

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia



Tese de Doutorado

**PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO PARA PREDISPOSIÇÃO À
OBESIDADE E SUAS COMORBIDADES**

Amanda Barbosa Atrib

Orientador: Dr. Carlos Castilho de Barros

Coorientador: Dr^a. Ines Schadock

Pelotas, 2025

**Padronização de reações de genotipagem para kit de diagnóstico para
predisposição de obesidade e suas comorbidades**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências (área de
Conhecimento: Ciências da Saúde).

Orientador: Carlos Castilho de Barros

Coorientador(es): Ines Schadock

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

A879p Atrib, Amanda Barbosa

Padronização de reações de genotipagem para kit de diagnóstico para predisposição de obesidade e suas comorbidades [recurso eletrônico] / Amanda Barbosa Atrib ; Carlos Castilho de Barros, orientador ; Ines Schadock, coorientadora. — Pelotas, 2025.
77 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Polimorfismo. 2. Síndrome metabólica. 3. Obesidade. 4. Genética. 5. Diabetes. I. Barros, Carlos Castilho de, orient. II. Schadock, Ines, coorient. III. Título.

CDD 616.398

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros

Prof. Dr^a. Ines Schadock

Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

Prof. Dr. Augusto Schneider

Prof. Dr^a. Simone Pieniz (suplente)

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros, por aceitar me orientar nesta jornada de doutorado. Agradeço por sua disponibilidade constante, por sempre estar ao meu lado, esclarecendo dúvidas e compartilhando novos conhecimentos que enriqueceram o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço também às minhas colegas de laboratório, Clédia Flores da Silva e Alice Künzgen Scheer, pelo apoio e colaboração incondicional ao longo desses anos, e a todos os membros do laboratório de Nutriflogênômica. Minha sincera gratidão aos professores e funcionários do PPG em Biotecnologia e do PPG em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, que, com seus ensinamentos e experiências compartilhadas, foram fundamentais para minha formação e para o fortalecimento da minha paixão pela ciência e pela tecnologia. Sou igualmente grata a CAPES pela bolsa de estudos, essencial para o desenvolvimento da pesquisa e para a minha permanência no programa. Agradeço de coração às minhas amigas e colegas, Taiciane Gonçalves e Thayane Blumberg, pelo apoio e pela ajuda ao longo do doutorado, e à minha família, pelo incentivo, paciência e amor constantes em todas as etapas da minha trajetória acadêmica. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Lista de figuras

Figura 1. Apresentação esquemática do método ARMS-PCR tetra-primer	16
Figura 2. PCR APOA2 (rs3813627) temperatura anelamento 62°C	39
Figura 3. PCR APOA2 (rs3813627) temperatura anelamento 64°C	40
Figura 4. PCR APOA2 (rs3813627) temperatura anelamento 62°C	40
Figura 5. PCR MC4R (rs11872992) temperatura anelamento 54°C	41
Figura 6. PCR MC4R (rs11872992) temperatura anelamento 56°C	42
Figura 7. PCR MC4R (rs11872992) temperatura anelamento 60-56°C	42
Figura 8. PCR MC4R (rs11872992) temperatura anelamento 60-56°C	42
Figura 9. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura anelamento 60°C	44
Figura 10. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura anelamento 62°C	44
Figura 11. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura anelamento 64°C	45
Figura 12. PCR CYBA (rs4673) temperatura anelamento 62°C	46
Figura 13. PCR CYBA (rs4673) temperatura anelamento 64°C	47
Figura 14. PCR CYBA (rs4673) temperatura anelamento 66°C	47
Figura 15. PCR CYBA (rs4673) temperatura anelamento 68°C	48

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Revisão Bibliográfica	13
2.3 Técnica tetra-primer ARMS-PCR	15
3. Objetivos.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. Metodologia.....	20
4.1 Genotipagem.....	20
4.1.1 Coleta de material biológico	20
4.1.2 Extração DNA genômico	20
4.2 Desenvolvimento dos “primers” para cada SNP	21
4.2.1 Verificação se o polimorfismo poderia ser ajustado para diagnóstico com ARMS–PCR	21
4.2.2 Obtenção da sequência periférica ao polimorfismo com marcações de SNPs, regiões repetitivas, exons e introns	21
4.2.3 Desenho de prováveis sequências de iniciação.....	21
4.2.4 Verificação do viés intrínsecos das sequências escolhidas	22
4.2.5 Verificação de especificidade das sequências escolhidas	22
4.2.6 Confirmação dos resultados obtidos	22
4.2.7 Iniciadores oligonucleotídicos.....	22
5. Resultados.....	23
5.1.1 Receptor de melanocortina-4 (MC4R).....	23
5.1.2 Estudos com MC4R rs17782313	24
5.1.3 Estudos com MC4R rs12970134	25
5.1.4 Estudos com MC4R rs11872992	26
5.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	27

5.2.1 Estudos com BDNF rs6265	28
5.2.2 Estudos com BDNF rs925946.....	29
5.3 Apolipoproteína	29
5.4 Leptina Gene (LEP).....	30
5.5 Peptídeo de Adropina expresso por associação de homeostase energética (ENHO).....	31
5.6 Apelina (APLN)	32
5.6.1 Estudos com Apelina rs2235306.....	33
5.7 Interleucina-6 (IL-6).....	33
5.8.1 Estudos com NLRP3 rs35829419	35
5.9 Cadeia leve do citocromo neutrófilo humano (CYBA).....	36
5.9.1 Estudos com CYBA rs4673	36
5.10 Receptor de Melatonina 1B (MTNR1B)	37
5.10.1 Estudos com MTNR1B rs10830963	38
5.12 Testes de padronização das reações.....	38
6. Discussão	49
7. Conclusão.....	52
8. Referências.....	53
9. Anexos.	60

Resumo

A obesidade é um grave problema de saúde pública, associado a diversas doenças, como diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doenças cardíacas, entre outras. Embora seja influenciada por fatores ambientais e socioculturais, a predisposição genética desempenha um papel significativo no seu desenvolvimento. Com o avanço das técnicas de genotipagem, tornou-se possível realizar investigações genéticas abrangentes, que fornecem milhões de resultados com menor custo. No entanto, apenas uma pequena fração desses polimorfismos é relevante para o diagnóstico genético da predisposição a doenças associadas à obesidade, o que torna a grande maioria dos dados irrelevantes. Além disso, a realização desses exames ainda é limitada a poucos laboratórios com equipamentos especializados, o que dificulta sua aplicação clínica. O objetivo deste trabalho foi padronizar polimorfismo para diagnóstico de genótipos relacionados à obesidade e suas comorbidades, além de desenvolver um kit de genotipagem que utiliza alternativas de baixo custo para o diagnóstico genético. Foram padronizadas as reações para os polimorfismos rs3813627, rs11872992, rs10830963 e rs4673 nos genes Apoliproteína 2, Receptor de Melanocortina-4, Receptor de Melatonina 1B e Cadeia leve do citocromo neutrófilo humano, respectivamente, utilizando um método eficiente e de baixo custo. Estes métodos já estão em processo de patente, somando-se a outras seis variações genéticas já patenteadas em nosso laboratório. A padronização de novas variações genéticas e a futura produção de um kit poligênico para identificação da obesidade e suas comorbidades, com manual de interpretação, visa facilitar o diagnóstico e tratamento dessas condições utilizando métodos de baixo custo e mais acessíveis.

Palavras-chave: Polimorfismo; Obesidade; Diabetes; Síndrome metabólica; Genética.

Abstract

Obesity is a serious public health problem, associated with several diseases, such as type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, heart disease, among others. Although it is influenced by environmental and sociocultural factors, genetic predisposition plays a significant role in its development. With the advancement of genotyping techniques, it has become possible to perform comprehensive genetic investigations, which provide millions of results at a lower cost. However, only a small fraction of these polymorphisms are relevant for the genetic diagnosis of predisposition to diseases associated with obesity, which makes the vast majority of data irrelevant. In addition, the performance of these tests is still limited to a few laboratories with specialized equipment, which makes their clinical application difficult. The objective of this work was to standardize polymorphisms for the diagnosis of genotypes related to obesity and its comorbidities, in addition to developing a genotyping kit that uses low-cost alternatives for genetic diagnosis. The reactions for the polymorphisms rs3813627, rs11872992, rs10830963 and rs4673 in the genes Apolipoprotein 2, Melanocortin-4 Receptor, Melatonin Receptor 1B and Human Neutrophil Cytochrome Light Chain, respectively, were standardized using an efficient and low-cost method. These methods are already in the patent process, joining six other genetic variations already patented in our laboratory. The standardization of new genetic variations and the future production of a polygenic kit for identifying obesity and its comorbidities, with an interpretation manual, aim to facilitate the diagnosis and treatment of these conditions using low-cost and more accessible methods.

Keywords: Polymorphism; Obesity; Diabetes; Metabolic syndrome; Genetics.

1. Introdução

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo. Trata-se de uma preocupação global de saúde, pois está associada à predisposição a diversas doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes tipo 2 (DM2), hipertensão e doenças cardiovasculares (DCV) (GADDE et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 650 milhões de adultos em todo o mundo são considerados obesos (KHODARAHMI et al., 2020). A Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) estima que, até 2025, 2,3 bilhões de adultos estarão acima do peso, sendo 700 milhões classificados como obesos, ou seja, com Índice de Massa Corporal (IMC) superior a 30. No Brasil, a obesidade cresceu 67,8% nos últimos treze anos, passando de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018.

Este aumento da prevalência da obesidade está ocorrendo pela dificuldade de tratamento, uma vez que a obesidade é uma doença complexa, influenciada por diversos fatores ambientais, comportamentais e genéticos. A predisposição genética à obesidade pode ser classificada como monogênica, quando há um polimorfismo em um único gene ou em uma região cromossômica específica associada à doença, ou poligênica, quando múltiplos genes estão envolvidos. A forma poligênica é a mais comum, na qual os alelos de diferentes genes estão associados a pequenas influências no IMC, contribuindo para a determinação do peso corporal. Muitos genes associados à obesidade desempenham papéis fundamentais na regulação da ingestão energética, no metabolismo lipídico, na adipogênese, na termogênese, no gasto energético em repouso, na síntese de adipocinas e na expressão de fatores de transcrição (CROVESY et al., 2019).

O fenótipo da obesidade tem se tornado cada vez mais prevalente nas últimas décadas. Acredita-se que esse distúrbio complexo resulte de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, influenciado por mudanças no estilo de vida e pela exposição a um ambiente obesogênico. Apesar disso, estima-se que a predisposição hereditária à obesidade varia entre 40% e 70% (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Estudos do genoma humano indicam que variações estruturais também podem desempenhar um papel significativo na variação fenotípica entre os indivíduos, podendo estar associadas ao desenvolvimento de doenças e até mesmo à forma como respondemos a determinados medicamentos. Embora os fatores genéticos sejam relevantes, escolhas nutricionais e hábitos de vida podem modular a expressão de genes relacionados à obesidade. Dessa forma, a compreensão da genética individual pode ser essencial para a personalização do manejo do peso. No futuro, testes específicos poderão permitir previsões mais precisas sobre a resposta de um indivíduo a determinada dieta, possibilitando abordagens nutricionais mais eficazes (PEREIRA FILHO et al., 2021).

Pesquisadores têm explorado amplamente essa tecnologia para expandir as associações entre genes e doenças, além de produzir informações genômicas atualizadas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada para a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de baixo e médio rendimento, por ser uma metodologia de menor custo e amplamente acessível a diversos laboratórios (CHUANG et al., 2008).

No presente projeto, padronizamos a genotipagem de polimorfismos associados à obesidade e suas comorbidades, visando o desenvolvimento de um kit diagnóstico contendo apenas os polimorfismos mais relevantes. O método proposto é simples e compatível com os equipamentos já disponíveis em laboratórios de análises clínicas, facilitando sua implementação e ampliação do acesso aos testes genéticos.

2. Revisão Bibliográfica

A fome é um sinal precoce que desencadeia o início da alimentação, especialmente no contexto das refeições, enquanto a soma dos sinais gerados durante o ato de comer leva à sua finalização. Os sinais de fome mais perceptíveis têm origem no estômago, onde impulsos elétricos transmitidos pelo nervo vago indicam o estado de vazio ou plenitude, sendo reforçados pela secreção do hormônio grelina e por sinais metabólicos, como a hipoglicemia. A saciedade, por sua vez, é o processo que leva à interrupção da ingestão alimentar e regula o tamanho da refeição. O estado fisiológico ao término da alimentação, no qual a sensação de plenitude inibe novas refeições, é denominado saciedade. Esse estado se mantém até que o processamento e a absorção dos nutrientes diminuam, até o momento em que a fome volta a surgir, iniciando um novo ciclo alimentar. Além disso, o estômago e o intestino enviam informações pós-ingestão por meio de sinais físicos, como a distensão da parede gástrica, e fatores osmóticos, fornecendo um feedback essencial sobre a quantidade de alimento ingerido.

A saciedade em médio prazo é controlada metabolicamente pelos hormônios peptídicos intestinais, incluindo peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), colecistoquinina (CCK) e neuropeptídeo Y (NPY), que são liberados quando o processo de digestão passa pelo trato gastrointestinal e desempenham funções de processamento de refeições, além de seus efeitos inibitórios na ingestão de alimentos. A fase pós-absorção é quando a saciedade em longo prazo é controlada pelas concentrações de insulina, glicose e aminoácidos no sangue e oxidação de nutrientes no fígado. O cérebro integra sinais de todos os processos envolvidos no controle do apetite hedônico e homeostático, bem como os relacionados à saciedade sensorial e metabólica (AMIN et al., 2016). No entanto, quando a quantidade de calorias ingerida através dos alimentos é maior do que aquela que o organismo gasta com seu metabolismo basal somado às atividades físicas diárias, diz-se que há um balanço energético positivo e assim gerando uma tendência à obesidade.

Por ser uma condição multifatorial, a obesidade envolve a interação entre predisposição genética e influências externas. Enquanto os genes determinam a suscetibilidade ao ganho de peso, fatores ambientais, dieta e

prática de exercícios físicos modulam a expressão genética. Dessa forma, indivíduos com o mesmo consumo e absorção de energia podem apresentar diferenças no peso corporal devido à variação genética, uma vez que os genes influenciam tanto a ingestão nutricional quanto a escolha dos alimentos (FLORES-DORANTES, et al., 2020).

Alguns genes mais prevalentes relacionais à obesidade, como o da Proteína da obesidade e de massa de gordura associada (FTO), Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPARG), Alfa-actinina-3 (ACTN3), Letptina (LEPR), já temos padronizados em nosso laboratório, por esse motivo foram selecionado novos genes que posso integrar o kit diagnóstico que será desenvolvido posteriormente para identificação de obesidade e suas comorbidades.

2.1 Técnicas de genotipagem

2.2 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta fundamental em muitos protocolos de biologia molecular e é considerada uma das técnicas mais importantes da área. Ela permite amplificar pequenas quantidades de DNA, gerando grandes quantidades que podem ser utilizadas diretamente ou em diversas aplicações posteriores. Desde a sua introdução em 1985 (SAIKI et al., 1985), o método original da PCR foi aperfeiçoado, adaptado e aplicado a uma ampla variedade de problemas e técnicas, resultando em inúmeras versões especializadas da técnica

Durante a mitose, que é o processo de divisão das células somáticas, o material genético é duplicado para garantir que cada nova célula receba uma cópia completa do genoma. Esse mecanismo de replicação do DNA ocorre a cada divisão celular, permitindo que um organismo multicelular se desenvolva a partir de uma única célula inicial. Ao longo do crescimento, a única cópia inicial do genoma é multiplicada bilhões de vezes. A PCR imita esse princípio natural de replicação do DNA, utilizando componentes isolados do processo celular para transformar quantidades mínimas de DNA em grandes volumes, prontos para uso em análises e experimentos (DANIEL et al., 2014).

A PCR funciona com base em um princípio relativamente simples, que envolve um ciclo composto por três etapas principais: desnaturação do DNA de fita dupla, anelamento dos primers às sequências-alvo e extensão dos primers para formar novas fitas. Quando o objetivo é amplificar uma sequência de RNA, é necessário primeiro converter o RNA em DNA complementar (cDNA) por meio da ação da enzima transcriptase reversa, antes de iniciar a PCR propriamente dita. Cada ciclo dura, em média, de 3 a 5 minutos e o processo é repetido entre 20 e 40 vezes. A mistura reacional da PCR inclui tampões, nucleotídeos, primers, a enzima polimerase e o ácido nucleico da amostra a ser analisada (SCHOCHETMAN et al., 2014).

Após 30 ciclos, uma única cópia de DNA pode ser aumentada para até 1.000.000 de cópias. De certa forma, então, a replicação de uma fita discreta de DNA está sendo manipulada em um tubo sob condições controladas (SCHOCHETMAN et al., 2014).

2.3 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 (Figura 1). A técnica, chamada tetra-primer ARMS-PCR, adota certos princípios do método de PCR tetra-primer (YE et al., 1992) e o sistema de mutação refratária de amplificação (ARMS) (YE et al., 2001). Abaixo uma representação esquemática do funcionamento do tetra-primer ARMS-PCR.

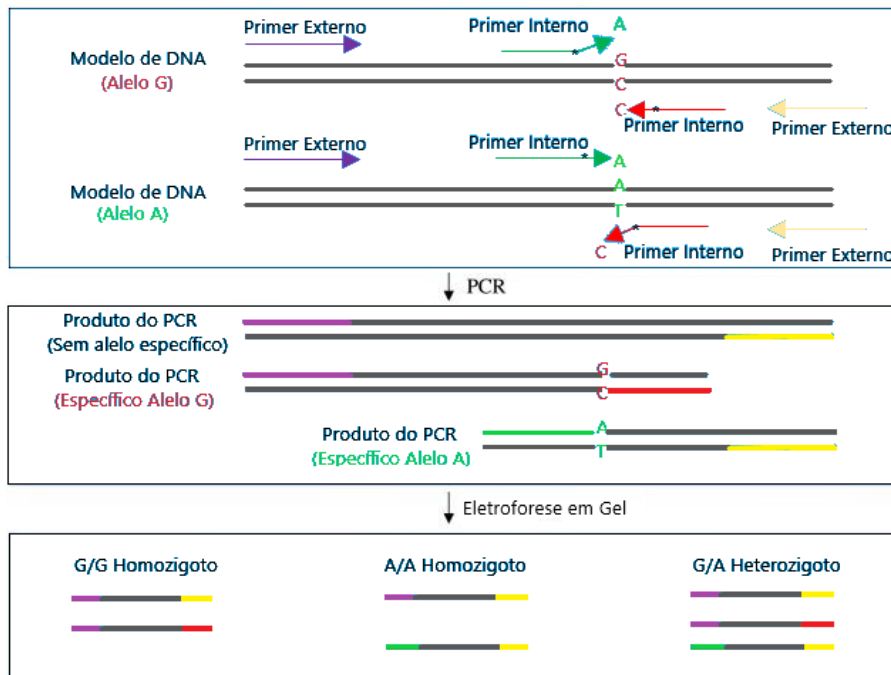


Figura 1. Apresentação esquemática do método ARMS-PCR tetra-primer. O SNP usado aqui como exemplo é uma substituição G → A, mas o método pode ser usado para outros tipos de substituições de base única. Dois “amplicons” específicos de alelo são gerados usando dois pares de “primers”, um par (indicado por setas rosa e vermelha, respectivamente) produzindo um amplicon representando o alelo G e o outro par (indicado por setas amarela e verde, respectivamente) produzindo um amplicon representando o alelo A. A especificidade do alelo é conferida por um desajuste entre a base do terminal 3 de um primer interno e o modelo de DNA. Para aumentar a especificidade alélica, uma segunda discordância deliberada (indicada por um asterisco) na posição -2 do terminal 3 também é incorporada nos “primers” internos. Os iniciadores são de 26 pb ou mais, de modo a minimizar a diferença na estabilidade de iniciadores ligados aos alelos alvo e não alvo, assegurando que a especificidade do alelo resulta de diferenças na taxa de extensão, em vez da taxa de hibridização. Ao posicionar os dois iniciadores externos a diferentes distâncias do nucleotídeo polimórfico, os dois amplicons específicos do alelo diferem em comprimento, permitindo que sejam discriminados por eletroforese em gel (Adaptado de Ye et. Al, 2001).

2.4PCR real time

A PCR em tempo real (qPCR) tornou-se a técnica preferida em diversos laboratórios para aplicações nas áreas de diagnóstico e controle de alimentos. Essa metodologia integra a reação em cadeia da polimerase com o uso de sondas fluorescentes, permitindo o acompanhamento em tempo real da geração dos produtos de amplificação a cada ciclo da reação (NAVARRO et al., 2015).

A principal vantagem da qPCR em relação aos métodos tradicionais de PCR é sua capacidade de determinar com alta precisão e sensibilidade a concentração inicial de DNA na amostra. Dessa forma, os resultados obtidos podem ser tanto qualitativos, indicando a presença ou ausência da sequência alvo quanto quantitativos (LOGAN, et al., 2009).

O instrumento utilizado na qPCR consiste em um termociclador com uma fonte de luz de excitação integrada (uma lâmpada, um laser ou LED: diodo emissor de luz), um sistema de detecção de fluorescência ou fluorímetro e um software que exibe os dados de fluorescência registrados como uma curva de amplificação de DNA, sendo necessário adicionar um corante intercalante dsDNA ou uma sonda marcada com fluoróforo à mistura de reação (NAVARRO et al., 2015).

Outra característica importante é que todas as etapas, desde a amplificação até a análise dos dados, ocorrem em um sistema de tubo fechado. Isso elimina a necessidade de manipulações pós-amplificação, reduzindo significativamente o risco de contaminação. A tecnologia de PCR em tempo real demonstrou ser extremamente versátil e eficaz em diversas áreas da pesquisa científica, incluindo biomedicina, microbiologia, medicina veterinária, agricultura, farmacologia, biotecnologia e toxicologia (COSTA, 2004).

2.5 TaqMan PCR

A técnica TaqMan é uma forma de PCR quantitativa em tempo real que emprega sondas fluorescentes para quantificar o ácido nucleico alvo. Essas sondas, chamadas fluorogênicas, contêm um corante repórter e um corante supressor, e se ligam especificamente à sequência de interesse. Durante a fase de extensão da PCR, a enzima Taq polimerase, por meio de sua atividade 5'-exonuclease, cliva a sonda ligada. Essa clivagem separa o corante repórter do supressor, resultando em um aumento da fluorescência. Esse sinal fluorescente é proporcional à quantidade de produto amplificado, permitindo a quantificação em tempo real (DAVI, et al., 2005).

Assim como na PCR convencional, cada rodada de amplificação dobra o número de cópias da sequência alvo na reação, de modo que um aumento de aproximadamente 1.000 vezes no produto de PCR é produzido a cada 10

rodadas de amplificação. Este processo de amplificação do alvo resulta na produção de grandes quantidades de fluorescência a partir de pequenos números de alvos na amostra original (DAVI et al., 2005).

A principal limitação dos ensaios de TaqMan é que eles não detectam o tamanho da sequência alvo amplificada. A TaqMan PCR acoplada à eletroforese capilar é uma abordagem alternativa que pode ser usada para contornar essa limitação (LUTHRA et al, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Padronizar uma ferramenta biotecnológica simples, eficiente, com baixo custo e fácil aplicação para genotipagem dos principais polimorfismos genéticos ligados à obesidade e suas comorbidades.

3.2 Objetivos específicos

- Buscar na literatura as variantes genéticas de polimorfismo ligadas à obesidade e suas comorbidades;
- Padronizar técnica tetra-primer ARMS PCR para genotipagem dos SNPs dos polimorfismos genéticos escolhidos;
- Padronizar kit poligênico de baixo custo e com maior facilidade de acesso para polimorfismos ligados à obesidade.
- Desenvolver um manual de interpretação dos resultados do kit, orientando o diagnóstico de predisposição genética e sugerindo um tratamento/prevenção.

4. Metodologia

4.1 Revisão de literatura

Para a revisão de literatura, foi realizada uma busca na base de dados do PubMed utilizando as palavras-chave “obesity OR Diabetes OR metabolic Syndrome” AND “gene” AND “polymorphism”, com as restrições para “Title/Abstract”. Foram encontrados 185 títulos nessa busca literária. Depois de feita a leitura dos resumos, foram selecionados os trabalhos que obtiveram resultados associados à obesidade ou suas comorbidades e serviram como base para escolha das variações genéticas, sendo assim, inclusos no nosso estudo.

Algumas variações genéticas encontradas foram excluídas, pois a técnica de genotipagem multiplex ARMS-PCR utilizada neste trabalho para padronização das reações perde sua confiabilidade em regiões onde ocorrem muitos SNPs em sequência ou ocorrem próximas outras formas de polimorfismos genéticos dificultando o funcionamento e a eficiência das reações.

4.1 Genotipagem

4.1.1 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. O “Swab” foi esfregado no interior da boca e debaixo da língua por cerca de dez segundos a fim de coletar células epiteliais descamadas. As amostras foram mantidas em gelo até o armazenado em freezer a temperatura de -20°C (MARTINEZ et. al, 2018).

4.1.2 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 (100 mM de TRIS HCl 1 M pH 8,5; 5 mM de EDTA 0,5M pH 8; 0,2% de de SDS; 200 mM de NaCl) 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 13500rpm 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 13500rpm por 10 minutos e lavado com etanol 70% (600 µl). Após secagem a temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspendido em 50 µl de tampão T.E. (10 mM de TRIS Hcl 100mM, pH 7,4; 1 mM de EDTA 0,5 M pH 8).

4.2 Desenvolvimento dos “primers” para cada SNP

4.2.1 Verificação se o polimorfismo poderia ser ajustado para diagnóstico com ARMS-PCR.

Inicialmente, realizou-se uma busca na base de dados PubMed para identificar os polimorfismos genéticos previamente estudados. Em seguida, utilizou-se o banco de dados SNPedia para aprofundar o conhecimento sobre cada um dos polimorfismos selecionados. Além disso, a ferramenta dbSNP, vinculada ao site SNPedia.com, foi empregada para obter informações como as frequências alélicas, a localização exata do SNP no DNA e as características da região genômica ao redor, incluindo a presença de outros polimorfismos próximos.

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

Após isto a ferramenta BLAT disponibilizada pela Santa Cruz University of California Genomics Institute localizado no website <https://genome.ucsc.edu/> 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”.

4.2.3 Desenho de prováveis sequências de iniciação

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

4.2.4 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, e de outros problemas que podem ocorrer como a formação de “hairpin loops”, “dimers”, “bulge loops”, “internal loops” e “match sites”. Foram escolhidas apenas sequências que possuíam baixa chance de formação destes comportamentos dos oligonucleotídeos.

4.2.5 Verificação de especificidade das sequências escolhidas

Depois disso as sequências dos “primers” foram novamente verificadas no BLAT confirmando sua ocorrência específica no local próximo da variação genética correspondente desta forma evitando amplificação de outras regiões do DNA.

4.2.6 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 para a empresa Exxtend em São Paulo - SP, a fim de se obter 100% de confirmação dos resultados.

4.2.7 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.

5. Resultados

5.1 Genes relacionados à obesidade

5.1.1 Receptor de melanocortina-4 (MC4R)

A etiologia da obesidade é multifatorial, causada por uma interação de fatores ambientais com muitas variantes de efeito menor em vários genes. No entanto, também foram identificadas formas monogênicas raras da doença, causadas por mutações de grande impacto em um único gene. Entre os casos de obesidade monogênica não sindrômica, as mutações no gene MC4R são apontadas como a causa mais comum. Dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 0,05% da população geral apresentam variações nesse gene. Além disso, a prevalência de variantes no MC4R é de 0,2% entre adultos com obesidade e de 5% a 6% em pacientes com obesidade grave de início precoce (FONSECA et al., 2019).

O MC4R é um receptor que consiste em 322 aminoácidos é codificado por um único exon localizado no cromossomo 18q22 e é expresso em níveis mais altos no cérebro. Mutações no gene MC4R colaboram com a interrupção da homeostase energética, ganho de peso e desenvolvimento de obesidade (MOZAFARIZADEH et al., 2019).

O MC4R é um receptor acoplado à proteína G, localizado na membrana plasmática, que desempenha um papel central na regulação do apetite e da homeostase energética. Sua função consiste em monitorar o equilíbrio energético e o peso corporal, iniciando com a secreção de leptina (LEP) pelos adipócitos. Em seguida, a LEP se liga aos receptores de leptina (LEPR) nos neurônios que expressam a proopiomelanocortina anorexígena (POMC) liberando hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH). Depois disso, o α -MSH ativa o MC4R no núcleo hipotalâmico paraventricular e o MC4R ativado retransmite um sinal de saciedade para o cérebro e para o corpo. A ativação do MC4R através do α -MSH promove saciedade, aumenta o gasto de energia e assim causa perda de peso (FATIMA, et al (2021).

Uma das estratégias utilizadas pela LEPR para regular a ingestão de energia ocorre por meio da ativação de neurônios que expressam orexígenos, como a proteína relacionada à agouti (AgRP) e o NPY. Quando a leptina estimula o receptor LEPR nesses neurônios, a expressão de AgRP, que atua

como um antagonista do MC4R concorrente da α -MSH, é inibida. A interação entre MC4R e AgRP promove o aumento do apetite e, conseqüentemente, da ingestão alimentar (NAKAMURA et al., 2018).

Diversas pesquisas demonstraram os efeitos significativos das mutações no gene MC4R sobre a obesidade em camundongos e humanos. Em humanos, mais de 150 mutações já foram identificadas nesse gene. Algumas dessas variantes estão associadas à obesidade hereditária de padrão dominante, enquanto outras foram detectadas, mas seu impacto sobre a ingestão alimentar ainda é desconhecido (DAVOLI et al., 2012).

Pesquisas sobre variações espontâneas e geneticamente induzidas nos genes do sistema melanocortina destacam a relevância desse sistema na obesidade e na síndrome metabólica, sugerindo uma disfunção no seu funcionamento. Um estudo que utilizou deleção genética em camundongos demonstrou que a interrupção do MC4R levou ao desenvolvimento de um fenótipo obeso, enfatizando o papel crucial do MC4R na obesidade.

A disfunção do MC4R, tanto em camundongos quanto em humanos, resulta em hiperfagia e obesidade. Mutações e perda de função no MC4R são as formas mais comuns de obesidade monogênica, ocorrendo em 4-5% dos indivíduos com obesidade grave de início precoce. No entanto, o papel das variantes comuns do MC4R na obesidade poligênica ainda permanece incerto (YOUNG et al., 2007).

5.1.2 Estudos com MC4R rs17782313

A variação do MC4R rs17782313 é um fator de risco para ganho de massa corporal, ganho de gordura corporal e obesidade. Um estudo de coorte indicou que a variante rs17782313 foi associado a maiores consumos de energia total e gordura na dieta (VEGA et al., 2016) Em outro estudo, o mesmo polimorfismo rs17782313 foi associado ao maior consumo de energia e gordura e menor consumo de carboidratos e proteínas (CROVESY et al., 2019).

Em estudo realizado por Khodarahmi et al. (2020), foi avaliada a associação entre os genótipos de rs17782313 e fatores de risco cardio-metabólicos e também os índices de qualidade da dieta (HEI-2015 e DQI-I) utilizando a técnica de PCR com comprimento de fragmento de restrição

subsequente. O estudo mostrou uma interação gene-dieta estatisticamente significativa do MC4R rs17782313 com a adesão aos índices de qualidade alimentar (HEI e DQI-I) em alguns dos fatores de risco cardio-metabólicos em ambos os sexos. No grupo masculino, quando a adesão a esses índices era baixa, o alelo homozigoto (CC) de risco de obesidade foi associado a maiores níveis de glicemia de jejum, pressão arterial sistólica e diastólica. Por outro lado, no grupo feminino, a adesão média ao HEI por alelos heterozigotos raros de rs17782313 aumentou o risco de ter nível de colesterol LDL mais alto sem efeito no IMC.

No estudo realizado por Yang et al. (2019), onde analisaram os efeitos do MC4R rs17782313 em crianças e adolescentes obesos residentes no noroeste da China, observaram que o MC4R rs17782313 está fortemente associado à obesidade. Em estudo realizado por Adamska-Patrano et al. (2019), foi utilizada a tecnologia de TaqMan, notaram que o maior acúmulo de tecido adiposo visceral foi observado em homens portadores do alelo C no rs17782313 e nos indivíduos homozigotos. Os portadores do alelo C também apresentaram uma relação tecido adiposo visceral/tecido adiposo subcutâneo significativamente mais alto, o que significa o aumento de depósito de gordura visceral.

No estudo de Martins et al. (2018), utilizando a técnica de PCR real time, observaram que o alelo C de MC4R-rs17782313 foi associado à mudança na ingestão total de energia da pré-gravidez para a gravidez, com as portadoras do alelo C apresentando uma média ajustada mais baixa de ingestão, do que as não portadoras deste alelo.

5.1.3 Estudos com MC4R rs12970134

Em estudo realizado por Batarfi et al. (2019), determinaram a associação entre variantes do gene MC4R (rs12970134 e rs17782313) em mulheres com síndromes ovários policísticos, usando a técnica de PCR real time e observaram que variantes do MC4R (rs12970134 e rs17782313) com os genótipos A/A e C/C (homozigotos), respectivamente, foram altamente associados à obesidade.

No estudo de Yang et al. (2019), analisaram os efeitos dos MC4R rs12970134 e rs17782313 em crianças e adolescentes obesos residentes no noroeste da China e mostraram que MC4R rs12970134 e MC4R rs17782313 estão fortemente associados à obesidade.

Em um estudo realizado por Wang et al. (2017), foi investigada a associação entre o polimorfismo rs12970134 e a ingestão de bebidas, além de explorarem o papel mediador do apetite entre esse polimorfismo e a ingestão de bebidas em crianças chinesas com sobrepeso/obesidade. Utilizando a técnica de PCR multiplex, os autores observaram que esse polimorfismo, localizado próximo ao MC4R, estava associado tanto ao apetite quanto à ingestão de bebidas. Além disso, os resultados sugerem que o apetite pode mediar o efeito do polimorfismo próximo ao MC4R sobre a ingestão de bebidas.

No estudo de Koochakpoor et al. (2016), foi investigado o efeito da interação entre o polimorfismo MC4R rs12970134 e padrões alimentares, nutrientes ou grupos alimentares sobre o risco de desenvolvimento da síndrome metabólica, utilizando a técnica tetra-primer ARMS-PCR. Os resultados mostraram uma interação entre o rs12970134 e o padrão alimentar ocidental, bem como a ingestão de gordura e vegetais, no risco de síndrome metabólica.

5.1.4 Estudos com MC4R rs11872992

Em um estudo conduzido por Muller et al. (2014), foi analisado o impacto do polimorfismo rs11872992 nas variações longitudinais do IMC. Foi realizada análises de modelos mistos para incluir dados de todos os exames disponíveis e diferenças analisadas na mudança no IMC ou na pontuação Z do IMC na infância. O polimorfismo rs11872992 obteve uma baixa frequência alélica para o A alelo, portanto o heterozigoto (GA) e os genótipos homozigotos (AA) foram combinados para análises. Durante a infância, a taxa de variação do IMC foi de 1,27 kg/m²/ano em indivíduos com alelos GG de risco para 1,20 kg/m²/ano em indivíduos com os alelos GA e AA sem risco.

O polimorfismo rs11872992 tem sido associado ao aumento do IMC, sendo seu alelo homozigoto relacionado a um maior percentual de gordura corporal, maior ingestão alimentar e redução do gasto energético. Em estudo

realizado por Beckers et al. (2011), encontraram evidências de que essa variante genética está associada à obesidade complexa, indicando que o alelo homozigoto pode estar significativamente correlacionado ao desenvolvimento da obesidade. Em contrapartida, o alelo heterozigoto parece exercer um efeito protetor, reduzindo o risco de obesidade.

Em adultos, a taxa acelerada de aumento de IMC continuou em indivíduos com alelos de risco GG em comparação com aqueles com alelos sem risco GA e AA. Muitos desses indivíduos também tinham dados disponíveis para o status de DM2, e o rs11872992 foi associado ao aumento do risco de DM2 de modo que indivíduos com o alelo de risco para IMC (alelo G) tiveram uma maior prevalência de DM2. No entanto, a associação com DM2 foi atenuada após o ajuste para IMC máximo, sugerindo que o achado foi atribuído principalmente ao aumento do IMC.

5.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF, que faz parte da família das neurotrofinas, é amplamente expresso no sistema nervoso e desempenha um papel crucial no desenvolvimento neurocognitivo, incluindo o crescimento e a sobrevivência neuronal. Além disso, sua expressão no hipotálamo parece regular tanto a ingestão quanto o gasto energético, sendo eles fatores chave na manutenção da homeostase energética (RANA et al., 2018).

A expressão relativa de BDNF está associada à sinalização da fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e acetil-coA carboxilase beta (ACC β), bem como aumento do nível de oxidação de ácidos graxos. A AMPK detecta um estado de alta energia nos músculos e quando ativada, fosforila o ACC β mitocondrial, inibindo assim o aumento do nível de malonil-coA e aumentando o transporte e a oxidação dos ácidos graxos mitocondriais, regulando o metabolismo energético e o comportamento alimentar (MOHAMMED et al., 2014).

Portanto, o BDNF está envolvido na regulação da ingestão alimentar e do peso corporal, suprimindo a ingestão alimentar por meio da sinalização do hipocampo e aumentando o gasto energético. Embora a obesidade tenha uma patogênese multifatorial, estudos relataram uma correlação inversa entre níveis

séricos reduzidos de BDNF e maior IMC e porcentagem de gordura corporal (FONSECA-PORTILLA et al., 2019). Corroborando esses achados, Rios et al. demonstraram que a deleção condicional de BDNF em camundongos resultou em um aumento de 80-150% no peso corporal, crescimento linear exacerbado e níveis elevados de leptina, insulina, glicose e colesterol no sangue. Da mesma forma, em humanos, pacientes com doenças crônicas, como obesidade e DM2, apresentaram níveis reduzidos de BDNF plasmático (MA et al., 2012).

5.2.1 Estudos com BDNF rs6265

Um polimorfismo importante é o rs6265, o qual é presente na região de codificação do gene BDNF envolve a transição G>A na posição 196º do nucleotídeo que, por sua vez, resulta na substituição de valina para metionina na posição 66º do aminoácido (Val66Met) do domínio N-terminal do pró-BDNF (RANA et al., 2018). A variante de metionina (alelo A) leva ao tráfego intracelular prejudicado de pró-BDNF, embalagem, secreção e, como consequência, reduz a produção de BDNF maduro (CHEN et al., 2004; EGAN et al., 2003; ZAMANI et al., 2019).

Em estudo realizado por Rana et al. (2019), investigaram a associação do polimorfismo BDNF rs6265 com síndrome metabólica na população do Paquistão, utilizando a técnica de PCR real time. Detectaram que O BDNF rs6265 poderia estar associado ao aumento do risco de ter síndrome metabólica em paquistaneses independentes do IMC e gênero.

Martínez-Ezquerro et al. (2018), utilizando a técnica de PCR-RFLP, pesquisaram a relação e determinaram a associação entre o Polimorfismo BDNF Val66Met e estado nutricional pacientes pediátricos mexicanos e encontraram associação significativa entre o genótipo BDNF rs6265AA (Met/Met) e sobrepeso/obesidade na população pediátrica mexicana.

Já Wu et al. (2017) em um estudo, investigaram as associações entre o SNP rs6265 próximo ao BDNF com adiponectina na em crianças chinesas que participaram do estudo da Síndrome Metabólica da Criança e do Adolescente de Pequim e demonstraram que o SNP rs6265 próximo ao BDNF estão associados à adiponectina em crianças chinesas.

Sustar et al. (2016) em outro estudo, avaliaram a associação entre o polimorfismo BDNF Val66Met e doenças cardiovasculares (DC) e/ou IMC em pacientes com DC e em controles saudáveis, utilizando a técnica de PCR real time. Notaram que o polimorfismo BDNF rs6265 estava associado às categorias de IMC e o genótipo BDNF Met/Met tem um papel protetor na obesidade em indivíduos saudáveis.

5.2.2 Estudos com BDNF rs925946

Outra variante genética é o SNP próximo ao gene BDNF é o rs925946, que foi relacionado a um maior ganho de peso e crescimento rápido durante a infância e também foi associado à síndrome metabólica (MARCOS-PASERO et al., 2019).

Em estudo realizado por Ibáñez-Zamacona et al. (2019), analisaram a associação entre o SNP rs925946 e a composição corporal estimada por meio do somatótipo antropométrico e observaram que a variante genética rs925946 mostrou associação significativa com endomorfia e ectomorfia, ou seja, uma possível influência dessa variante genética na morfologia e na composição corporal. Corroborando com esses achados, o estudo de Akbarian et al., (2018), uma meta-análise elucidou que alguns polimorfismos no gene BDNF como rs925946, rs10501087, rs6265 e rs988712 podem ser considerados como determinantes genéticos da obesidade.

Dušátková et al. (2015), pesquisaram as variantes de genes selecionados com adiposidade e características dietéticas e assim o alelo de risco de obesidade do BDNF rs925946 foi associado a uma menor ingestão de cálcio independente do IMC.

5.3 Apolipoproteína

Uma das apolipoproteínas mais estudadas é a Apolipoproteína A2 (APOA2), que pertence a uma superfamília de apolipoproteínas, incluindo as famílias APOA, APOC e APOE. Codificada pelo gene APOA2, ela está presente como um homodímero no plasma humano. Sendo a segunda apolipoproteína mais abundante no HDL humano, a APOA2 desempenha um papel fisiológico significativo no metabolismo das lipoproteínas. No entanto, um

estudo anterior sugeriu que a deficiência de APOA2 tem como impacto a redução nos perfis lipídicos e nas lipoproteínas, bem como na ocorrência de doença arterial coronariana em humanos (TAILLEUX et al., 2002).

No entanto, estudos recentes mostraram que APOA2 desempenha vários papéis na manutenção de HDL, obesidade e resistência à insulina relacionada à obesidade. Embora a função exata de APOA2 ainda não esteja clara, a superexpressão do gene APOA2 em camundongos desencadeou um aumento no IMC e nos níveis de triglicerídeos, enquanto o camundongo APOA2-null (variação do gene APOA2, que pode afetar a produção da lipoproteína APOA2 e causar hipercolesterolemia) diminuiu os níveis de triglicerídeos ao produzir partículas de HDL alteradas. É importante ressaltar que o tamanho da partícula de HDL está associado aos níveis de HDL, sugerindo uma associação de APOA2 e níveis circulantes de HDL (BOUGHANEM, et al. 2020).

Em humanos o gene APOA2 foi associado ao acúmulo de gordura visceral e ao metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Também está ligado à obesidade e ao metabolismo lipídico. Em estudo realizado por Boughanem et al. (2020) que analisou o gene APOA2 rs3813627, utilizando PCR real time, encontrou frequência desse alelo de 0,36 para toda a população, 0,37 para o grupo de não obesos e 0,35 para o grupo com sobrepeso/obesidade. Foi analisada no modelo recessivo (heterozigoto), que a variante APOA2 rs3813627 foi significativamente correlacionada com HDL e APOA1 em níveis mais baixos. Em humanos ele foi associado ao acúmulo de gordura visceral e ao metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. O seu homozigoto foi associado a baixos níveis de HDL nos indivíduos com sobrepeso/obesidade. O SPN APOA2 rs3813627 não foi associado ao IMC em nenhum modelo e após ajuste por sexo. No entanto, foi observado que este polimorfismo foi associado a baixos níveis de HDL sob o modelo recessivo.

5.4 Leptina Gene (LEP)

A leptina é uma adipocina (proteína de 16kDa com 167 aminoácidos) produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco. É reguladora central das vias de detecção de adiposidade localizadas no hipotálamo (SHAHID, et al.

2015). Tem vários efeitos sistêmicos, como controle de massa corporal, reprodução, angiogênese, imunidade, cicatrização de feridas, ossos remodelação e função cardiovascular. No plasma a concentração de leptina é proporcional à adiposidade corporal e é acentuadamente aumentada em indivíduos obesos (HINUY, et al. 2008).

A leptina é um produto do gene da leptina que está localizado no cromossomo 7q31.3. O gene contém 3 exons separados por 2 introns. Mutações na sequência que codificam ou no local de união de LEP, que torna a proteína leptina incapaz de sinalizar através de seu receptor produz a obesidade de início precoce grave em humanos (SHAHID, et al. 2015).

Em um estudo realizado por Primo et al. (2020), utilizando a técnica de PCR real-time, que teve como objetivo analisar os efeitos da variante genética rs7799039 do gene LEP sobre os parâmetros metabólicos após a perda de peso secundária à dieta hipocalórica de substituição parcial de refeição (pMR). O principal achado deste estudo foi a intervenção em indivíduos sem o alelo A do SNP rs7799039, que apresentou uma melhora significativa nos níveis de colesterol LDL e de triglicerídeos, em comparação com os portadores do alelo A, após a adoção de uma dieta hipocalórica pMR. Por outro lado, os pacientes com ambos os genótipos mostraram uma melhora significativa nos parâmetros antropométricos, pressão arterial e resistência à insulina.

Shen et al. (2019) relataram em seu estudo, que o polimorfismo rs7799039 foi associado ao ganho de peso induzido por antipsicóticos em uma população asiática. Além disso, em populações europeias, o alelo A parecia diminuir o risco de ganho de peso secundário a essas drogas.

5.5 Peptídeo de Adropina expresso por associação de homeostase energética (ENHO)

Um dos mediadores metabólicos envolvidos tanto na obesidade quanto no Diabetes Mellitus (DM) é um peptídeo descoberto por Kumar et al. (2008), que desempenha papéis cruciais no metabolismo lipídico, na resistência à insulina e no metabolismo da glicose. Até o momento, diferentes funções desse peptídeo em vários distúrbios metabólicos, autoimunes, doenças cardiovasculares e neurológicas foram amplamente documentadas.

Em estudo realizado por Palizban et al. (2019), foi avaliado o nível sérico de Adropina e avaliação do polimorfismo de rs7903146 em pacientes iranianos com T2DM. Foi encontrado alto nível de adropina em pacientes com DM2 e o nível mais alto de adropina foi detectado em pacientes com DM2 com o genótipo rs7903146 (TT). Também foi observado que os genótipos rs7903146 (TT) e rs7903146 (CT) podem aumentar o risco de DM2. Embora a adropina possa estar diminuída no início da doença ou nos primeiros anos após o desenvolvimento do DM2, o aumento do nível sérico de adropina pode ocorrer como resposta adaptativa a condições patogênicas, como mau funcionamento do endotélio, resistência à insulina, dislipidemia e intolerância à glicose.

5.6 Apelina (APLN)

A Apelina é um peptídeo que, em humanos, é codificado pelo gene APLN, é um ligante endógeno para o Receptor APJ acoplado à proteína G. O gene apelina é localizado no cromossomo X (Xq25-26.1) e contém 3 exons, com a região de codificação abrangendo também os exons 1 e 2. O gene APLN codifica 77 aminoácido pré-propeptídeo que é então clivado em peptídeos, incluindo apelina-36, apelina-17 e apelina-13, que ativam o receptor APJ (HASHIM, 2014).

O sistema apelina-APJ tem uma ampla representação no sistema nervoso central e em uma variedade de tecidos periféricos, como os pulmões, rins, coração e vascular, e está emergindo como um importante regulador da homeostase cardiovascular (HASHIM, 2014).

A produção de apelina nos adipócitos é estimulada pela insulina, enquanto a própria apelina inibe a secreção de insulina e aumenta a utilização de glicose, sendo essencial para a manutenção da sensibilidade à insulina. Além disso, foi visto que a administração exógena de apelina exerce efeito benéfico sobre a sensibilidade à insulina e resistência à insulina, reduzindo a hiperinsulinemia e estimulando a captação de glicose e assim induzindo um estado catabólico. Embora o papel funcional do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na posição 212 do gene do receptor APLNR (G212A, rs11544374) ainda não tenha sido identificado, o fato de que a presença do alelo A está

associada ao menor risco cardiovascular, sugerindo a especulação de que poderia ser benéfico no tratamento da obesidade (KOTANIDOU et al., 2014).

5.6.1 Estudos com Apelina rs2235306

Em um estudo realizado por Li et al.(2009), foi encontrada uma associação significativa entre hipertensão e 2 SNPs, rs3761581 e T-1860C, dentro do gene apelina. Foi relatado que o polimorfismo rs3115757 se associou significativamente com IMC e alelo homozigoto (CC) em mulheres. Zhao et al. (2010) observaram que o polimorfismo do gene apelina rs2235306 foi significativamente associado à pressão arterial diastólica resposta aos suplementos de potássio entre as mulheres. Foi utilizada a técnica de PCR – RFLP.

Em estudo realizado por Kotanidou et al. (2014), foi visto que A presença do alelo A em jovens obesos foi associado a níveis séricos elevados de apelina, sugerindo assim que o alelo A pode ter uma influência protetora sobre o sistema apelina/APLNR na obesidade infantil. Nesse estudo, foi demonstrado que a administração de apelina em camundongos resistentes à insulina aumentou a captação de glicose dos tecidos periféricos. Assim, acredita-se que a apelina desempenhe um papel importante na diminuição da sensibilidade à insulina e no desenvolvimento de resistência à insulina.

5.7 Interleucina-6 (IL-6)

O SNP do gene IL-6 vem atraído cada vez mais atenção recentemente dos pesquisadores. A variação significativa da sequência do gene IL-6 174 GC é amplamente distribuída na variação da IL-6 sérica em indivíduos geneticamente suscetíveis. Os alelos GC na posição 174 na região do promotor do polimorfismo rs1800795 se correlaciona com retinopatia, nefropatia, aumento da relação albumina/creatinina, bem como controle glicêmico deficiente e hiperlipidemia no DM1 (CUI et al., 2020).

No entanto, os resultados de alguns estudos atuais sobre o envolvimento deste SNP rs1800795 em complicações diabéticas no DM2 são controversos. O polimorfismo rs1800795 do gene IL-6 podem servir como preditores genéticos para a progressão de complicações na DM2, e contribuir

para a identificação de pacientes com alto risco de complicações diabéticas, auxiliando-os assim com tratamentos personalizados (CUI et al., 2020).

Foi sugerido que o polimorfismo rs1800795 (GC) afeta funcionalmente a atividade do promotor de IL-6. Estudos genéticos em indivíduos com resistência à insulina mostrou um alto grau de correlação entre a sensibilidade à insulina e um alelo particular do rs1800795 associado com maior expressão de IL-6. Assim, os homozigotos para o alelo “G” têm níveis aumentados de IL-6, insulina circulante aumentada e glicemia mais elevada do que indivíduos com genótipo CC. Além disso, estudos recentes demonstraram uma associação genética entre o polimorfismo rs1800795 e nefropatia diabética ou doença cardiovascular em pacientes com DM (PLATAKI et al., 2018).

Em estudo realizado por Plataki et al. (2018), foi comprovado pela primeira vez, que o polimorfismo rs1800795 do gene IL-6 está associado ao aumento do risco de DM2 na população geneticamente homogênea da ilha de Creta, utilizando TaqMan SNP.

Estudos vêm confirmando que a IL-6 e sua expressão estão associadas à resistência à insulina e disfunção das células beta, retinopatia diabética e síndrome da apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono no DM2 (YOSHIDA et al., 2015). No entanto, o nível de IL-6 em pacientes com DM2 com complicações microvasculares diabéticas não é considerado maior do que em pacientes sem complicações (ELLINGSGAARD et al., 2011).

Maiores níveis de IL-6 foram encontrados no plasma, estando consideravelmente aumentadas em indivíduos com DM2, em comparação com indivíduos normais, enfatizando o papel desta citocina na fisiopatologia do DM2 e suas complicações (PRADHAN et al., 2001). Como consequência, polimorfismos genéticos do gene IL-6 podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da doença. Estudos têm mostrado que o alelo “G” do polimorfismo rs1800795 se correlaciona com maior produção de IL-6, seus níveis foram considerados mais elevados em indivíduos normais portadores dos alelos GC ou GG (FISHMAN et al., 1998).

5.8 Inflamassoma (NLRP3)

Os inflamassomas são uma grande família de complexos multiproteicos que podem ser ativados por agentes patogênicos ou também por padrões moleculares associados a danos, como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a danos (DAMPs), espécies reativas de oxigênio (EROs), cristais de colesterol, e possivelmente altos níveis de glicose. O inflamassoma é composto pela proteína de NLRP3, CARD contendo proteína adaptadora e caspase-1. Ativação do inflamassoma leva à montagem do complexo multiproteico que cliva e ativa a caspase-1, resultando na clivagem da prointerleucina-1 β (pró-IL-1 β) e liberação de IL-1 β que desencadeia resposta inflamatória (KLEN, et al., 2015).

O complexo NLRP3 é principalmente expresso em células imunes, apresentadoras de antígenos, células inflamatórias após o gatilho estimulador inflamatório, que compreende os macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos (LIN & MEI, 2020).

Existem 2 hipóteses propostas para ativação de NLRP3. A primeira seria quando TLR é autofosforilado por exposição à PAMPs e/ou DAMPs, resultando assim na ativação do fator nuclear- κ B (NF κ B). Este fator nuclear estimula a transcrição e a expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18, que após a translocação de um local nuclear para citoplasmático permanecem inativo até o segundo hit. Esta hipótese é frequentemente avaliada in vitro via LPS. A segunda hipótese dá assistência a oligomerização do complexo inflamassoma inativo (NLRP3, ASC e caspase-1), que contribui para ativação, maturação e regulação positiva da interleucina (LIN & MEI, 2020).

5.8.1 Estudos com NLRP3 rs35829419

Em estudo realizado por Klen et al. (2015), foi observado que o polimorfismo rs35829419, seu alelo A está associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de quaisquer complicações macrovasculares em pacientes com DM2 a longo prazo. Neste estudo foi utilizada a técnica de KASPar.

Em um grande estudo realizado por Varghese et al. (2013) do miocárdio Infarction in Ac-county (FIA) eles observaram um efeito específico polimorfismo rs35829419, onde o alelo A conferiu proteção contra o desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio (IAM) em mulheres, mas também foi associado a níveis aumentados de PCR como marcador de inflamação em homens. Foi demonstrado que o NLRP3 pode desempenhar um papel na deposição de lipídios vasculares e na aterosclerose. Foi utilizada a técnica de TaqMan SNP.

5.9 Cadeia leve do citocromo neutrófilo humano (CYBA)

A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é uma importante fonte de EROs, incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio em células vasculares e adipócitos. O sistema NADPH oxidase é composto por múltiplas subunidades de componentes de membrana e citosólicos que se montam na superfície celular para gerar EROs. Dentre essas subunidades, destaca-se a proteína P22PHOX, a qual é fator essencial associado à membrana que desempenha um papel crucial na ativação e estabilização da NADPH oxidase (SCHREIBER, et al., 2012).

Até o momento, vários polimorfismos do gene P22PHOX (CYBA) foram identificados. Um dos mais estudados polimorfismos deste gene é o C242T (rs4673), que prevê a substituição não conservadora de histidina-72 por um resíduo de tirosina e demonstrou afetar a atividade funcional da NADPH oxidase (SCHREIBER, et al., 2012).

5.9.1 Estudos com CYBA rs4673

Em um estudo realizado por Pourgholi et al. (2020) foi investigado o efeito do polimorfismo rs4673 do gene CYBA em relação ao risco de Síndrome Metabólica (SM) em uma população iraniana, usando a técnica de PCR-RFLP. Onde se sugeriu que os genótipos e alelos estão ligados ao risco de MetS na população iraniana. Foi observado também que o alelo T em comparação com o alelo C foi associado à diminuição das chances de SM em homens, mas não em mulheres ou na população total. Além disso, o alelo T foi associado a níveis mais baixos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol LDL, bem como níveis mais altos de colesterol HDL no subgrupo masculino.

Em estudo realizado por Schreiber, et al. (2012), foi visto que o polimorfismo rs4673 foi associado a um pior perfil metabólico em hipertensos no Brasil, utilizando PCR-RFLP. A presença do alelo (T) também foi relacionada à maior circunferência da cintura e níveis plasmáticos de glicose em jejum e ao aumento da prevalência de obesidade e diabetes mellitus em comparação com portadores do alelo CC.

Moreno et al. (2006) observaram em seu estudo, que o polimorfismo rs4673 está associado à hipertensão essencial, um fator de risco bem estabelecido para doença aterosclerótica. Estudos de genotipagem do polimorfismo rs4673 em casos e controles mostrou um aumento da prevalência do alelo C em hipertensos, foi utilizada a técnica TaqMan SNP.

5.10 Receptor de Melatonina 1B (MTNR1B)

O sistema circadiano está envolvido na regulação do balanço energético e do peso corporal. Nos seres humanos, a ruptura deste ciclo circadiano por meio da vida social, trabalho noturnos e consumo de grande quantidade de gordura ao longo do dia tem levado a complicações metabólicas, como DM2, intolerância à glicose, hiperlipemia, hipertensão ou doenças cardiovasculares. Um dos cronobióticos mais conhecidos e estudados é a melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal que apresenta um papel principal no controle do ciclo circadiano (DE LUIS, et al., 2020).

O efeito da melatonina é mediado por dois receptores de membrana, incluindo o receptor de melatonina 1 (MT1, codificado por MTNR1A) e receptor de melatonina 2 (MT2, codificado por MTNR1B). O MTNR1B é expresso no diencéfalo, retina humana, ilhotas pancreáticas e células beta (LUIS, et al., 2018). Além disso, evidências indicaram que a melatonina desempenha um papel fundamental na regulação do tecido adiposo (lipogênese e lipólise), a participação no processo de escurecimento do tecido adiposo branco, a ativação do tecido adiposo marrom tecido e a manutenção de um balanço energético (DE LUIS, et al., 2020).

5.10.1 Estudos com MTNR1B rs10830963

Algumas das suas variantes genéticas dentro do MTNR1B foram associadas a níveis mais altos de glicose ou ao aumento da prevalência de diabetes mellitus e obesidade. O polimorfismo rs10830963 é a variante com a associação mais forte. Ele está localizado no único íntron (11,5kb) de MTNR1B (DE LUIS, et al., 2018).

Em estudo realizado por Goni et al. (2014), foi relatado que a variante rs10830963 poderia estar relacionada com a perda de peso induzida por uma restrição calórica, este estudo foi feito utilizando a técnica de PCR real time. Os mesmos autores detectaram uma relação dessa variante genética com a resposta lipídica após 2 anos de perda de peso dieta. Uma interação significativa foi detectada entre os genótipos rs10830963 e a intervenção dietética com uma dieta hipocalórica baseada no estilo mediterrâneo na perda de peso corporal e resistência à insulina também.

Em estudo randomizado de intervenção dietética de 9 meses realizado por De Luis et al. (2020), foi observada uma relação entre a variante rs10830963 do gene MTNR1B e alterações dos parâmetros de adiposidade, perfil lipídico e da resistência à insulina. Mostrando-nos que o alelo G foi associado a uma menor perda de peso, melhora no parâmetro de lipídios e resistência à insulina secundária a ambas as dietas hipocalóricas.

De Luis et al. (2018) observaram um efeito do polimorfismo rs10830963 localizado no gene MTNR1B, como modulador da perda de peso corporal e alterações secundárias nos níveis basais de insulina e HOMA-IR (Avaliação do modelo homeostático para resistência à insulina) em indivíduos obesos. Também foi visto que o alelo T do rs10830963 foi associado à falta de resposta da insulina em jejum e HOMA-IR após a perda de peso em ambos os sexos.

5.12 Testes de padronização das reações

Inicialmente, foram realizados testes com quatro SNPs na mesma temperatura de anelamento, visando à simultaneidade das reações para um diagnóstico mais rápido e econômico. No entanto, não foi possível obter sucesso na realização simultânea de todas as reações. Diante disso, optou-se pela padronização individual de cada reação.

Para aperfeiçoar as condições experimentais, cada SNP foi testado separadamente, permitindo ajustes nas concentrações dos reagentes e dos “primers”, garantindo a padronização adequada das reações. Foram iniciados os testes dos “primers” do gene APOA2, polimorfismo rs3813627:

APOA2 rs3813627

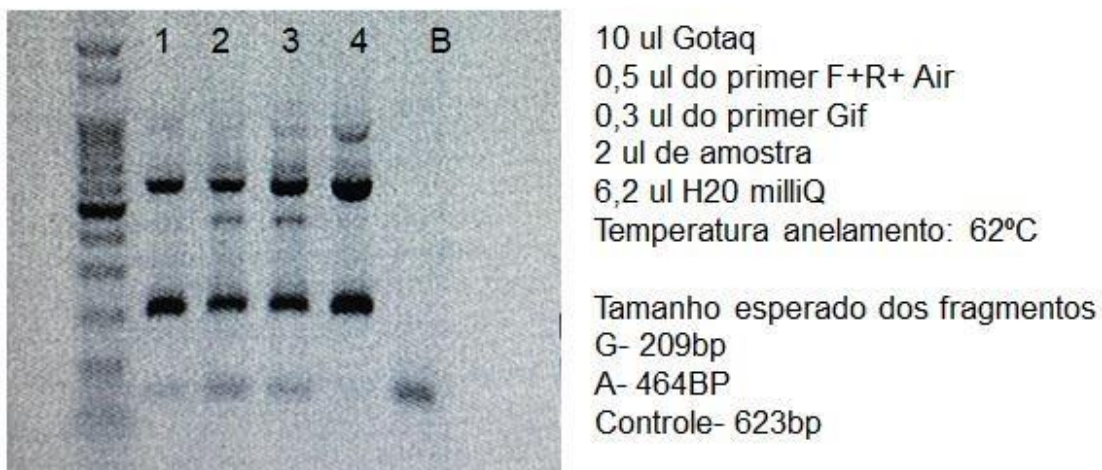
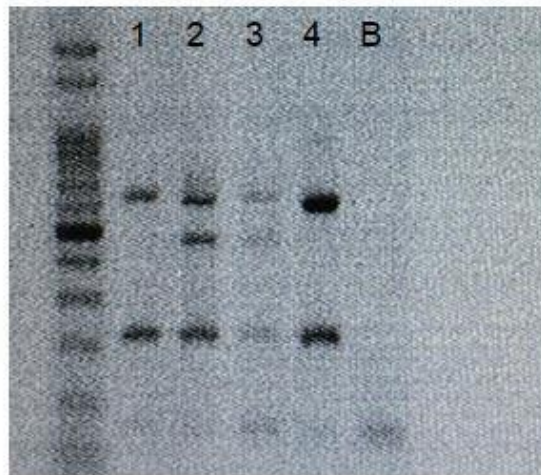


Figura 2. PCR APOA2 (rs3813627) temperatura de anelamento a 62°C “primers” R+F+Air+Gif. Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 4 amostras mais o branco (amostra sem DNA). A banda controle de 623 pb e a banda de 209 pb (alelo G) ficaram bem concentrada, aparecendo em todas as amostras, e a banda de 464 pb (alelo A) ficou bem mais fraca, aparecendo apenas em duas amostras.

Após esse teste, como a banda controle e a banda menor ficaram bastante concentradas, foi realizado novo teste mudando as concentrações do “primers” e a temperatura de anelamento.

APOA2 rs3813627



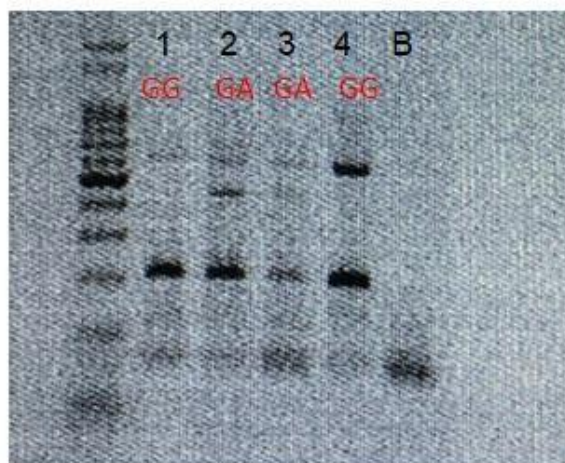
10 ul Gotaq
0,4 ul do primer F+R
0,6 ul do primer Air
0,3 ul do primer Gif
2 ul de amostra
6,2 ul H2O milliQ
Temperatura anelamento: 64°C

Tamanho esperado dos fragmentos
G- 209bp
A- 464BP
Controle- 623bp

Figura 3. 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). A banda controle de 623 pb e a banda de 209 pb (alelo G) estão aparecendo bem fortes na amostra 1,2 e 4, na amostra 3 está bem mais fraca. A banda de 464 pb (alelo A) está aparecendo mais forte na amostra 2 e fraca na amostra 3.

Como as bandas na amostra 3 apresentaram intensidade reduzida, foi realizado um novo teste com ajuste na concentração dos primers internos, o que resultou na obtenção do resultado final para esse polimorfismo.

APOA2 rs3813627



10 ul Gotaq
0,4 ul do primer F+R
0,7 ul do primer Air
0,3 ul do primer Gif
2 ul de amostra
6,2 ul H2O milliQ
Temperatura anelamento: 64°C

Tamanho esperado dos fragmentos
G- 209bp
A- 464BP
Controle- 623bp

Figura 4. 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 diagnósticos de cada amostra, estão em vermelho na imagem a cima.

A testagem de padronização do gene APOA2 do polimorfismo rs3813627, pode ser observada nas figuras 2, 3 e 4. Observamos que algumas bandas não se formaram na temperatura utilizada e nas concentrações de reagente utilizada no primeiro teste. Essa reação foi projetada para amplificar três diferentes tamanhos de banda, onde o alelo G (209pb) o alelo A (464pb) e a banda controle (623pb). Sendo assim, buscamos modificar a temperatura de anelamento e as concentrações dos “primers” para a obtenção das bandas desejadas nessa reação. Na segunda tentativa, obtivemos sucesso neste processo ao conseguir observar as três bandas esperadas para essa reação.

Após iniciamos os testes com gene MC4R, polimorfismo rs11872992.

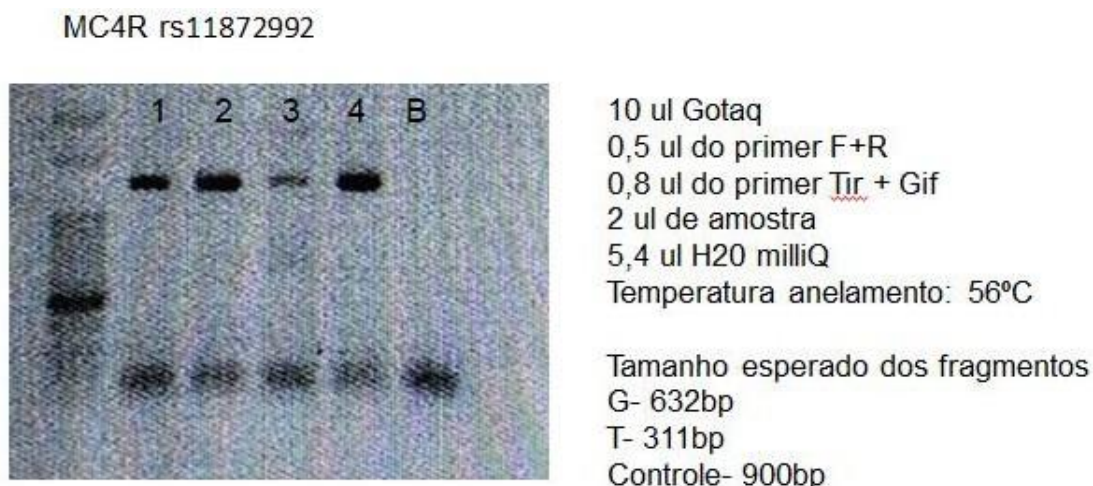
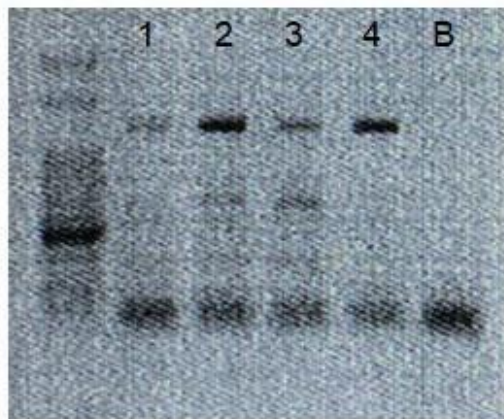


Figura 5. PCR MC4R (rs11872992) temperatura de anelamento a 56°C “primers” R+F+Tir+Gif. Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 4 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Somente apareceu a banda controle de 900 pb nesse primeiro teste.

Após foi realizado novo teste se diminuindo a temperatura de anelamento dos “primers”.

MC4R rs11872992



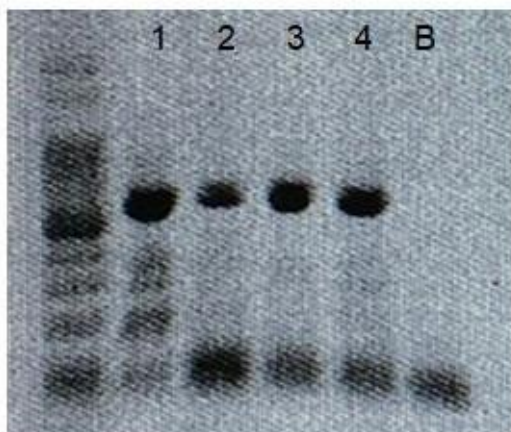
10 ul Gotaq
0,5 ul dos primers F+R
0,8 ul dos primers Tir + Gif
2 ul de amostra
5,4 ul H2O milliQ
Temperatura anelamento: 54°C

Tamanho esperado dos fragmentos
G- 632bp
T- 311bp
Controle- 900bp

Figura 6. PCR MC4R (rs11872992) temperatura de anelamento a 54°C “primers” R+F+Tir+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). Podemos ver o aparecimento da banda controle de 900 pb e da banda de 632 pb (alelo G), a banda de 311 pb (alelo T) não apareceu.

Foi realizado novo teste com mudança dos ciclos no termociclar, onde teve a criação de um ciclo específico para esse polimorfismo, onde as amostras foram colocadas a 95°C por 5 minutos, após 10 ciclos de 95°C por 1 minutos, 60°C por 1 minutos e 72°C por 1 minuto. Após foram submetidas a mais 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minutos e 72°C por 1 minuto e após um último ciclo de 72°C por 5 minutos.

MC4R rs11872992



10 ul Gotaq
1 ul dos primers F+R
1 ul dos primers Tir + Gif
2 ul de amostra
4 ul H2O milliQ
Ciclo 60-56°C

Tamanho esperado dos fragmentos
G- 632bp
T- 311bp
Controle- 900bp

Figura 7. PCR MC4R (rs11872992) temperatura de anelamento a 60-56°C “primers” R+F+Tir+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). Somente apareceu a banda controle de 900 pb e alguns borrões na amostra 1.

Foi realizado novo teste com esse mesmo ciclo, mudando as concentrações dos “primers”, onde se obteve o resultado desejado.

MC4R rs11872992

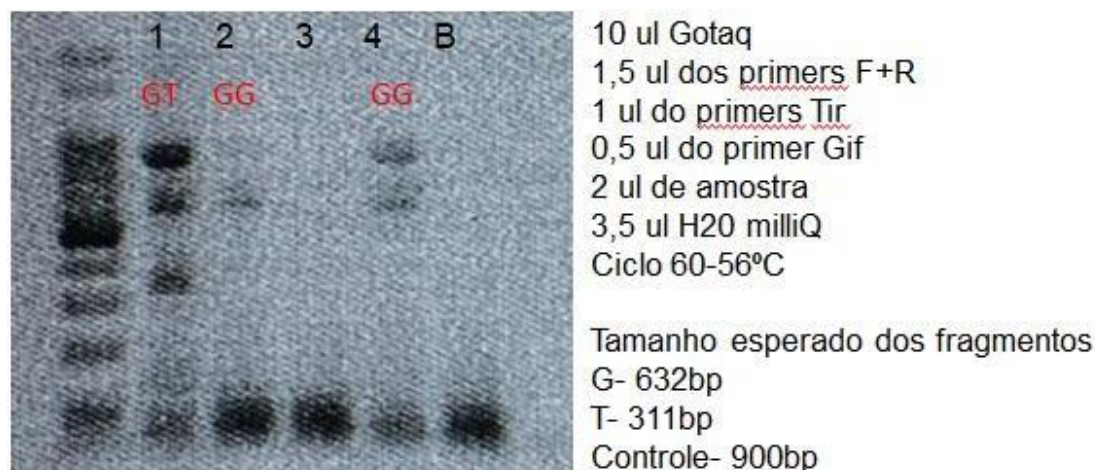


Figura 8. PCR MC4R (rs11872992) temperatura de anelamento a 60-56°C “primers” R+F+Tir+Gif. Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 4 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Na amostra 1 foram formadas as bandas de 209 pb (alelo G), a banda de 311 pb (alelo T) e a banda controle de 900 pb (genótipo GC). Nas amostras 2 e 4 formadas as bandas de 632 pb (alelo G) e a banda controle de 900 pb (genótipo GC). Na amostra 3 não se formaram as bandas, provavelmente por degradação do DNA. Os diagnóstico de cada amostra, estão em vermelho na imagem a cima.

A padronização do gene MC4R, polimorfismo rs11872992, pode ser observado nas figuras 5, 6, 7 e 8. No primeiro teste realizado se observou somente uma das três bandas esperadas. Essa reação foi projetada para amplificar três diferentes tamanhos de banda, onde o alelo G (623pb) o alelo T (311pb) e a banda controle (900pb). Com isso, foi realizado novo teste, onde se mudou a temperatura de anelamento, somente observou-se a formação de duas das três bandas esperadas. Devido a esse resultado, foi realizada a montagem de um novo protocolo de PCR no termociclador para que os “primers” conseguissem se ligarem da forma correta. No primeiro teste desse ciclo não se obteve o resultado esperado, devido a isso, foi mudada a concentração dos “primers”, onde nessa tentativa se obteve os três tamanhos de bandas esperados nessa reação.

Então, começamos a testagem do polimorfismo rs10830963 do gene MTNR1B, se iniciou os testes com a temperatura de anelamento em 60°C e 0,5 ul de cada um dos “primers”.

MTNR1B rs10830963



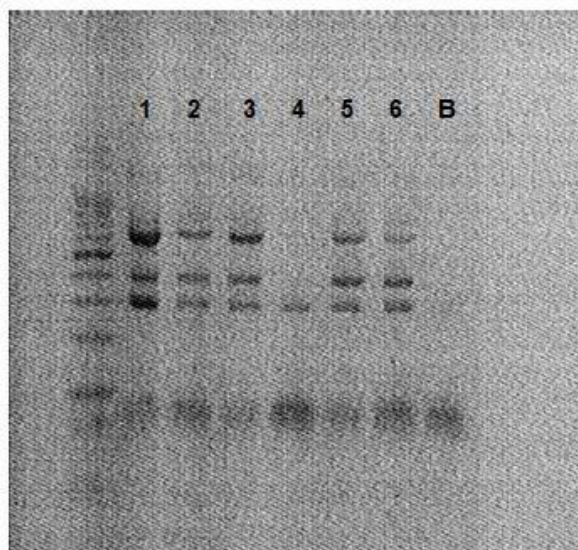
10 ul Gotag
0,5 primers F, R, CIF e GIR
2 ul amostra
6 ul H2O miliq
Temperatura anelamento
60°C
Gel 1%

Tamanho esperado de fragmentos
Controle = 667 BP
C = 413 BP
G = 302 BP

Figura 9. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura de anelamento a 60°C “primers” R+F+Cif+Gir. 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 5 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Foram observadas as três bandas esperadas.

Após esse primeiro teste, viu-se que as bandas ficaram bastante desalinhadas, mas apareceram todos os tamanhos de banda desejados, então foi feito um novo teste mantendo a concentração dos “primers” utilizada e se elevando a temperatura de anelamento em 62°C.

MTNR1B rs10830963



10 ul Gotag
0,5 primers F, R, CIF e GIR
2 ul amostra
6 ul H2O miliq
Temperatura anelamento
62°C
Gel 2%

Tamanho esperado de fragmentos
Controle = 667 BP
C = 413 BP
G = 302 BP

Figura 10. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura de anelamento a 62°C “primers” R+F+Cif+Gir. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Foram observadas as três bandas esperadas.

Após esse novo teste utilizando a temperatura de anelamento em 62°C e o gel de agarose na concentração de 2%, as bandas ficaram mais nítidas e do tamanho esperado, mas ainda foi feito um novo teste utilizando a temperatura de anelamento em 64°C, para obter-se uma diferenciação do genótipo entre as amostras.

MTNR1B rs10830963



10 ul Gotag
0,5 primers F, R, CIF e GIR
2 ul amostra
6 ul H2O miliq
Temperatura anelamento 64°C
Gel 2%

Tamanho esperado de fragmentos
Controle = 667 BP
C = 413 BP
G = 302 BP

Figura 11. PCR MTNR1B (rs10830963) temperatura de anelamento a 64°C “primers” R+F+Gir+Cif. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Na amostra 1 foram formadas a banda de 413 pb (alelo C), a banda de 302 pb (alelo G) e a banda controle de 667 pb (genótipo GC). Nas amostras 2, 3, 5 e 6 foram formadas as bandas de 413 pb (alelo C) e a banda controle de 667 pb (genótipo CC). Na amostra 4 se formou somente a banda 302 pb (genótipo GG). Os diagnósticos de cada amostra estão em vermelho na imagem a cima.

A testagem de padronização do gene MTNR1B do polimorfismo rs10830963, pode ser observada nas figuras 9, 10 e 11. Na primeira reação vimos que se formaram as três bandas esperadas, mas ainda estavam desalinhadas. Essa reação foi projetada para amplificar três diferentes tamanhos de banda, onde o alelo G (302pb) o alelo A (413pb) e a banda controle (667pb). Sendo assim, buscamos modificar a temperatura de anelamento dos “primers” para a obtenção das bandas desejadas nessa reação. Na segunda tentativa, obtivemos uma melhora na visão das bandas

esperadas, já na terceira tentativa foi obtido o sucesso na padronização desse polimorfismo, podendo assim conseguir fazer o diagnóstico de cada amostra.

Após foi dado o início aos testes do gene CYBA, polimorfismo rs4673 se utilizando a temperatura de anelamento de 62°C:

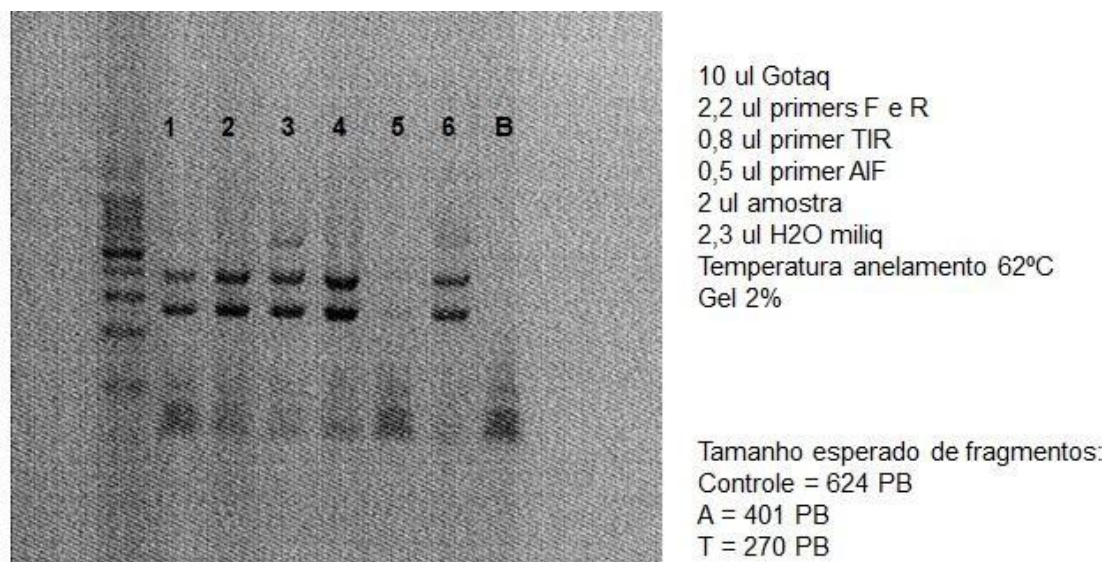


Figura 12. PCR CYBA (rs4673) temperatura de anelamento a 62°C “primers” R+F+Tir+Aif. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). As bandas de 401 pb (alelo A) e de 270 pb (alelo T) foram visualizadas no gel, a banda controle de 624 pb apareceu fracamente.

Após esse primeiro teste, vimos que a banda controle pareceu fracamente em algumas amostras e em outras não foi possível observá-la, já as bandas dos alelos “A” e “T” apareceram em quase todas as amostras, então foi reajustada a concentração dos “primers” e aumentada a temperatura de anelamento.

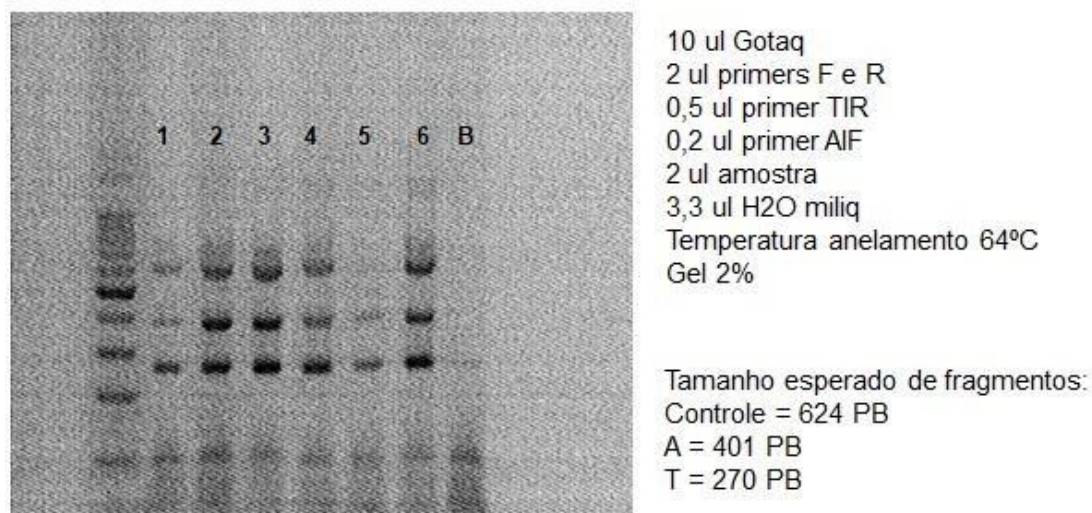


Figura 13. PCR CYBA (rs4673) temperatura de anelamento a 64°C “primers” R+F+Tir+Aif. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Foi possível observar todos os tamanhos de bandas esperadas.

No teste usando a temperatura de anelamento de 64°C podemos observar todos os tamanhos de bandas esperados, mas não se obteve diferenciação entre as amostras para poder diferenciar cada genótipo, então foi feito um novo teste se elevando a temperatura.

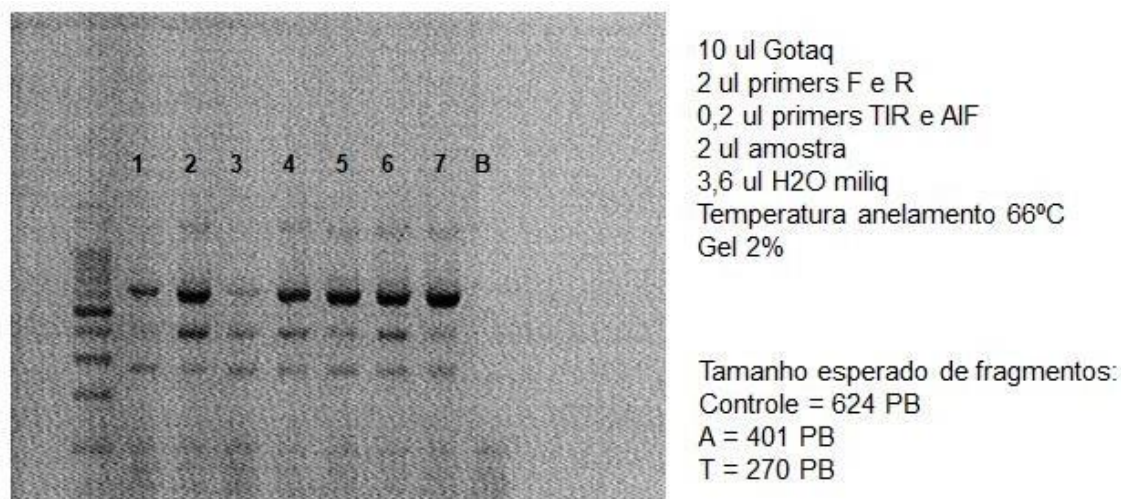


Figura 14. PCR CYBA (rs4673) temperatura de anelamento a 66°C “primers” R+F+Tir+Aif. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Foi possível observar todos os tamanhos de bandas esperadas.

Neste novo teste se utilizando a temperatura de anelamento de 66°C podemos observar todos os tamanhos de bandas esperados novamente, mas não se obteve diferenciação entre as amostras para poder diferenciar cada genótipo, então foi feito um novo teste se elevando a temperatura de anelamento para 68°C.

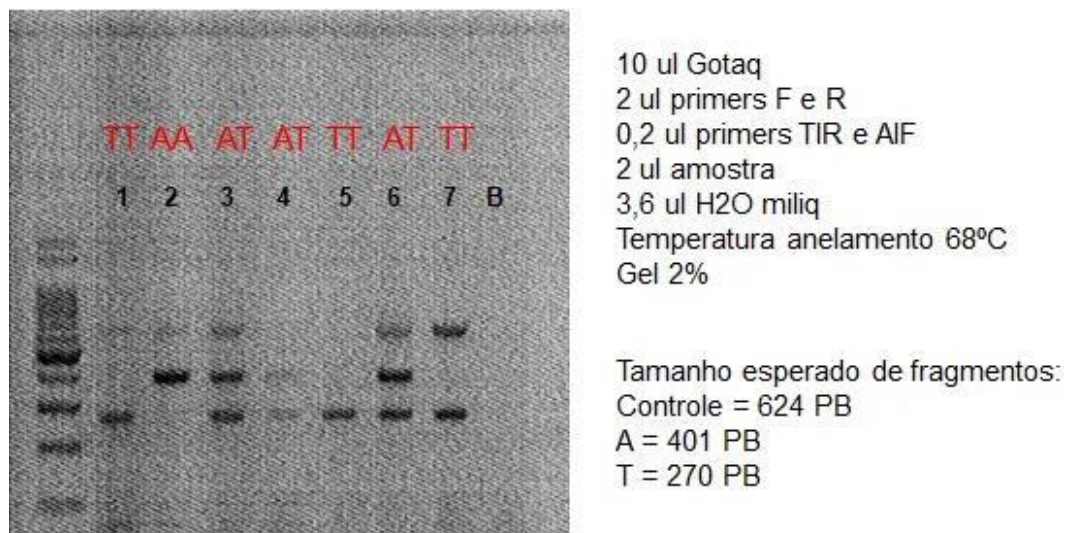


Figura 15. PCR CYBA (rs4673) temperatura de anelamento a 68°C “primers” R+F+Tir+Aif. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Ludwig, USA). Nesta reação foram utilizadas 6 amostras mais o branco (amostra sem DNA). Nas amostras 1 e 7 foram formadas a banda de 270 pb (alelo T), a banda controle de 624 pb (genótipo TT). Nas amostras 3 e 6 foram formadas as bandas de 401 pb (alelo A), a banda de 207 pb (alelo T) e a banda controle de 624 pb (genótipo AT). Na amostra 2 foram observadas a banda de 401 pb (alelo A) e a banda controle de 624 pb (genótipo AA). Na amostra 4 foram observadas as bandas de 270 pb (alelo T) e a banda de 401 pb (alelo A), sendo genótipo AT. Na amostra 5 foi observada somente a banda de 270 pb (alelo T), sendo genótipo TT. Os diagnósticos de cada amostra estão em vermelho na imagem a cima.

Podendo ser observada a padronização do polimorfismo rs4673 do gene CYBA nas figuras 12, 13, 14 e 15. Essa reação foi projetada para amplificar três diferentes tamanhos de banda, onde o alelo T (270pb) o alelo A (401pb) e a banda controle (624 pb). Após alguns testes, se obteve a padronização deste polimorfismo se utilizando a temperatura de anelamento de 68°C foi obtida todas as bandas esperadas e foi possível a diferenciação do genótipo de cada uma amostras. Com esse resultado, foi possível fazer o pedido de patente junto ao INPI.

6. Discussão

Neste estudo, após a realização de várias tentativas de padronização dos polimorfismos por meio de reações de PCRs contendo os polimorfismos de nucleotídeo único rs3813627, rs11872992 e rs10830963 e rs4673 dos genes APOA2, MC4R, MTNR1B e CYBA respectivamente, foram obtidos resultados satisfatórios gerando assim a possibilidade de proteção do método junto ao INPI. A acurácia das reações foi conferida utilizando o método de sequenciamento de Sanger, onde todas deram 100% de resultado satisfatório, indo de acordo com o diagnóstico encontrado em todos os PCR de padronização dos polimorfismos citados a cima.

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 satisfatórios 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, rs11872992, rs10830963 e rs4673.

Nos últimos cinco anos, o uso de tecnologias genéticas e genômicas em pesquisas e cuidados clínicos cresceram de forma acelerada. A disponibilidade de grandes bases de dados genéticos/genômicos, aliada a análises imparciais de variantes em coortes com obesidade de início precoce, possibilitou a identificação e a caracterização de variantes genéticas raras e comuns associadas à obesidade. Nesse mesmo período, também se observou um aumento na realização de testes voltados à obesidade monogênica, seja em contextos clínicos, biobancos ou coortes familiares. No entanto, ainda é necessário compreender melhor a relevância clínica de variantes heterozigotas e de significado incerto detectadas nesses testes (ZUCCARO et al., 2024). Uma pesquisa recente, realizada por Roberts et al. (2023) com médicos que utilizam testes genéticos para obesidade monogênica observou dificuldades na interpretação de relatórios de testes genéticos em atendimento clínico.

A investigação do perfil poligênico tem sido amplamente estudada por pesquisadores e laboratórios para aprofundar a compreensão sobre a influência genética na manifestação de fenótipos específicos e no

desenvolvimento de diversas doenças. Essa abordagem permite identificar um grande número de genes e variações genéticas em cada indivíduo, fornecendo uma base sólida para a personalização de tratamentos e estratégias de prevenção. Com essas informações, profissionais da saúde podem desenvolver abordagens mais precisas, promovendo uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes.

Na área da nutrição, os testes poligênicos representam uma ferramenta essencial para avaliar o metabolismo energético e a assimilação de nutrientes, possibilitando intervenções nutricionais mais eficazes, podendo fazer o planejamento alimentar personalizado de acordo com o perfil genético de cada paciente. Dessa forma, contribuem para a redução da obesidade e para a promoção da saúde e do bem-estar de maneira personalizada e baseada em evidências científicas.

Após a pesquisa em sites de venda de kits de genotipagem, verificou-se que ainda não há kits específicos para a detecção de genes associados à obesidade. Diante disso, o desenvolvimento de um kit voltado à avaliação da predisposição à obesidade e suas comorbidades torna-se altamente relevante. Utilizando os polimorfismos padronizados neste estudo, esse kit poderá facilitar tanto o diagnóstico quanto a prevenção da obesidade e doenças a ela relacionadas, cujo crescimento tem sido expressivo nos últimos anos. Além disso, a prevenção por meio de testes genéticos é essencial para a saúde pública, contribuindo para a redução dos custos com o tratamento de doenças crônicas.

Atualmente, os testes genéticos relacionados à obesidade ainda são pouco acessíveis no mercado, tornando sua implementação especialmente relevante para a detecção precoce e o suporte ao tratamento médico e nutricional. A genética ainda é uma área de acesso restrito, devido ao alto custo e à disponibilidade limitada na rede pública. Diante desse cenário, é fundamental impulsionar o crescimento e a expansão dessa área, adotando técnicas mais acessíveis e viáveis para implementação por profissionais da saúde.

Este trabalho buscou desenvolver um kit diagnóstico simples, eficiente e de baixo custo, capaz de testar simultaneamente variações genéticas relevantes associadas à obesidade e suas comorbidades. A partir dessas

informações, busca-se a criação de um perfil poligênico individual, analisando a combinação dos genótipos e sua influência na predisposição a essas condições. Essa abordagem contribui para estratégias mais personalizadas de prevenção e tratamento, promovendo uma melhor qualidade de vida para os indivíduos.

O kit diagnóstico segue em desenvolvimento, com a análise de diferentes tecnologias para selecionar as mais eficientes e viáveis para aplicação comercial, podendo assim ser utilizado por profissionais de saúde, proporcionando diagnósticos mais precisos e aprimorando o cuidado com os pacientes.

7. Conclusão

Os polimorfismos padronizados neste estudo revelaram um grande potencial para a criação de um kit diagnóstico inovador, capaz de identificar predisposições à obesidade e suas comorbidades de forma mais precisa. Além disso, sua aplicação na análise do perfil genético permite mapear variantes associadas a fenótipos ligados à obesidade, viabilizando abordagens terapêuticas mais personalizadas e eficazes. Com isso, abre-se caminho para estratégias de intervenção mais assertivas, promovendo uma significativa melhora na qualidade de vida dos pacientes. Notavelmente, este estudo também resultou na concessão de duas patentes para os polimorfismos rs3813627 e rs11872992, dos genes APOA2 e MC4R, respectivamente, além do pedido de patente para o polimorfismo rs10830963 e rs4673 do gene MTNR1B e CYBA reforçando sua relevância científica e potencial de inovação na medicina personalizada.

8. Referências bibliográficas

- ADAMSKA-PATRUNO, E., GOSCIK, J., CZAJKOWSKI, P., MALISZEWSKA, K., CIBOROWSKI, M., GOLONKO, A., GORSKA, M. (2019). The MC4R genetic variants are associated with lower visceral fat accumulation and higher postprandial relative increase in carbohydrate utilization in humans. *European journal of nutrition*, 58(7), 2929-2941.
- ARAKI, S. APOE polymorphism and diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* (2014) 18:230-233.
- AKBARIAN, S. A., SALEHI-ABARGOUEI, A., POURMASOUMI, M., KELISHADI, R., NIKPOUR, P., HEIDARI-BENI, M. (2018). Association of Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms with body mass index: A systematic review and meta-analysis. *Advances in medical sciences*, 63(1), 43-56.
- 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.
- AMIN, T., MERCER, J. G. Hunger and satiety mechanisms and their potential exploitation in the regulation of food intake. *Current Obesity Report* 2016; (5):106-112.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. [Acesso 2021 julho 21]. Disponível em: < <https://abeso.org.br/> >
- BAKHASHAB, S., FILIMBAN, N., ATALL, R. M., NASSIR, R., QUSTI, S. Y., ALGAHTANI, M. H., DALLOL, A. (2020). The effect sizes of PPAR γ rs1801282, FTO rs9939609, and MC4R rs2229616 variants on type 2 diabetes mellitus risk among the western saudi population: a cross-sectional prospective study. *Genes*, 11(1), 98.
- BATARFI, A. A., FILIMBAN, N., BAJOUH, O. S., DALLOL, A., CHAUDHARY, A. G., BAKHASHAB, S. MC4R variants rs12970134 and rs17782313 are associated with obese polycystic ovary syndrome patients in the Western region of Saudi Arabia. *BMC Medical Genetics* (2019) 20:144.
- BECKERS, S., ZEGERS, D., de FREITAS, F., MERTENS, I. L., VAN GAAL, L. F., VAN HUL, W. (2011). Association study of MC4R with complex obesity and replication of the rs17782313 association signal. *Molecular genetics and metabolism*, 103(1), 71-75.
- BOUGHANEM, H., BANDERA-MERCHÁN, B., HERNÁNDEZ-ALONSO, P.; MORENO-MORALES, N., TINAHONES, F. J., LOZANO, J., MORCILLO, S., MACIAS-GONZALEZ, M. Association between the APOA2 rs3813627 Single

Nucleotide Polymorphism and HDL and APOA1 Levels Through BMI. *Biomedicines* 2020, 8, 44.

CHUANG, L. Y., YANG, C. H., TSUI, K. H., CHENG, Y. H., CHANG, P. L., WEN, C. H., ET AL. (2008). Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research*, 28(4), 2001-2007.

COSTA J. Real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:299-304.

CROVESY, L., ROSADO, E. L. Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity. *Nutrition* 2019: 1-5.

DAVOLI, R., BRAGLIA, S., VALASTRO, V., ANNARRATONE, C., COMELLA, M., ZAMBONELLI, P., NISI, I., GALLO, M., BUTTAZZONI, L., RUSSO, V. Analysis of MC4R polymorphism in Italian Large White and Italian Duroc pigs: Association with carcass traits. *Meat Science* 90 (2012) 887-892.

DE LUIS, D. A., IZAOLA, O., PRIMO, D., ALLER, R. (2018). Association of the rs10830963 polymorphism in melatonin receptor type 1B (MTNR1B) with metabolic response after weight loss secondary to a hypocaloric diet based in Mediterranean style. *Clinical Nutrition*, 37(5), 1563-1568.

ELLINGSGAARD, H., HAUSELMANN, I., SCHULER, B., et al. (2011) Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat. Med.* 17, 1481-1489.

FATIMA, M. T., AHMED, I., FAKHRO, K. A., AKIL, A. S. A. S. (2022). Melanocortin-4 receptor complexity in energy homeostasis, obesity and drug development strategies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 24(4), 583-598.

FLORES-DORANTES, M. T., DÍAZ-LÓPEZ, Y. E., GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. (2020). Environment and gene association with obesity and their impact on neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 863.

FONSECA, A. C. P., ABREU, G. de M., ZEMBRZUSKI, V. M., CAMPOS JUNIOR, M., CARNEIRO, J. R. I., MAGNO, F. C. C. M., ROSADO, E. L., NETO, J. F. N., CEBELLO, G. M. K., CABELLO, P. H. Identification of the MC4R start lost mutation in amorbidly obese Brazilian patient. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2019; (12): 257-266.

FONSECA-PORTILLA, R., KRELL-ROESCH, J., SHAIBI, G. Q., CASELLI, R. J., MANDARINO, L. J., ZANG, N., HENTZ, J. G., COLETTA, D. K., FILIPPIS, E. A., DAWIT, S., GEDA, Y. E. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Associations with Metabolism and Physical Activity in a Latino Sample. *Metabolic syndrome and related disorders* 2019;17:(2):75-80.

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.

GONI, L., CUERVO, M., MILAGRO, F. I., MARTÍNEZ, J. A. Gene-Gene Interplay and Gene-Diet Interactions Involving the MTNR1B rs10830963 Variant with Body Weight Loss. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2014;7:232-42.

HINUY, H. M., HIRATA, M. H., FORTI, N., DIAMENT, J., SAMPAIO, M. F., ARMAGANIJAN, D., SALAZAR, L. A.; HIRATA, R. D. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52 611-616, 2008.

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.

KLEN, J., GORICAR, K., JANEZ, A., DOLZAN, V. (2015). NLRP3 inflammasome polymorphism and macrovascular complications in type 2 diabetes patients. *Journal of diabetes research*, 2015.

KOOCHAKPOOR, G., DANESHPOUR, M. S., MIRMIRAN, P., HOSSEINI, S. A., HOSSEINI-ESFAHANI, F., SEDAGHATIKHAYAT, B., AZIZI, F. (2016). The effect of interaction between Melanocortin-4 receptor polymorphism and dietary factors on the risk of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*, 13(1), 1-9.

KOTANIDOU, E. P., KALINDERI, K., KYRGIOS, I., EFRAIMIDOU, S., FIDANI, L., PAPADOPOULOU-ALATAKI, E., EBORIADOU-PETIKOPOULOU, M., GALLI-TSINOPOULOU, A. (2015). Apelin and G212A apelin receptor gene polymorphism in obese and diabese youth. *Pediatric obesity*, 10(3), 213-219.

LIN, R. C., WANG, W. Y., MORRIS, B. J. High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: Case-control study. *Brit Med J*. 1999;319(7221):1337-1338.

LOGAN, J., & EDWARDS, K. J. (2009). An overview of PCR platforms. Real-time PCR: current technology and applications. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 7-22.

LUTHRA, R., & JEFFREY MEDEIROS, L. (2006). TaqMan® Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Coupled With Capillary Electrophoresis for Quantification and Identification of bcr-abl Transcript Type. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*, 135-145.

MA, X. Y., QIAO, W., SMITH, C. E., PAMELL, L. D., JIANG, Z. Y., ORDOVAS, J. M., TUCKER, K. L., LAI, C. Q. Association between BDNF rs6265 and Obesity in the Boston Puerto Rican Health Study. *Journal of Obesity* 2012.

MARCOS-PASERO, H., AGUILAR-AGUILAR, E., IGLESIA, E. L.; ESPINOSA-SALINAS, I., OMEZ-PATI, M. G., COLMENAREJO, G., MOLINA, A. R., REGLERO, G., LORIA-KOHEN, V. Association of calcium and dairy product

consumption with childhood obesity and the presence of a Brain Derived Neurotrophic Factor-Antisense (BDNF-AS) polymorphism. *Clinical Nutrition* 2019; 38(6): 2616-2622.

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.

MARTI, A., OCHOA, C., SÁNCHEZ-VILLEGAS, A., MARTINEZ, J. A. Meta-analysis on the effect of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor gene (GRL) on human obesity. *BMC Med Genet*. 2006;7:50.

MARTINS, M. C., TRUJULLO, J., FREUTAS-VILELA, A. A., FARIAS, D. R., ROSADO, E. L., STRUCHINER, C. J., KAC, G. (2018). Associations between obesity candidate gene polymorphisms (fat mass and obesity-associated (FTO), melanocortin-4 receptor (MC4R), leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR)) and dietary intake in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 120(4), 454-463.

MARTÍNEZ-EZQUERRO, J. D., RENDÓN-MACÍAS, M. E., ZAMORA-MENDOZA, G., SERRANO-MENESES, J., ROSALES-RODRÍGUEZ, B., ESCALANTE-BAUTISTA, D., ROSAS-VARGAS, H. (2017). Association between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and overweight/obesity in pediatric population. *Archives of medical research*, 48(7), 599-608.

MOHAMMED, J. S., VEERAPEN, M. K., NG, Z. Y., HONG, R. L. L. Association of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Variant (rs6265) with Overweight/Obesity or Overfatness, and Effect of Physical Activity Levels in Adolescents Population. *International Journal of Science and Research* 2014: 3.

MORENO, M. U., SAN JOSÉ, G., FORTUÑO, A., BELOQUI, Ó., DÍEZ, J., & ZALBA, G. (2006). The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *Journal of hypertension*, 24(7), 1299-1306.

MULLER, Y. L., THEARLE, M. S., PIAGGI, P., HANSON, R. L., HOFFMAN, D., GENE, B., BAIER, L. J. (2014). Common genetic variation in and near the melanocortin 4 receptor gene (MC4R) is associated with body mass index in American Indian adults and children. *Human genetics*, 133(11), 1431-1441.

NAKAMURA, K., NAKAMURA, Y. Hunger and satiety signaling: modeling two hypothalamomedullary pathways for energy homeostasis. *BioEssays* 2018; 40:1-8.

NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTAÑO, M. J., & SOLERA, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.

PALIZBAN, A. A.; YAZDANI, A. H.; JAHANBANI-ARDAKANI, H. Role of rs7903146 polymorphism and adipon serum level in patients with diabetes

mellitus; a case-control study from Isfahan, Iran. *The Journal of Metabolic Diseases*. 1381-3455 (Print) 1744-4160.

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.

PLATAKI, M. N., ZERVOU, M. I., SAMONIS, G., DARAKI, V., GOULIELMOS, G. N., KOFTERIDIS, D. P. Association of the Interleukin-6 rs1800795 Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus in the Population of the Island of Crete, Greece. *Genetic testing and molecular biomarkers*. Volume 22, Number 7, 2018.

PRADHAN, A. D., MANSON, J. E., RIFAI, N., et al. (2001) C-Reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334.

PRIMO, D., IZAOLA, O., LUIS, D. Leptin gene polymorphism (rs 7799039;G2548A) is associated with changes in lipid profile during a partial meal-replacement hypocaloric diet *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 34(2), 456-463.

POURGHOLI, L., POURGHOLI, F., ZIAEE, S., GOODARZYNEJAD, H., HOSSEINDOKHT, M., BOROUMAND, M., MANDEGARY, A. (2020). The association between CYBA gene C242T variant and risk of metabolic syndrome. *European journal of clinical investigation*, 50(9), e13275.

RANA, S., SULTANA A, BHATTI AA. Association of BDNF rs6265 and MC4R rs17782313 with metabolic syndrome in Pakistanis. *Journal of Biosciences* 2019; 44:(95).

RANA, S., MIRZA, S.; RAHMANI, S. The BDNF rs6265 variant may interact with overweight and obesity to influence obesityrelated physical, metabolic and behavioural traits in Pakistani individuals. *Annals of Human Biology* 2018:45.

ROBERTS, K. J., CHAVES, E., ARIZA, A. J., THAKER, V. V., CHO, C. C., BINNS, H. J. Exploring Genetic Testing for Rare Disorders of Obesity: Experience and Perspectives of Pediatric Weight Management Providers. *Child Obes* 2024 DOI: 10.1089/chi.2023.0125.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., & ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.

SCHOCHETMAN, G., OU, C. Y., & JONES, W. K. (1988). Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*, 158(6), 1154-1157.

SCHREIBER, R., FERREIRA-SAE, M. C., TUCUNDUVA, A. C., MILL, J. G., COSTA, F. O., KRIGER, J. E., NADRUZ JR, W. (2012). CYBA C242T polymorphism is associated with obesity and diabetes mellitus in Brazilian hypertensive patients. *Diabetic Medicine*, 29(7), e55-e61.

SHAHID, A., RANA, S. MAHMOOD, S., SAEED, S. Role of leptin G-2548A polymorphism in age- and gender-specific development of obesity. *J. Biosci.* 40(3), September 2015.

SHEN, J., GE, W., ZHANG, J., ZHU, H. J., FANG, Y. (2014) Leptin -2548g/a gene polymorphism in association with antipsychotic-induced weight gain: a meta-analysis study. *Psychiatr Danub* 26, 145-151.

SUSTAR, A., NIKOLAC PERKOVIC, M., NEDIC ERJAVEC, G., SVOB STRAC, D., PIVAC, N. (2016). A protective effect of the BDNF Met/Met genotype in obesity in healthy Caucasian subjects but not in patients with coronary heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(16), 3417-3426.

TAILLEUX, A.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J. C.; CLAVEY, V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 164 (2002) 1 - 13.

VARGHESE, G. P., FRANSEN, K., HURTIG-WENNLOF, A., BENGTSSON, T., JANSSON, J. H., SIRSSJO, A. Q705K variant in NLRP3 gene confers protection against myocardial infarction in female individuals. *Biomedical reports*, v. 1, n. 6, p. 879-882, 2013.

VEGA, J. A., SALAZAR, G., HODGSON, M. I., CATALDO, L. R., VALLADARES, M., OBREGÓN, A. M., SANTOS, J. L. (2016). Melanocortin-4 receptor gene variation is associated with eating behavior in Chilean adults. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 68(1), 35-41.

WANG, S., SONG, J., YANG, Y., CHAWLA, N. V., MA, J., WANG, H. (2017). Rs12970134 near MC4R is associated with appetite and beverage intake in overweight and obese children: A family-based association study in Chinese population. *PloS one*, 12(5), e0177983.

WU, L., GAO, L., ZHAO, X., ZHANG, M., WU, J., MI, J. (2017). Associations of two obesity-related single-nucleotide polymorphisms with adiponectin in Chinese children. *International journal of endocrinology*, 2017.

XI, B., GIRIRAJ., CHANDAK. Y. S., QIJUAN, W., DONGHAO, Z. Association between Common Polymorphism near the MC4R Gene and Obesity Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos one*, September (2012) v. 7, v.9.

YANG, Y., GAO, X., TAO, X., GAO, Q., ZHANG, Y., & YANG, J. (2019). Combined effect of FTO and MC4R gene polymorphisms on obesity in children and adolescents in Northwest China: a case-control study. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 28(1), 177-182.

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.

YE, S., HUMPHRIES S., GREEN F. (1992). Allele specific amplification by tetra-primer PCR. *Nucleic Acids Research*. n.20; v.5; p.1152.

YOSHIDA, S., KUBO, Y., KOBAYASHI, Y., et al. (2015) Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. *Br. J. Ophthalmol.* 99, 960-966

YOUNG, E. H., WAREHAM, N. J., FAROOQI, S., HINNEY, A., HEBEBRAND, J., SCHERAG, A., RAHILLY. S., BARROSO, I., SANDHU, M. S. The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *International Journal of Obesity* (2007) 31, 1437-1441.

ZAMANI, M., HOSSEINI, S. V., BEHROUJ, H., ERFANI, M., DASTGHAIB, S., AHMADI, M., MOKARRAM, P. BDNF VAL66MET genetic variation and its plasma level in patients with morbid obesity: A case-control study. *Gene* 2019.

ZUCCARO, M. V., LEDUC, C. A., & THAKER, V. V. (2024). Updates on rare genetic variants, genetic testing, and gene therapy in individuals with obesity. *Current Obesity Reports*, 13(3), 626-641.

9. Anexos



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 003293 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: epitte@ufpel.edu.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Método para genotipagem do polimorfismo rs3813627 do gene APOA2

Resumo: A presente invenção apresenta um método caracterizado por usar quatro iniciadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para a amplificação de fragmentos de DNA que identificam o polimorfismo rs3813627 do gene APOA2, através da reação em cadeia da enzima DNA-polimerase. O presente método é adequado para a identificação e genotipagem dos alelos G ou T do polimorfismo rs3813627, tornando possível o reconhecimento de indivíduos com maior predisposição genética para desenvolverem obesidade, maior acúmulo de gordura visceral e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Diversos iniciadores foram desenhados com ferramentas de bioinformática e testados em diferentes condições de reação até se alcançar uma condição ótima para o diagnóstico da genotipagem do polimorfismo com uma única reação utilizando os oligonucleotídeos selecionados. A invenção poderá contribuir para identificação dos riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas e obesidade nos indivíduos e contribuir para uma melhor prevenção e tratamento dessas doenças. Este método tem a vantagem, com relação a outros métodos de genotipagem, de ser mais barato e possibilitar a que seja feito em laboratórios comuns de análises clínicas.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: CARLOS CASTILHO DE BARROS

CPF: 11053432860

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Praça Cel. Pedro Osório 104, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-015

País: BRASIL

Telefone: (53) 991 924081

Fax:

Email: barrosccpel@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: AMANDA BARBOSA ATRIB

CPF: 02730607080

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Gonçalves Chaves 374, ap. 402, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-560

País: BRASIL

Telefone: (51) 996 923361

Fax:

Email: amanda_b_atrib@hotmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: MARCELLO DE SOUZA ALVES

CPF: 16253106767

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Gal. Osório 860, ap. 101, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-000

País: BRASIL

Telefone: (21) 966 725565

Fax:

Email: alvesmarcello420@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: CLÉDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA

CPF: 02802114069

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Dr. João Pessoa 361, ap 401, bl A, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-470

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 380360

Fax:

Email: clediajag@gmail.com

Inventor 5 de 5

Nome: ALICE KÜNZGEN SCHEER

CPF: 03427409031

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Nilo Peçanha 120, ap 404, bl B

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96055-410

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 144150

Fax:

Email: alicekunzgen@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	RESUMO_APOA2.pdf
Reivindicação	REINVIDICACOES_APOA.pdf
Relatório Descritivo	DESCRITIVO_APOA2.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Desenho	sequencias.pdf

Sequências Biológicas

- ☒ Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	sequencias.txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 003301 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: epitte@ufpel.edu.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Método para genotipagem do polimorfismo rs11872992 do gene MC4R

Resumo: A presente invenção apresenta um método caracterizado por usar quatro iniciadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para a amplificação de fragmentos de DNA que identificam o polimorfismo rs11872992 do gene MC4R, através da reação em cadeia da enzima DNA-polimerase. O presente método é adequado para a identificação e genotipagem dos alelos G ou A do polimorfismo rs11872992, tornando possível o reconhecimento de indivíduos com maior predisposição genética para desenvolverem obesidade, aumento do IMC, aumento do percentual de gordura corporal, aumento da ingestão de alimentos e diminuição do gasto energético. Diversos iniciadores foram desenhados com ferramentas de bioinformática e testados em diferentes condições de reação até se alcançar uma condição ótima para o diagnóstico da genotipagem do polimorfismo com uma única reação utilizando os oligonucleotídeos selecionados. A invenção poderá contribuir para identificação dos riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas e obesidade nos indivíduos e contribuir para uma melhor prevenção e tratamento dessas doenças. Este método tem a vantagem, com relação a outros métodos de genotipagem, de ser mais barato e possibilitar a que seja feito em laboratórios comuns de análises clínicas.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: CARLOS CASTILHO DE BARROS

CPF: 11053432860

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua São Borja 1114

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96090-660

País: BRASIL

Telefone: (53) 991 924081

Fax:

Email: barrosccpel@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: AMANDA BARBOSA ATRIB

CPF: 02730607080

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Gonçalves Chaves 374, ap. 402, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-560

País: BRASIL

Telefone: (51) 996 923361

Fax:

Email: amanda_b_atrib@hotmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: MARCELLO DE SOUZA ALVES

CPF: 16253106767

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Endereço residencial completo: Rua Gal. Osório 860, ap. 101, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-000

País: BRASIL

Telefone: (21) 966 725565

Fax:

Email: alvesmarcello420@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: CLÉDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA

CPF: 02802114069

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Dr. João Pessoa 361, ap 401, bl A, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-470

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 380360

Fax:

Email: clediajag@gmail.com

Inventor 5 de 5

Nome: ALICE KU'NZGEN SCHEER

CPF: 03427409031

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Nilo Peçanha 120, ap 404, bl B

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96055-410

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 144150

Fax:

Email: alicekunzgen@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	RESUMO_MC4R992.pdf
Relatório Descritivo	RELATORIO.pdf
Reivindicação	reinvidicacoesMC4R.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Desenho	sequencias.pdf

Sequências Biológicas

- ☒ Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	sequencias.txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2025 005302 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: epitte@ufpel.edu.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Método para genotipagem do polimorfismo rs10830963 do gene MTNR1B

Resumo: A presente invenção, a qual pertence ao setor técnico de biotecnologia aplicada à genética e diagnóstico molecular, apresenta um método caracterizado por usar quatro iniciadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para a amplificação de fragmentos de DNA que identificam o polimorfismo rs10830963 do gene MTNR1B, através da reação em cadeia da enzima DNA polimerase. O presente método é adequado para a identificação e genotipagem dos alelos G ou C do polimorfismo rs10830963, tornando possível o reconhecimento de indivíduos com maior predisposição genética o desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, desregulação no do tecido adiposo, levando à alteração do perfil lipídico. Diversos iniciadores foram desenhados com ferramentas de bioinformática e testados em diferentes condições de reação até se alcançar uma condição ótima para o diagnóstico da genotipagem do polimorfismo com uma única reação utilizando os oligonucleotídeos selecionados. A invenção poderá contribuir para identificação das dos riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas e obesidade nos indivíduos e contribuir para uma melhor prevenção e tratamento dessas doenças.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: CARLOS CASTILHO DE BARROS

CPF: 11053432860

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Trav. um Rual Cel. Alberto Rosa n. 22

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-772

País: BRASIL

Telefone: (53) 991 924081

Fax:

Email: barrosccpel@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: AMANDA BARBOSA ATRIB

CPF: 02730607080

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Gonç,alvez Chaves 374, ap. 402, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-560

País: BRASIL

Telefone: (51) 996 923361

Fax:

Email: amanda_b_atrib@hotmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: CLEDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA

CPF: 02802114069

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Dr. João Pessoa 361, ap 401, bl A, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-470

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 380360

Fax:

Email: clediajag@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: ALICE KUNZGEN SCHEER

CPF: 03427409031

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Nilo Pecanha 120, ap 404, bl B

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96055-410

País: BRASIL

Telefone: (53) 984 144150

Fax:

Email: alicekunzgen@gmail.com

Inventor 5 de 5

Nome: NELSON LUIZ DE LIMA IAHNKE

CPF: 01184104077

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Dr fernando ferrari 257, bloco 257 ap 402

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96085-357

Pafs: BRASIL

Telefone: (53) 985 66920

Fax:

Email: movepelotas@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf
Resumo	Resumo_Corrigido.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio_Descritivo_Corrigido_.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf

Sequências Biológicas

- ☒ Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Listagem de sequências de oligonucl.txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.