

PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO RS9939609 DO GENE FTO POR PCR

ANNIE CAMPELLO TELLES¹; INES SCHADOCK; CARLOS CASTILHO
BARROS³

¹Laboratório de Nutrigenômica - Universidade Federal de Pelotas – annie.ctelles@gmail.com

²Faculdade de Medicina -FURG – i.schadock@ymail.com

³Laboratório de Nutrigenômica - Universidade Federal de Pelotas – barroscapel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A obesidade, condição crônica inflamatória associada ao desenvolvimento de muitas comorbidades como o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e síndrome metabólica se tornou um dos problemas mais sérios de saúde no mundo. A sua ocorrência pode ser atribuída a vários fatores como dieta, atividade física, condições hormonais, fatores culturais, bem como fatores econômicos (EGGER; DIXON, 2014; MANNE; SAAB, 2014; LAVIE et al, 2014)

No entanto, fatores genéticos também contribuem para o fenótipo obesogênico e definem a susceptibilidade e a progressão da obesidade e suas comorbidades (OZANNE, 2015). Neste contexto, um dos genes que tem sido fortemente associado com a obesidade é o gene FTO (fat mass and obesity-related), o qual é expressado no núcleo arqueado do hipotálamo, região de forte relevância sobre o apetite e saciedade. A análise da sua estrutura mostra que este gene está envolvido em modificações pós-traducionais, reparação de ácido desoxirribonucleico e metabolismo de ácidos graxos (GERKEN et al, 2007; ZHAO et al, 2014).

Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) encontrado no primeiro intron do gene FTO (rs9939609) vem demonstrando forte associação com a obesidade, especialmente em portadores do alelo A, e por este motivo tem sido investigado mais do que qualquer outra variante relacionada à obesidade humana (LARDER et al, 2011).

O presente trabalho tem por objetivo descrever um método simples, eficiente e de baixo custo para a genotipagem do polimorfismo rs9939609 do gene FTO usando uma única PCR com quatro primers. Desta forma, se pretende desenvolver uma técnica de alto rendimento para identificação do polimorfismo, e que forneça dados confiáveis para futuros estudos.

2. METODOLOGIA

As amostras de DNA genômico foram obtidas através de células bucais de acordo com Schadock et al. (2015) a partir da raspagem da parede interna da bochecha com swabs estéreis.

A técnica utilizada para genotipagem do polimorfismo do FTO foi a chamada reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figuras 1 e 2), a qual é utilizada em biologia molecular para sintetizar muitas cópias de uma região de interesse do DNA. Em um típico PCR, o material inicial é uma dupla fita de DNA molde. Uma região específica do DNA é amplificada a partir de uma enzima DNA polimerase termoestável chamada *Taq polimerase*. A região a ser copiada pela enzima é determinada pelos primers, que são sequências curtas de nucleotídeos sintetizadas quimicamente e que fornecem o ponto de partida e término da

síntese de DNA. Além disso, são adicionados à reação os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) e os cofatores necessários à ação enzimática. Ao final de repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento, muitas cópias da região de interesse são sintetizadas (HUDSON et al, 1997).



Figura 1 - Região específica do DNA a ser amplificada (REECE et al, 2011).

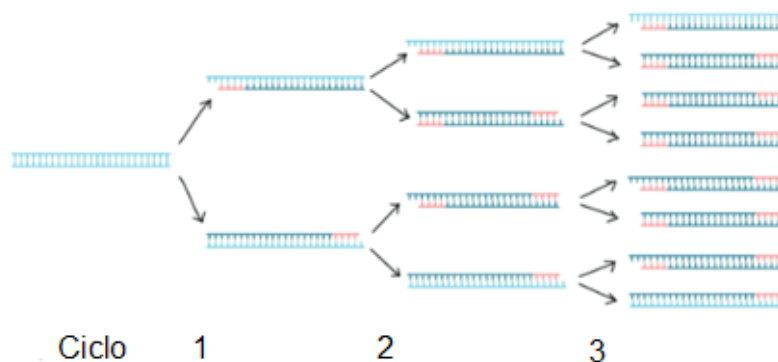


Figura 2 - Padrão de crescimento exponencial da região de interesse do DNA (REECE et al, 2011).

A técnica proposta neste trabalho foi descrita por Ye et al (2001) (Figura 3) e é denominada de tetra-primer ARMS-PCR, a qual utiliza primers alelo-específicos internos, além dos primers externos. Ambos primers internos conferem maior especificidade devido a uma incompatibilidade de bases na posição -2 a partir da extremidade 3' terminal. Tal incompatibilidade é considerada forte devido ao afastamento das bases G/A ou G/T e média devido ao afastamento das bases A/A, C/C OU T/T. O grau desta especificidade é determinado no momento do desenho dos primers.

As concentrações e os volumes dos Primers, bem como os volumes de DNA utilizados foram testados e padronizados. Os primers e o DNA humano foram misturados com GoTaq® Green Master Mix (Cat. M7122; Promega) e as amostras foram submetidas ao PCR em termociclador (Modelo TX25; AmpliTherm Thermal Cycler). As condições ideais de temperatura e tempo das diferentes etapas da PCR para determinação do polimorfismo rs9939609 também foram padronizadas. O produto da PCR foi analisado em eletroforese com gel de agarose com SYBER® Safe (Invitrogen) e comparado a um marcador de comprimento de 100bp (100-bp DNA Ladder; Invitrogen).

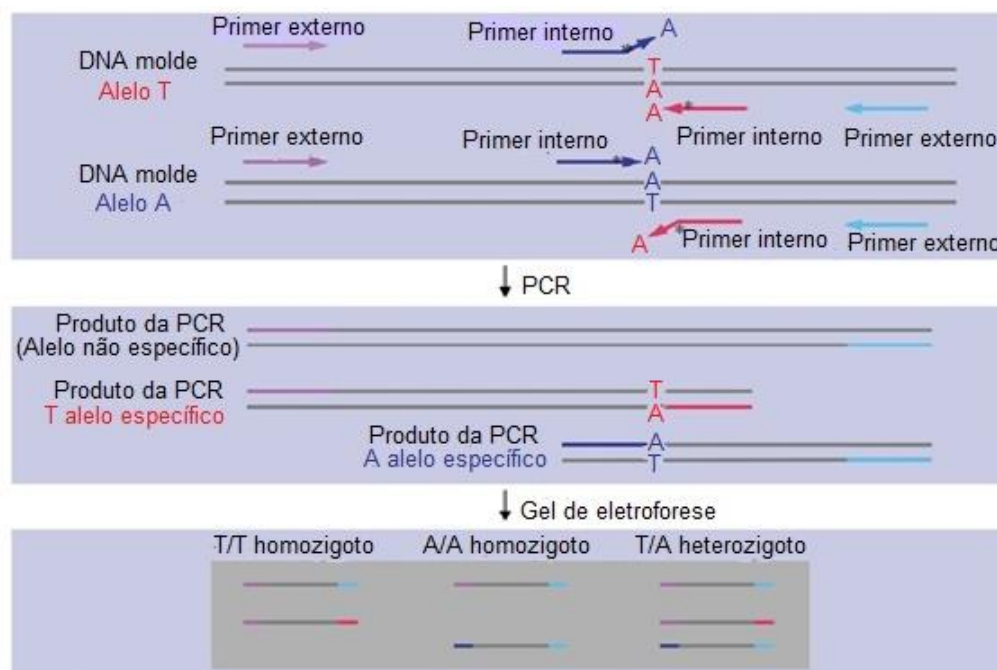


Figura 3. Apresentação esquemática do método tetra-primer ARMS-PCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 4 apresenta o produto da PCR em eletroforese com gel de agarose.

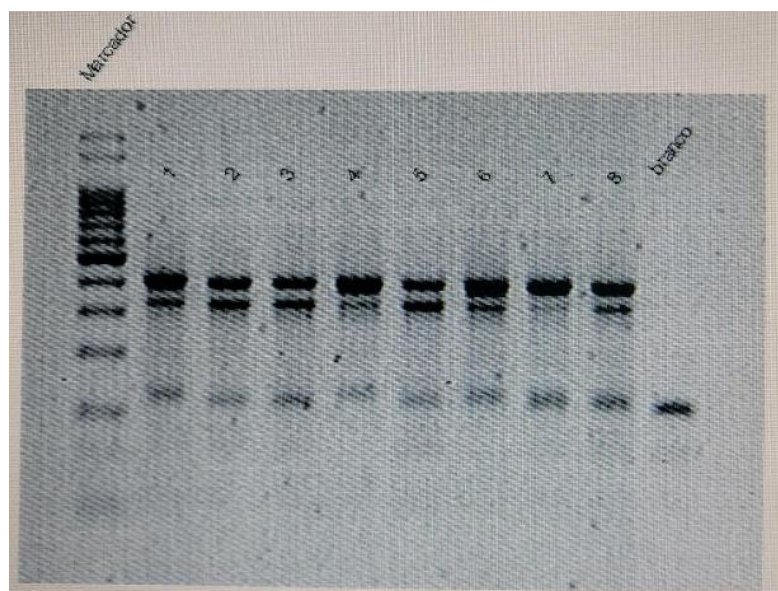


Figura 4. Produto da PCR em gel de eletroforese.

O fragmento do produto da PCR com tamanho de 422 pares de bases foi obtido a partir dos primers externos (alelo não específicos). Os primers internos, por sua vez, são específicos para cada alelo, e produziram um produto de 343 pares de bases na presença do alelo A e 130 pares de bases na presença do alelo T. No entanto, a presença de uma banda não desejada no branco (reação realizada sem amostra de DNA) demonstra que podem ter ocorrido interações intramoleculares entre os próprios primers, o que evidencia a necessidade do desenho de novos oligonucleotídeos e a realização de novos testes.

4. CONCLUSÕES

Foi descrito um método simples e de baixo custo para a genotipagem do polimorfismo rs9939609 do gene FTO usando uma única PCR com quatro primers. No entanto, a fim de garantir que o método forneça dados de estudos confiáveis serão desenhados e testados novos oligonucleotídeos alelo específicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EGGER, G.; DIXON, J. Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants. **BioMed Research International**. P. 1-12, 2014.

GERKEN, T.; GIRARD, C. A.; TUNG, Y. C. L.; WEBBY, C. J.; SAUDEK, V.; HEWITSON, K. S.; YEO, G. S. H.; MCDONAUGH, M. A.; CUNLIFFE, S.; MCNEILL, L. A.; GALVANOVSKIS, J.; RORSMAN, P.; ROBINS, P.; PRIEUR, X.; COLL, A. P.; MA, M.; JOVANOVIC, Z.; FAROOQI, I. S.; SEDGWICK, B.; BARROSO, I.; LINDAHL, T.; POTING, C. P.; ASHCROFT, F. M.; O'RAHILLY, S.; SCHOFIELD, C. J. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate- Dependent Nucleic Acid Demethylase. **Science**. v. 318, n. 5855, p. 1469-1472, 2007.

HUDSON, T. J.; CLARK, C. D.; GSCHWEND, M.; JUSTICE-HIGGINS, E. Development of Genetic Markers. **Current Protocols in Human Genetics**. Unidade 2.5, 1997.

LARDER, R.; CHEUNG, M. M.; TUNG, Y. L.; YEO, G. S. H.; COLL, A. P. Where to go with FTO? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 22, n. 2, p. 53-59, 2011.

OZANNE, S. E. Epigenetic Signatures of Obesity. **The New England Journal of Medicine**. n. 10, p. 973-974, 2015.

REECE, J. B.; URRY, L. A.; Cain, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; JACKSON, R. B. Forensic evidence and genetic profiles. 10th ed., p. 430-431, San Francisco, CA: Pearson, 2011.

SHADOCK, I.; SCHNEIDER, A.; SILVA, E. D.; BUCHWEITZ, M. R. D.; CORREA, M. N.; PESQUERO, J. B.; PAREDES-GAMERO, E. J.; ARAUJO, R. C.; BARROS, C. C. Simple Method to Genotype the ACTN3 r577x Polymorphism. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**. v. 19, n. 5, 2015.

YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A. R.; DAY, I. N. M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**. v. 29, n. 17, p. 1-8, 2001.