foram mantidas em gelo até o armazenado em freezer a temperatura de -20°C (MARTINEZ et. al, 2018).

2.2 Extração DNA genômico

Para extração do DNA genômico o Swab foi colocado em micro tubo estéril de 1,5 ml com 600 µl do tampão de lise e 20 µl de proteinase K (20mg/ml). Após vórtex, as amostras foram incubadas a 55°C overnight. Foi então realizado o resfriamento em gelo, e inversão da posição dos “Swabs” e uma rápida centrifugação para a retirada do líquido preso ao algodão do “Swab”. Foram adicionados 200 µl de Solução de Precipitação de proteínas (60 ml de Acetato de Potássio 5M; 11,5 ml de Ácido Acético; 28,5 de água destilada), após as amostras foram incubadas em gelo por 3 minutos. Após resfriamento e centrifugação a 13500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 ml com 600 µl de isopropanol e homogeneizado para incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. O DNA foi precipitado a 13500 por 10 minutos e lavado com etanol 70% (600 µl). Após secagem a temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuscitado em 50 µl de tampão T.E.

2.3 Obtenção da sequência periférica ao polimorfismo com marcações de SNPs, regiões repetitivas, exons e introns

A ferramenta BLAT disponibilizada pela Santa Cruz University of California Genomics Institute, foi utilizada afim de verificar a sequência de 1000 pares de bases no entorno do polimorfismo estudado. O objetivo foi identificar possíveis locais dentro desta sequência para confecção dos “primers”.

2.4 Desenho de prováveis sequências de iniciação

Com a sequência identificada, foi utilizada outra ferramenta online chamada “OligoPerfect Primer Designer” disponibilizada pela ThermoFisher e desta forma foram escolhidos “primers” específicos para cada sequência de cada polimorfismo genético.

2.5 Verificação do viés intrínsecos das sequências escolhidas

Após a escolha dos “primers”, foi utilizado o programa GeneRunner para confirmação dos “primers” escolhidos e verificação da temperatura de anelamento. Foram escolhidas apenas sequências que possuíam baixa chance de formação destes comportamentos dos oligonucleotídeos.

2.6 Confirmação dos resultados obtidos

A confirmação foi feita por sequenciamento usando o método de Sanger. Para isso, os “primers” externos e os “amplicons” das PCRs foram enviados para confirmação de sequenciamento em laboratórios comerciais.

2.7 Técnica tetra-primer ARMS-PCR

A técnica utilizada para padronização das reações consiste em um método simples e econômico de genotipagem de SNPs envolvendo uma única reação de PCR seguida por eletroforese em gel. Esta técnica adota certos princípios do método de PCR tetra-primer e o sistema de mutação refratária de amplificação (YE et al., 2001).

2.8 Iniciadores oligonucleotídicos

Para a utilização da técnica tetra-primer ARMS-PCR foram criados quatro “primers” específicos para cada SNP. A ligação dos “primers” durante a reação deve gerar três “amplicons” de tamanhos distintos podendo então ser identificados os alelos específicos por eletroforese em gel.

2.9 Design de “primers”

Foram projetados os “primers” para cada reação de forma individual, mas buscando compatibilidade nas temperaturas de anelamento. Uma sequência de 1000 pares de bases no entorno de cada SNP foi analisada a fim de selecionar as melhores posições para cada primer específico. Estes “primers” foram então testados no programa GeneRunner e seus tamanhos aumentados em número de

bases buscando uma temperatura de anelamento similar para todos os “primers”. Após o design dos “primers” iniciaram-se os testes de genotipagem utilizando o tetra-primer ARMS-PCR. Nessa fase foram testadas as quantidades de reagentes, tempo de anelamento, temperatura correta para que cada fase da amplificação ocorra de forma eficiente e interação entre os “primers” para obtenção das bandas em tamanhos corretos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados testes de quatro SNPs na mesma temperatura de anelamento, a fim de buscar a simultaneidade das reações tornando o diagnóstico rápido e menos oneroso. No entanto, não foi possível realizar todas as reações de forma simultânea com sucesso então elas foram padronizadas de forma individual. O teste individual de cada SNP em reações separadas, a fim de modificar as concentrações dos reagentes ou dos “primers” e padronizar as reações foi realizado. Foram iniciados os testes dos “primers” do Gene APOA2, polimorfismo rs3813627, diversos testes foram feitos, mudando a concentração dos primers até se obter o resultado desejado.

APOA2 rs3813627

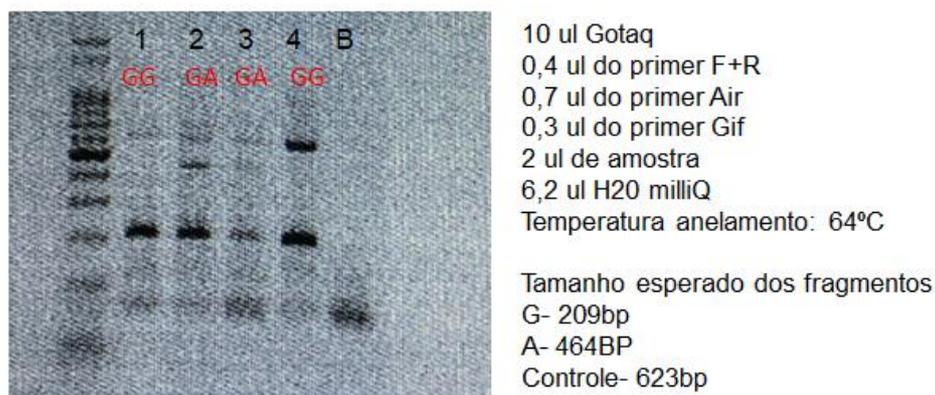


Figura 1. PCR APOA2 (rs3813627) temperatura de anelamento a 64°C “primers” R+F+Air+Gif. Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb dna ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 4 amostras mais o branco (amostra sem DNA). As amostras 1 e 4 foram formadas as bandas de 209 bp (alelo G) e a banda controle de 623 bp (genótipo GC). Nas amostras 2 e 3 foram formadas as bandas de 464 pb (alelo A) e a banda controle de 623 bp (genótipo GC). Os diagnóstico de cada amostra, estão em vermelho na imagem a cima.

Neste estudo, após a realização de várias tentativas de padronização do polimorfismo desejado, por meio de reações de PCRs contendo o polimorfismos de nucleotídeo único rs3813627 do gene APOA2, foram obtidos resultados satisfatórios gerando assim a possibilidade de proteção do método junto ao INPI. Para que possamos demonstrar o sucesso da padronização do processo de genotipagem e o correto funcionamento dos “primers” devemos ter pelo menos uma das amostras com cada alelo para cada SNP. Após os resultados positivos foram encaminhados para registro de patente, a fim de garantir o direito intelectual e único dos protocolos padronizados, como se sucedeu nas reações de genotipagem dos SNPs rs3813627.

A utilização de perfil poligênico que consegue fazer o diagnóstico de diversos genes, e vem sendo cada vez mais explorado atualmente por pesquisadores. Essa técnica pode ser empregada para buscar genes relacionados a diversas doenças, como por exemplo, obesidade e suas comorbidades.

Foi encontrado que o polimorfismo APOA2 rs3813627 pode influenciar nos níveis de HDL, levantando a hipótese de que o risco genotípico desse polimorfismo poderia estar associado a variáveis antropométricas, metabolismo da glicose e características lipídicas. Em humanos, este polimorfismo do gene APOA2 foi associado ao acúmulo de gordura visceral e ao metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. O seu homocigoto foi associado a baixos níveis de HDL nos indivíduos com sobrepeso/obesidade.

Ainda será feita a testagem e padronização de outros genes e polimorfismos citados na revisão bibliográfica, que renderão mais patentes e no final será desenvolvido o kit diagnóstico para identificação desses polimorfismos de forma eficiente e de baixo custo para a comercialização.

4. CONCLUSÕES

O polimorfismo padronizado neste trabalho se mostrou bastante promissor para a montagem do kit diagnóstico para identificação de obesidade e suas comorbidades. Podendo ser utilizados para buscas de perfil genético de indivíduos, identificando as informações genéticas para buscar os fenótipos ligados à obesidade e assim contribuir para um melhor tratamento dos mesmos, oferecendo um tratamento mais individualizado para cada paciente e contribuindo para a melhora da qualidade de vida. Este trabalho também rendeu uma patente dos polimorfismos rs3813627 dos gene APOA2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GADDE, K. M., MARTIN, C. K., BERTHOUD, H. R., HEYMSFIELD, S.B. Obesity pathophysiology and Management. *Journal of the American College of Cardiology* 2018; 71: (1):69-84.
- KHODARAHMI, M., KAHROBA, H., JAFARABADI, M. A., MESGARI- ABBASI, M., FARHANGI, M. A. Dietary quality indices modifies the effects of melanocortin-4 receptor (MC4R) rs17782313 polymorphism on cardio-metabolic risk factors and hypothalamic hormones in obese adults. *BMC Cardiovascular Disorders* 2020; 20:(57): 1-10.
- CROVESY, L., ROSADO, E. L. Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity. *Nutrition* 2019: 1-5.
- ALBUQUERQUE, D., NÓBREGA, C., LÓPEZ, R. R., MANCO, L. Association study of common polymorphisms in MSRA, TFAP2B, MC4R, NRXN3, PPARGC1A, TMEM18, SEC16B, HOXB5 and OLFM4 genes with obesity-related traits among Portuguese children. *Journal of Human Genetics* (2014) 59, 307–313.
- PEREIRA FILHO, B., MASSAMBANI, E. M., DIEGUES, M. E. M., ABRÃO, R. M., CORRÊA, N. A. B., GASQUES, L. S. A ação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPS) sobre o gene FTO, sua relevância e influência na obesidade: levantamento cienciométrico. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, Umuarama*, v. 25, n. 1, p. 61-77, jan./abr. 2021.
- TAILLEUX, A.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J. C.; CLAVEY, V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 164 (2002) 1 – 13.
- MARTINEZ, G. G., SANTOS, A. L. F., OLIVEIRA, C. Q. P., MORAES, T. I. (2018). Estocagem de dna a temperaturas variadas: análise da concentração. *Revista Saúde em Foco*. v.10.
- YE, S., DHILLON, S., KE, X., COLLINS, A. R., DAY, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. n.29; v.17.