



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
LABORATÓRIO DE NUTRIFISIOGENÔMICA
NUTRIÇÃO

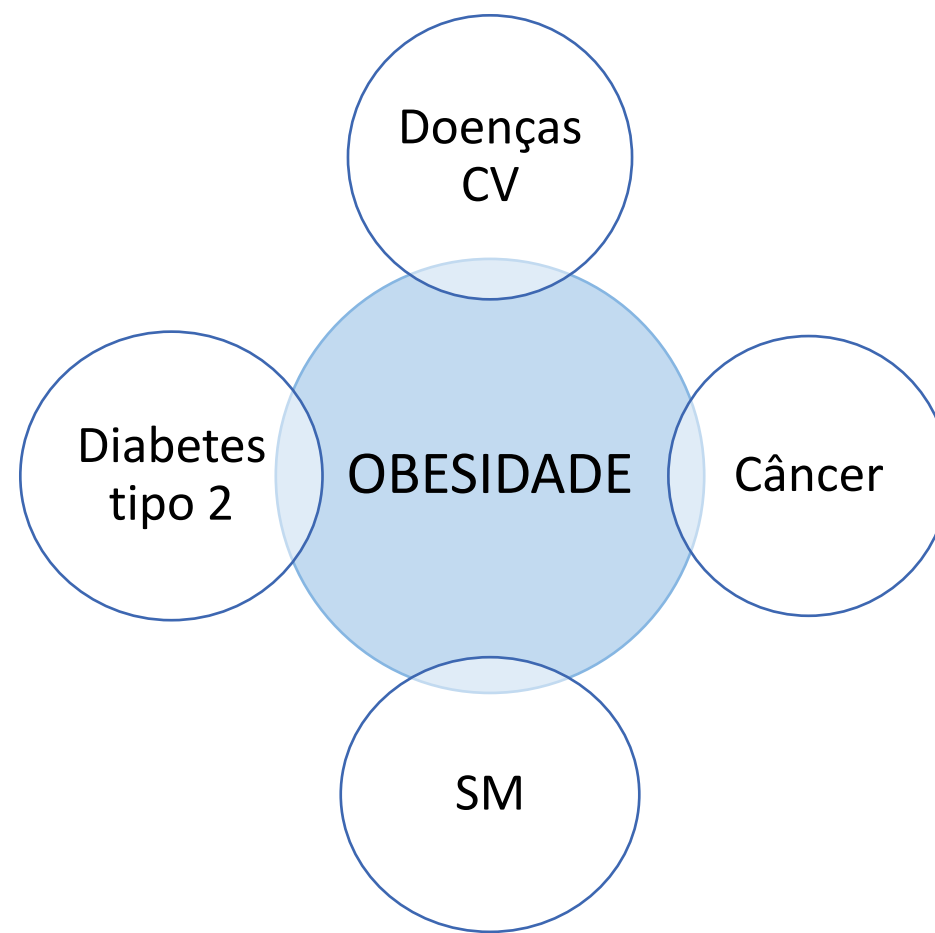
**PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO
POLIMORFISMO RS9939609 DO GENE FTO POR PCR**

Annie Campello Telles

Orientador: Prof. Dr. Carlos Castilho Barros



INTRODUÇÃO



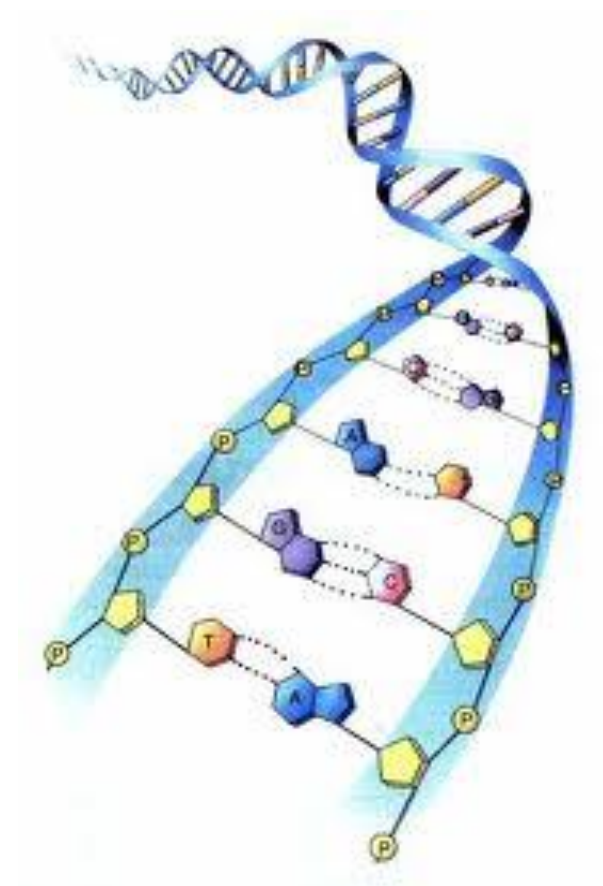


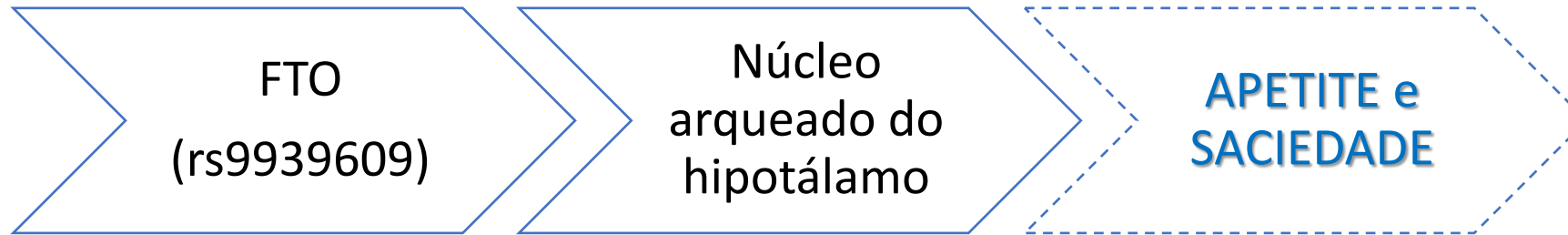
Fatores
genéticos



Fenótipo
obesogênico

- Susceptibilidade
- Progressão
- **OBESIDADE**

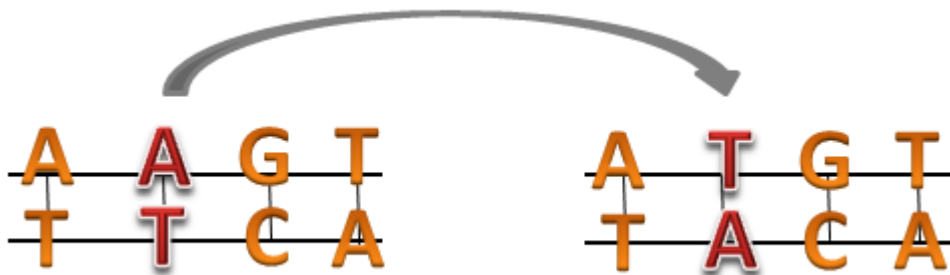




Análise da sua estrutura:

- ❖ Modificações pós-traducionais
 - ❖ Reparação de DNA
- ❖ Metabolismo de ácidos graxos

Polimorfismo rs9939609
Variação de nucleotídeo simples



OBESIDADE

Tem sido investigado mais do que qualquer outra variante relacionada à **obesidade humana**



Genotipagem do
SNP - FTO

```
graph TD; A[Genotipagem do SNP - FTO] --- B[RFLP]; A --- C[PCR tempo real]; A --- D[Sequenciamento];
```

The diagram is a hierarchical tree structure. At the top is the text 'Genotipagem do SNP - FTO'. A horizontal line extends from this text, with three vertical lines branching downwards to three separate nodes. Each node is enclosed in a semi-circular arc. The nodes are labeled 'RFLP', 'PCR tempo real', and 'Sequenciamento' from left to right.

RFLP

PCR tempo real

Sequenciamento

OBJETIVO

Descrever um método simples, eficiente e de baixo custo para a genotipagem do polimorfismo rs9939609 do gene FTO usando duas simples PCR's. Desta forma, se pretende desenvolver uma técnica de alto rendimento para identificação do polimorfismo, e que forneça dados de estudo confiáveis.



METODOLOGIA

Amostras de DNA:

- Células bucais
- Raspagem parede interna bochecha
- Swabs estéreis

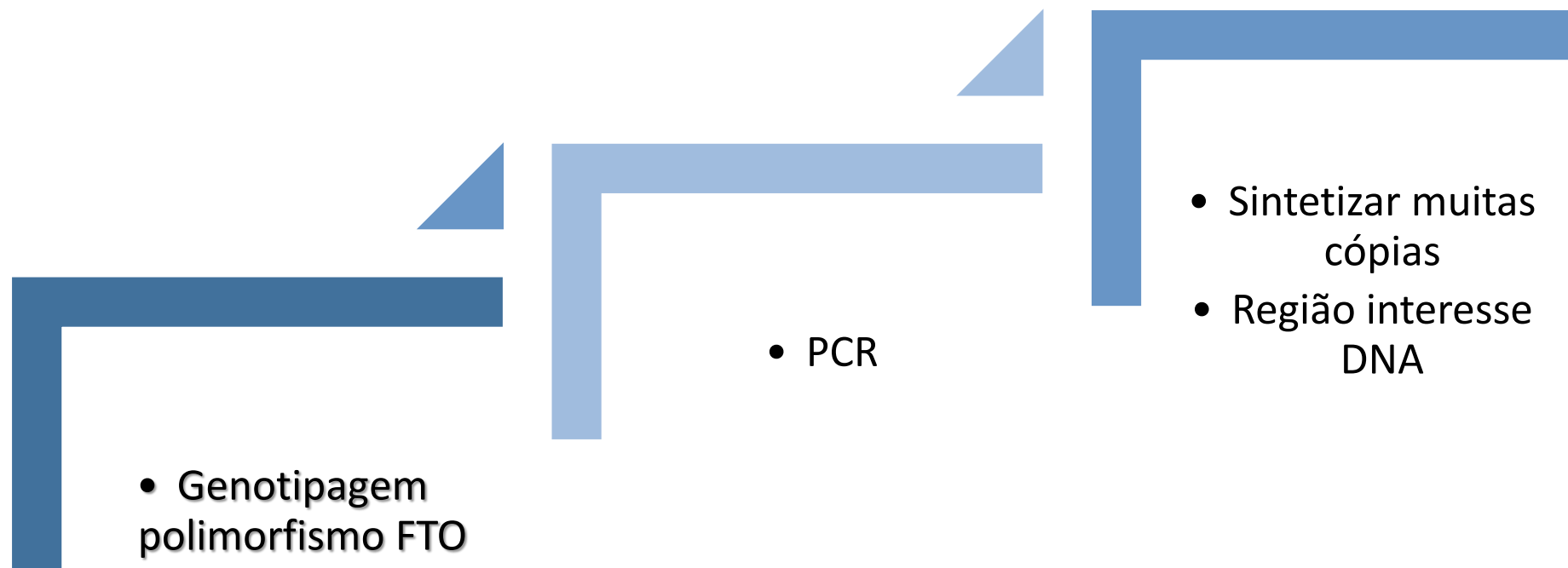


Desenho dos primers:

- GenBank - Blast
- DNA massager - Genome Browser
- SNPedia

Tabela 1. Sequência dos primers alelo não específicos (externos) e primers alelo-específicos (internos).

Nome	Sequência	Tamanho do produto
FTO609F	5'-GAGAGGAGAAAGTGAGCTGTGTGTGC-3'	394 pb com FTO609R
FTO609R	5'-TGCTTTTATGCTCTCCCACTCC-3'	394 pb com FTO609F
FTO609AiR	5'-GACTATCCAAGTGCATCACTA-3'	333 pb com FTO609F
FTO609TiF	5'-TTGCGACTGCTGTGAATTTTG-3'	100 pb com FTO609R



Típico PCR

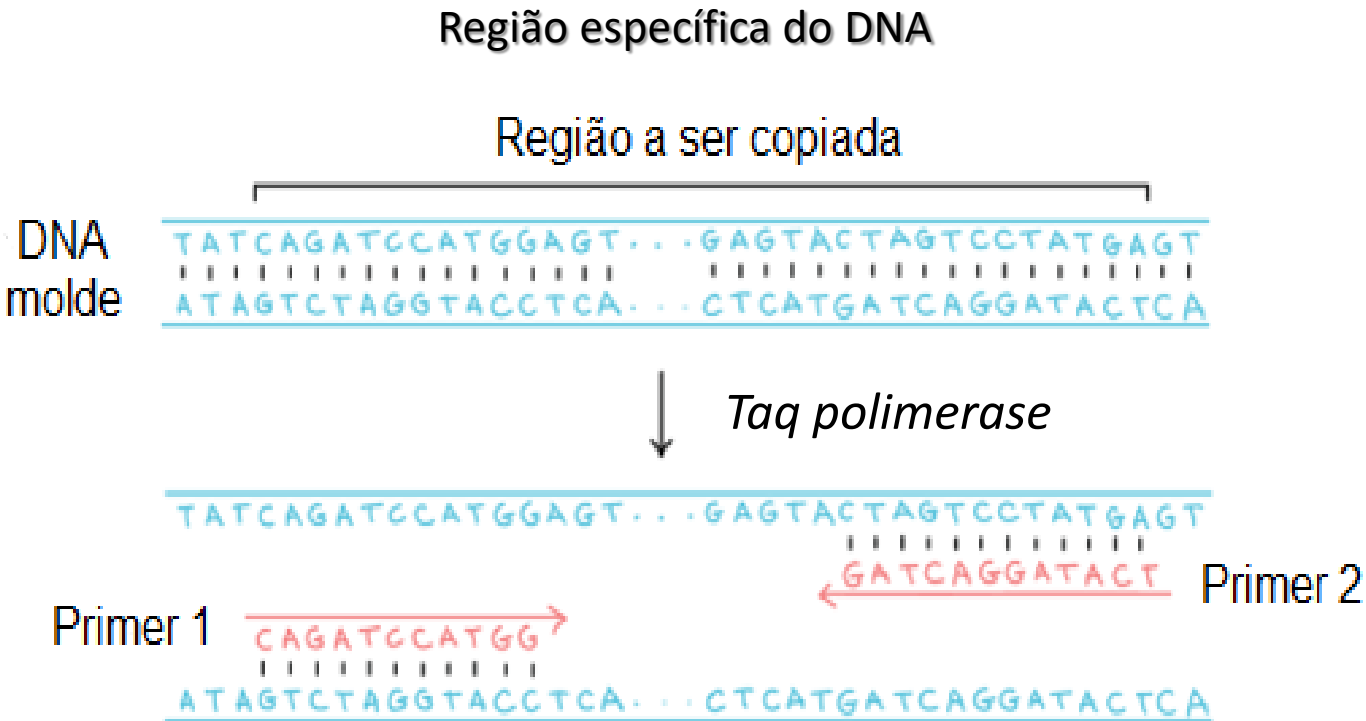


Figura 1 - Região específica do DNA a ser amplificada (REECE et al, 2011).

Típico PCR

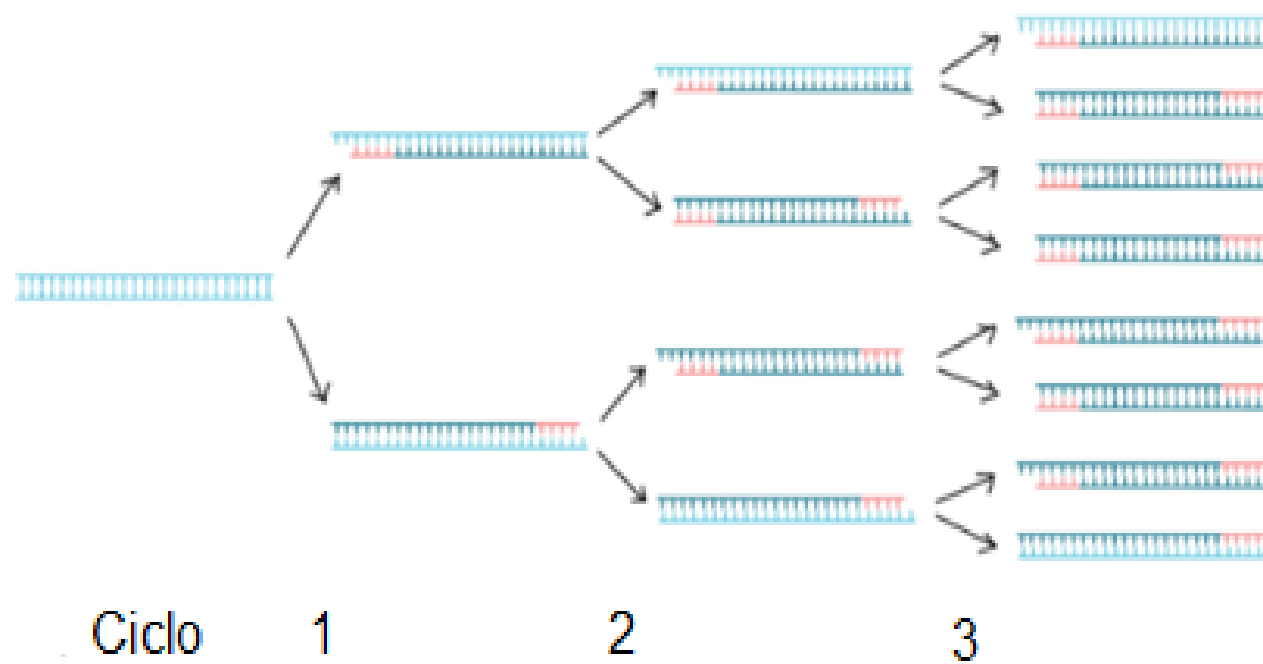
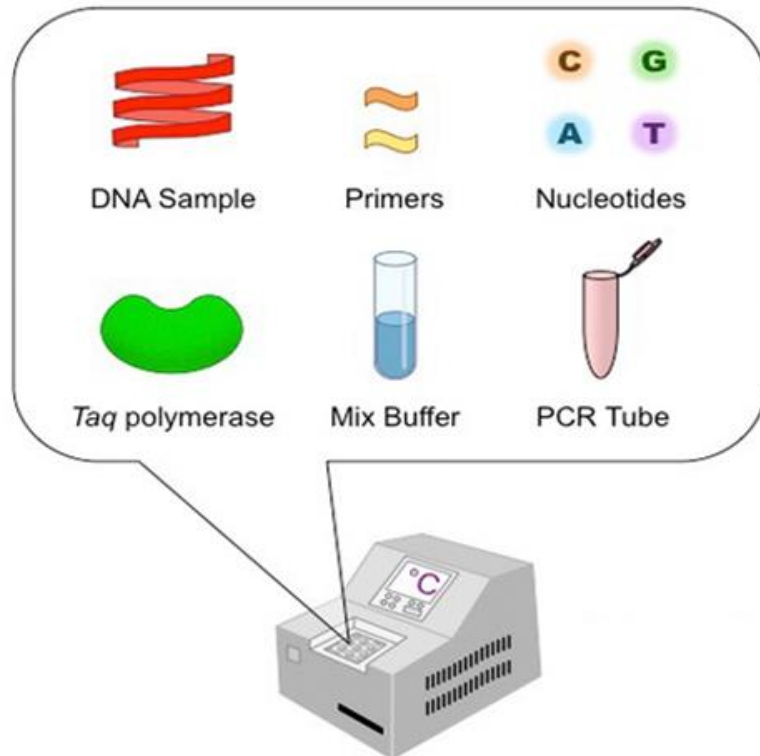


Figura 2 - Padrão de crescimento exponencial da região de interesse do DNA (REECE et al, 2011).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)



Primers + DNA humano + GoTaq® Green Master
Mix → PCR (termociclador)

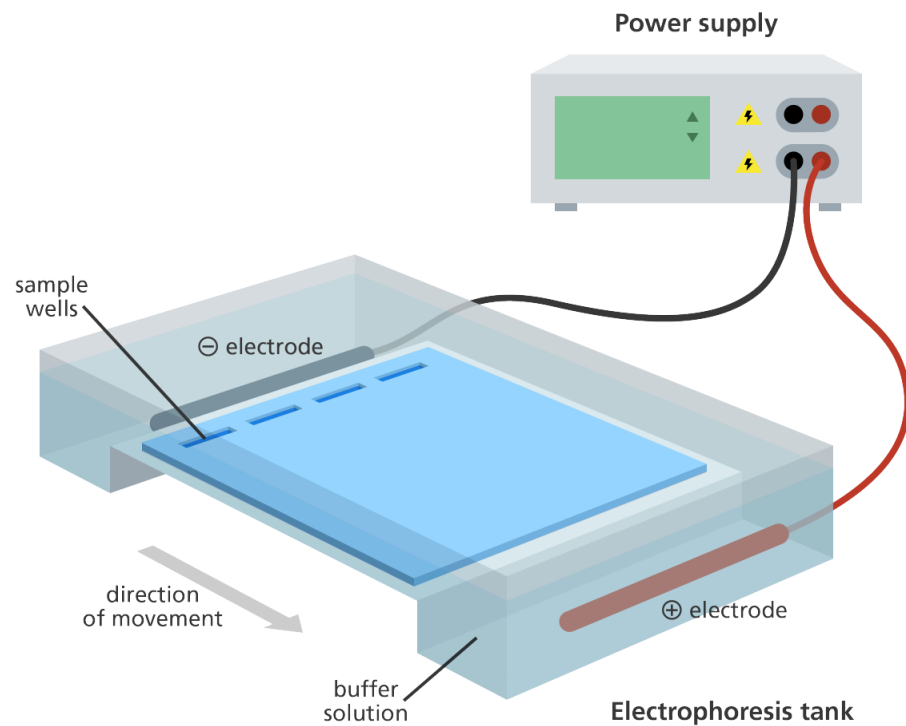
Padronizadas condições ideais:

- Concentração dos primers e temperatura de anelamento

Protocolo da PCR:

Tabela 2. Concentração dos primers e temperaturas de anelamento das PCR's.

	Primers	Concentração (pmol/ μ L)	Temperatura de anelamento ($^{\circ}$ C)
PCR 1	FTO609F e FTO609AiR	10	59
PCR 2	FTO609TiF e FTO609R	20	62
PCR controle	FTO609F e FTO609R	20	62



Produto da PCR :

- Eletroforese com gel de agarose com SYBER[®] Safe
- Marcador de comprimento de 100 pb



RESULTADOS

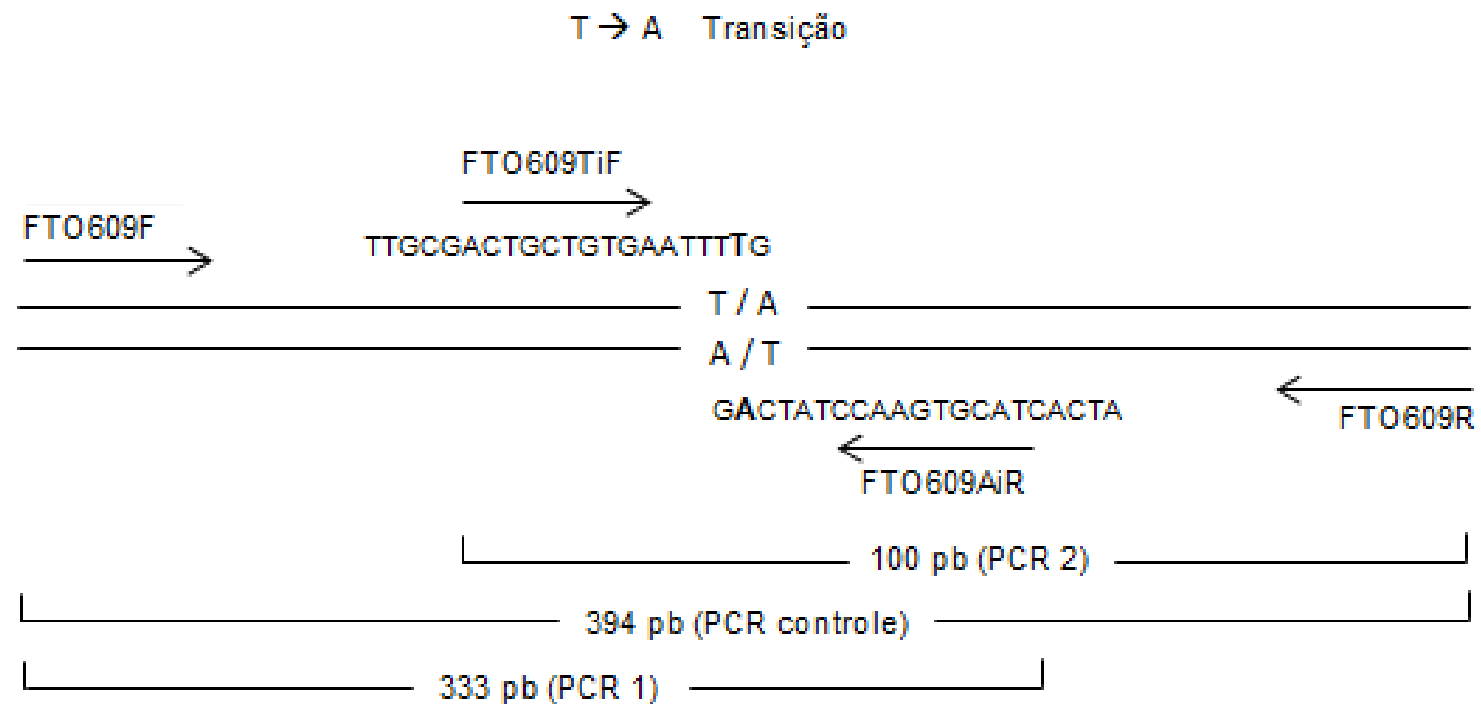


Figura 3. Diagrama das reações em cadeia da polimerase e comprimento dos produtos.

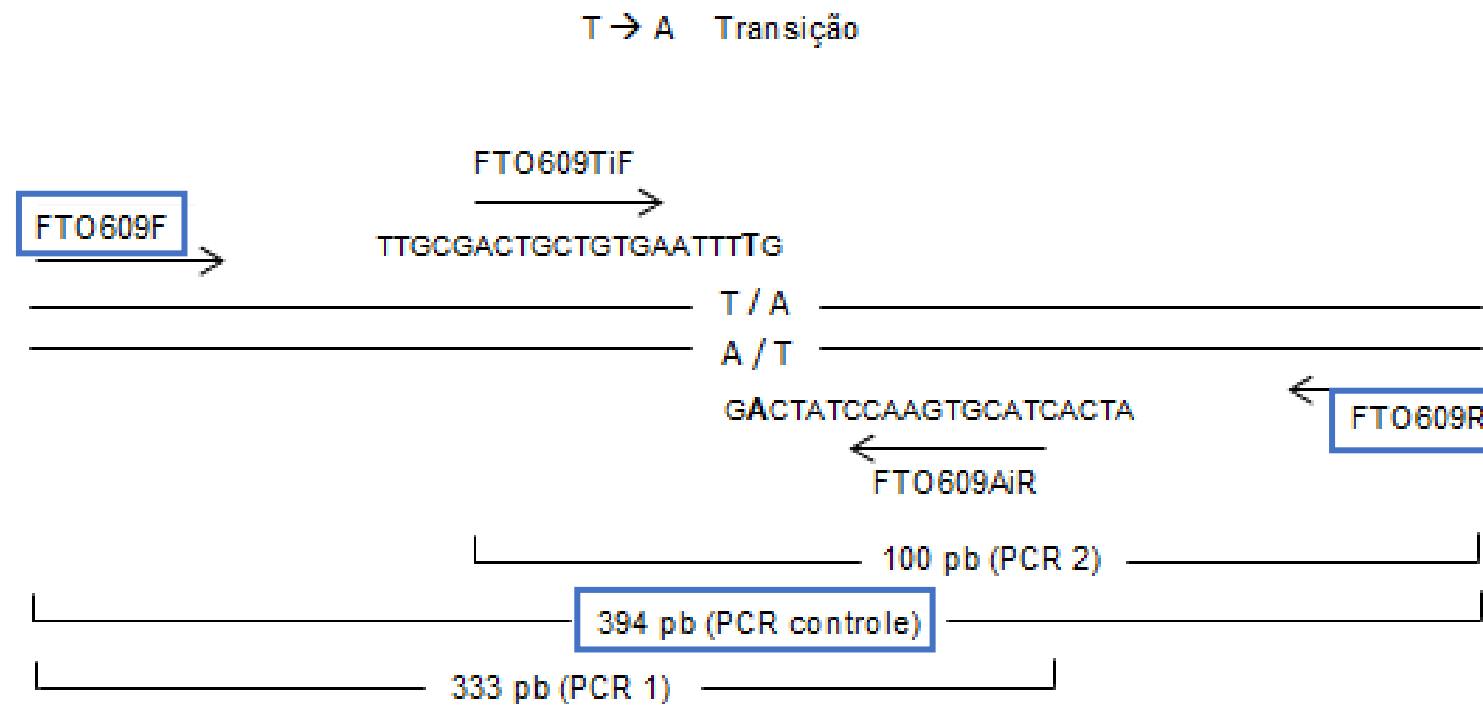


Figura 3. Diagrama das reações em cadeia da polimerase e comprimento dos produtos.

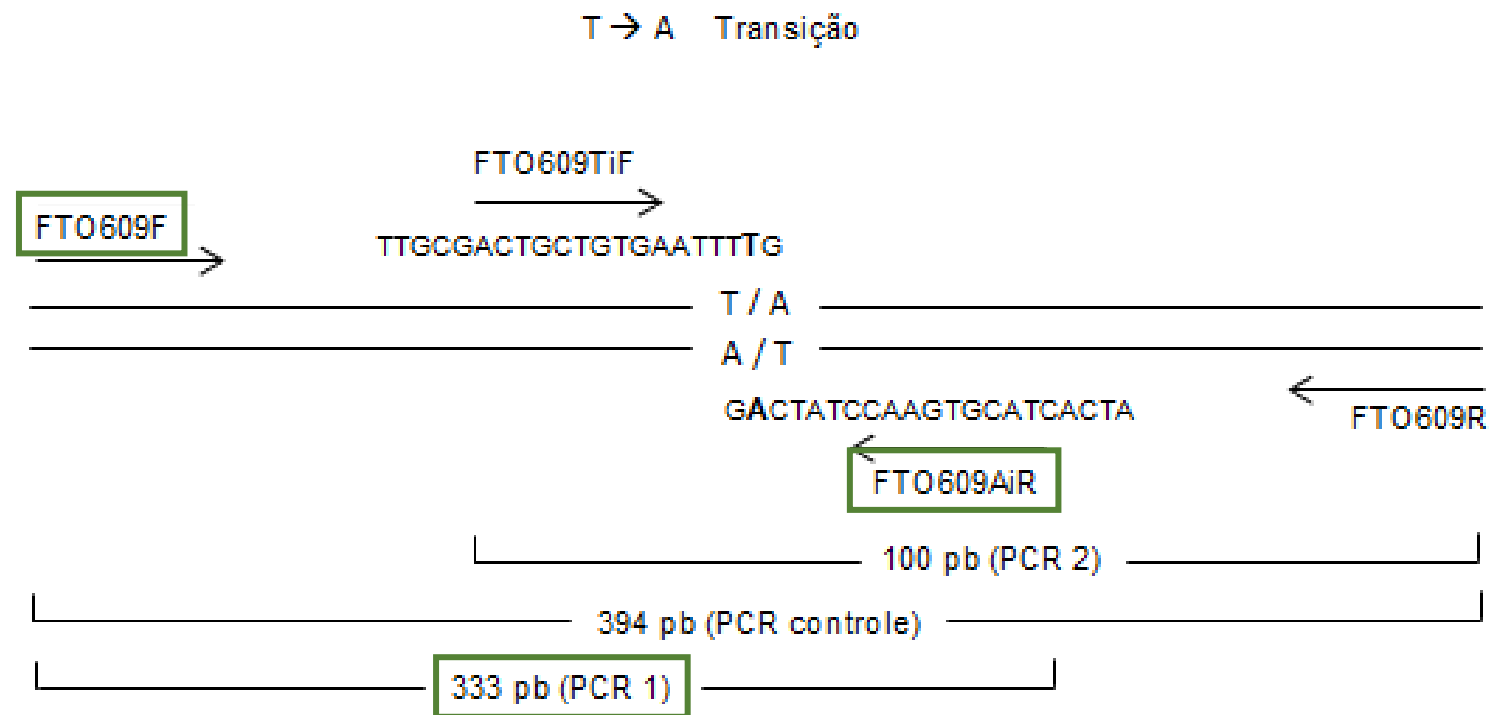


Figura 3. Diagrama das reações em cadeia da polimerase e comprimento dos produtos.

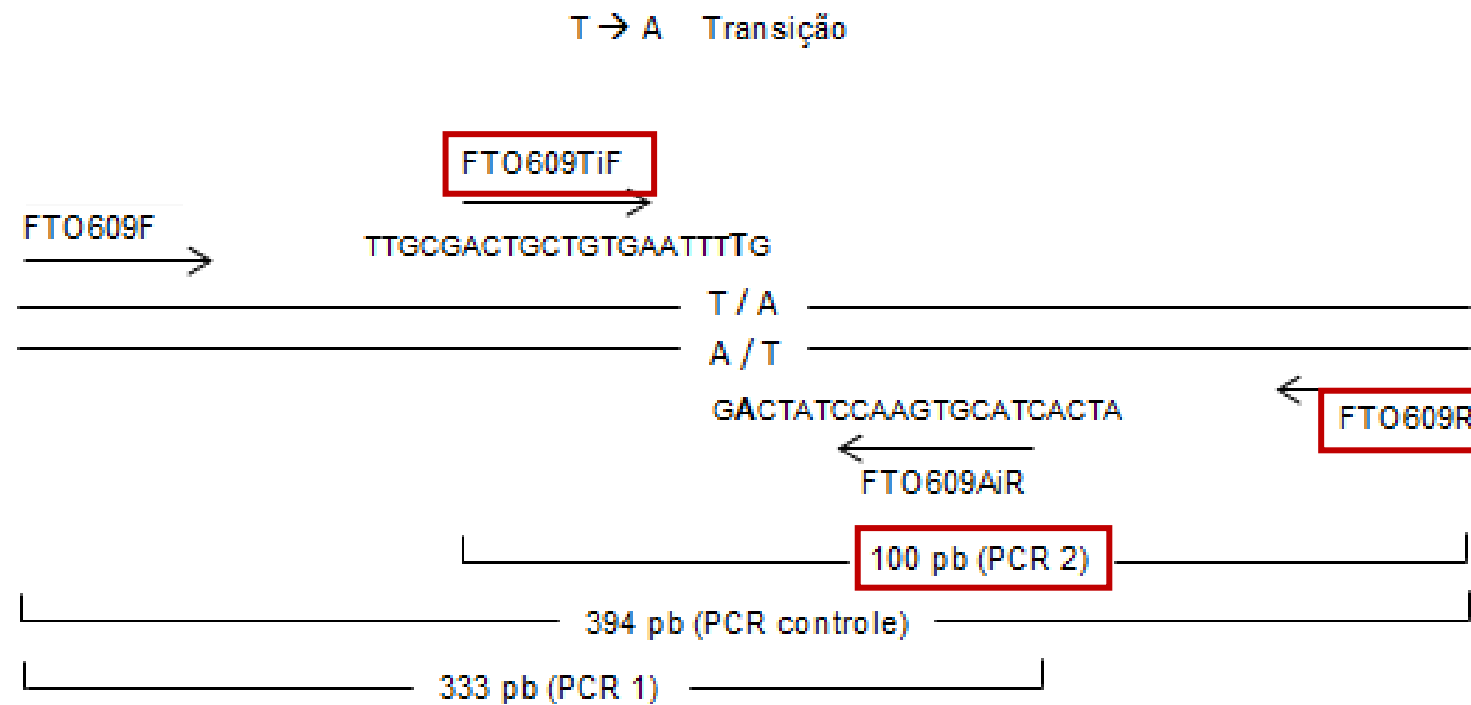


Figura 3. Diagrama das reações em cadeia da polimerase e comprimento dos produtos.

Tabela 3. Condições ideais da PCR 1.

Primers	Concentração (pmol/ μ L)	Temperatura de anelamento ($^{\circ}$ C)
hFTO609F	10,0	59,0
FTO609AiR	10,0	

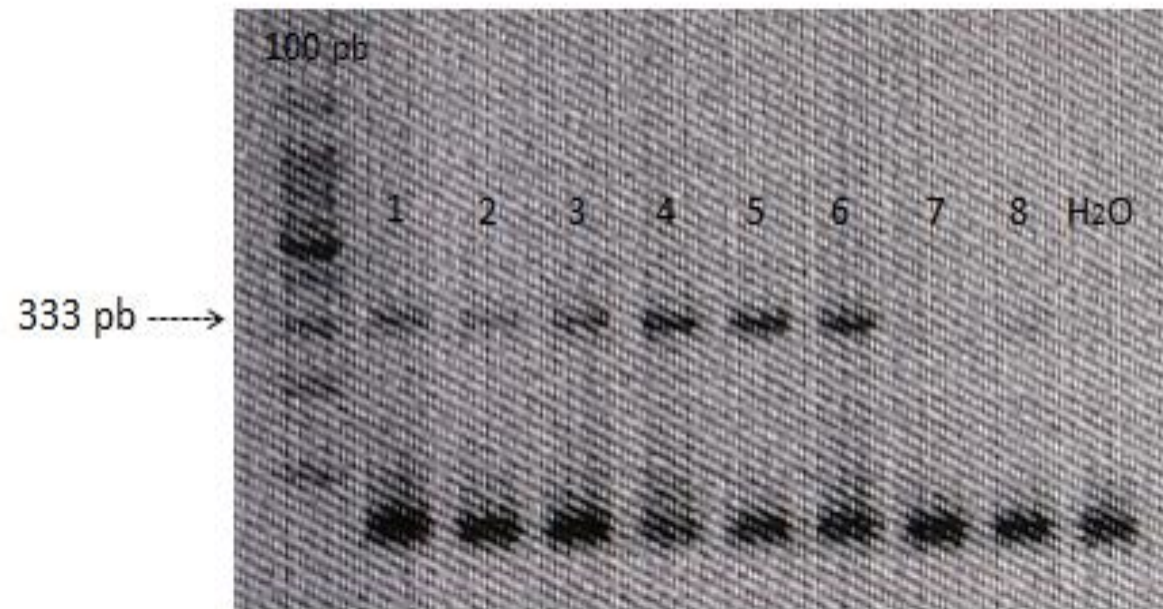


Figura 4. Produto da PCR 1 em gel de eletroforese.

Tabela 4. Condições ideais da PCR 2.

Primers	Concentração (pmol/μL)	Temperatura de anelamento (°C)
hFTO609TiF	20,0	62,0
FTO609R2	20,0	

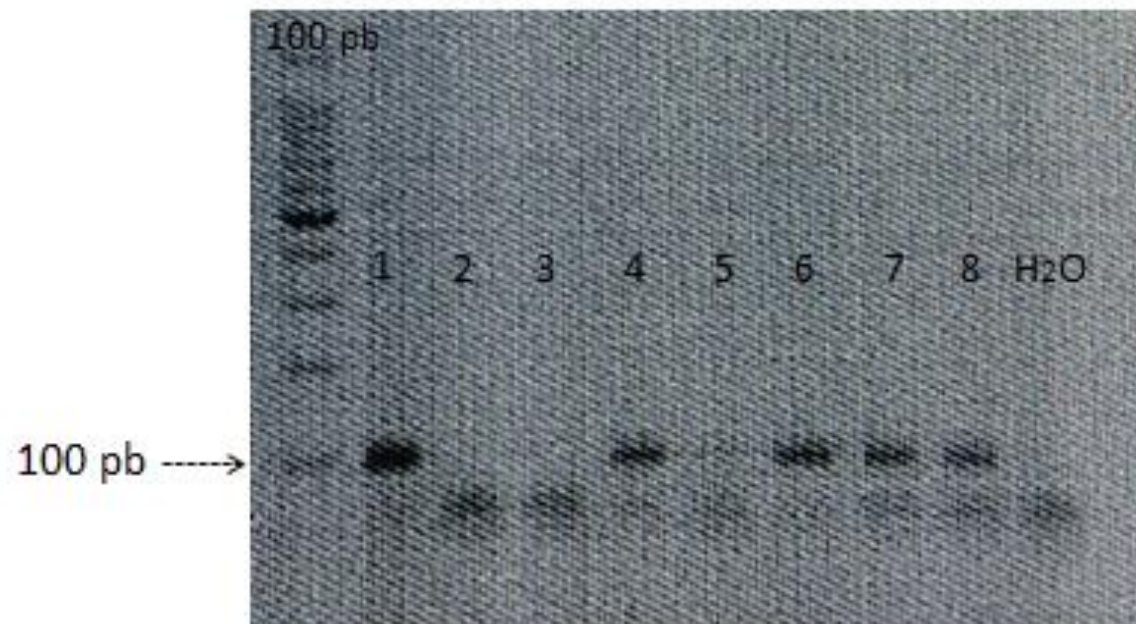


Figura 5. Produto da PCR 2 em gel de eletroforese.

Tabela 5. Condições ideais da PCR controle.

Primers	Concentração (pmol/μL)	Temperatura de anelamento (°C)
hFTO609F	20,0	62,0
FTO609R	20,0	

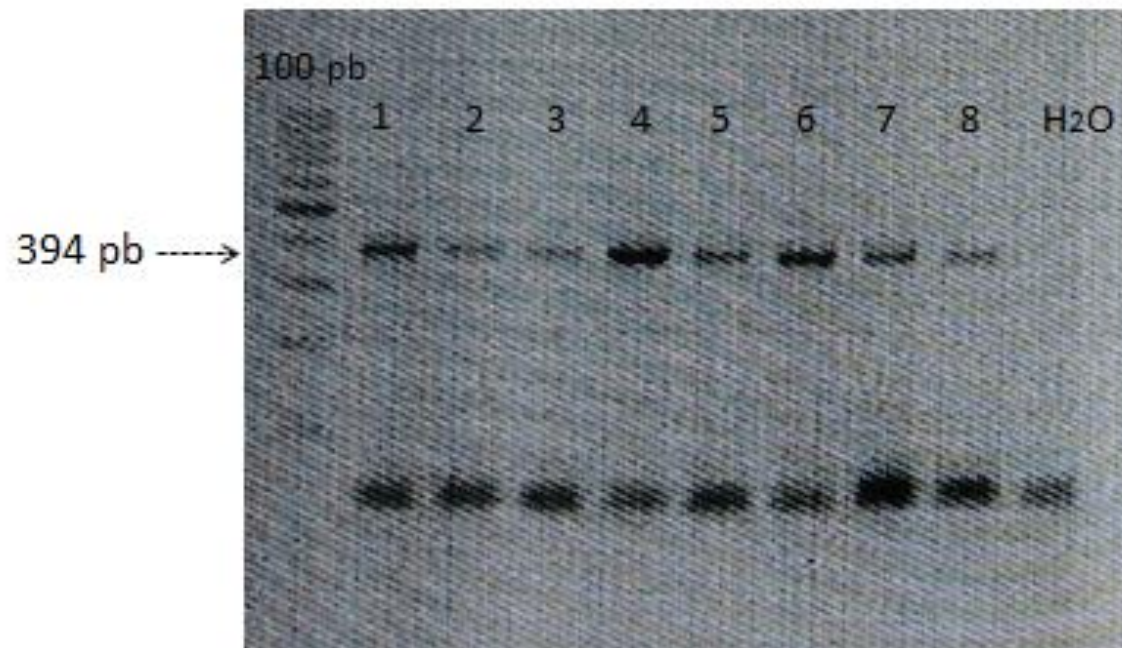


Figura 6. Produto da PCR controle em gel de eletroforese.

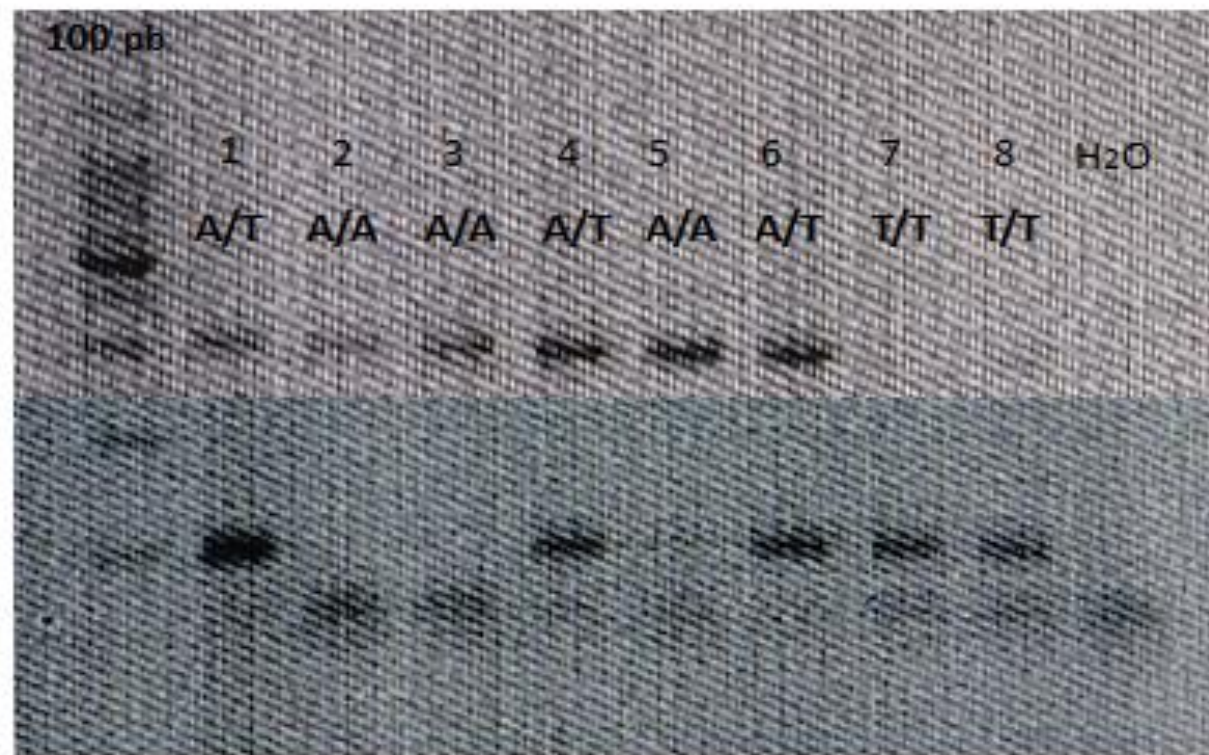


Figura 7. Genotipagem do polimorfismo FTO (rs9939609).

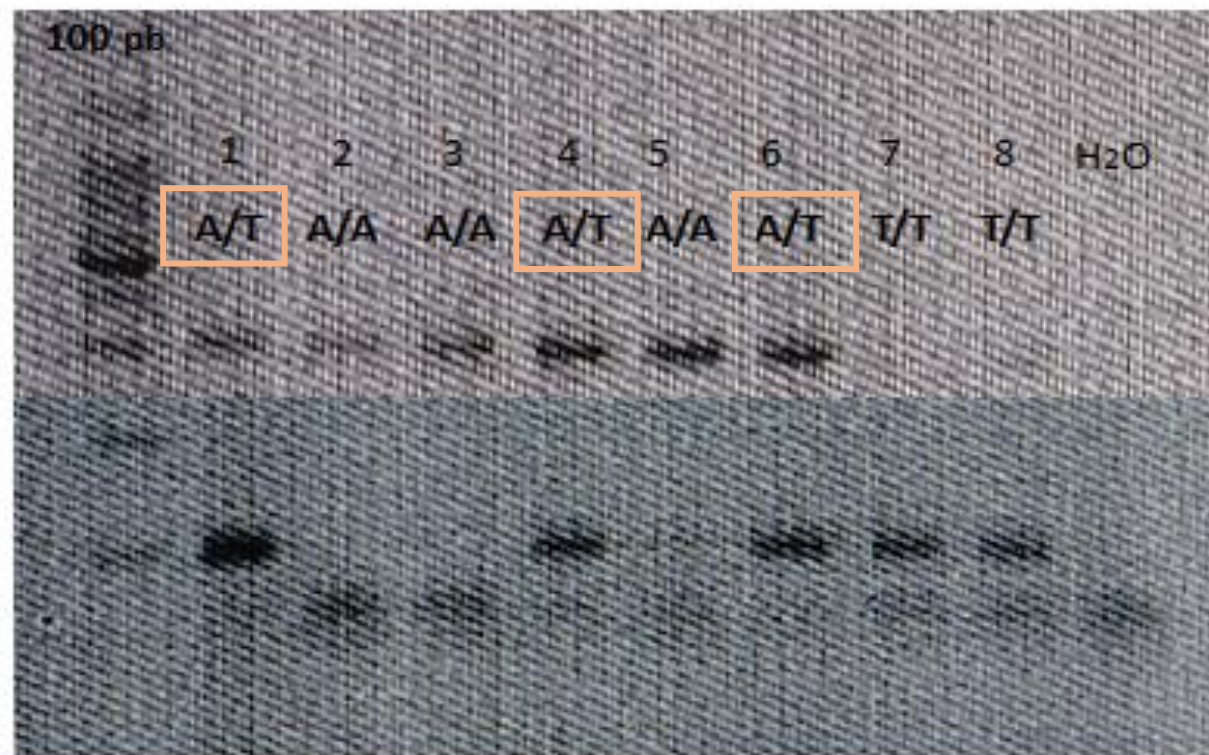


Figura 7. Genotipagem do polimorfismo FTO (rs9939609).

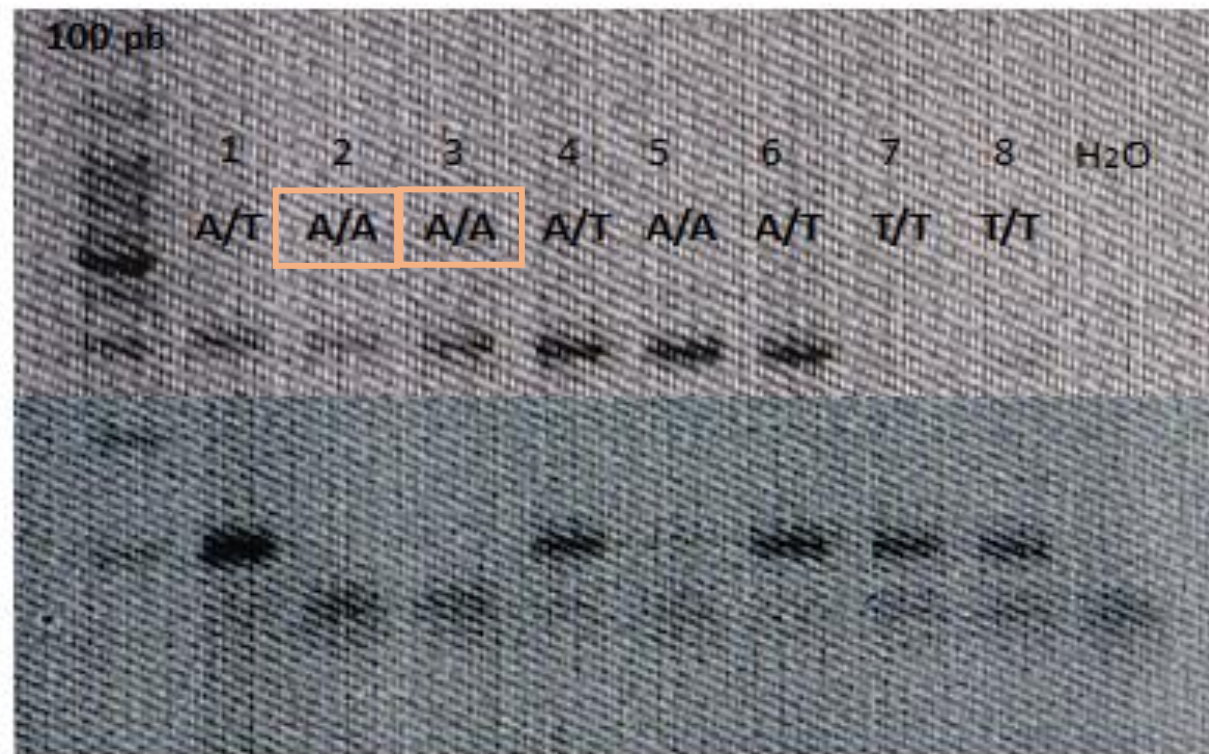


Figura 7. Genotipagem do polimorfismo FTO (rs9939609).

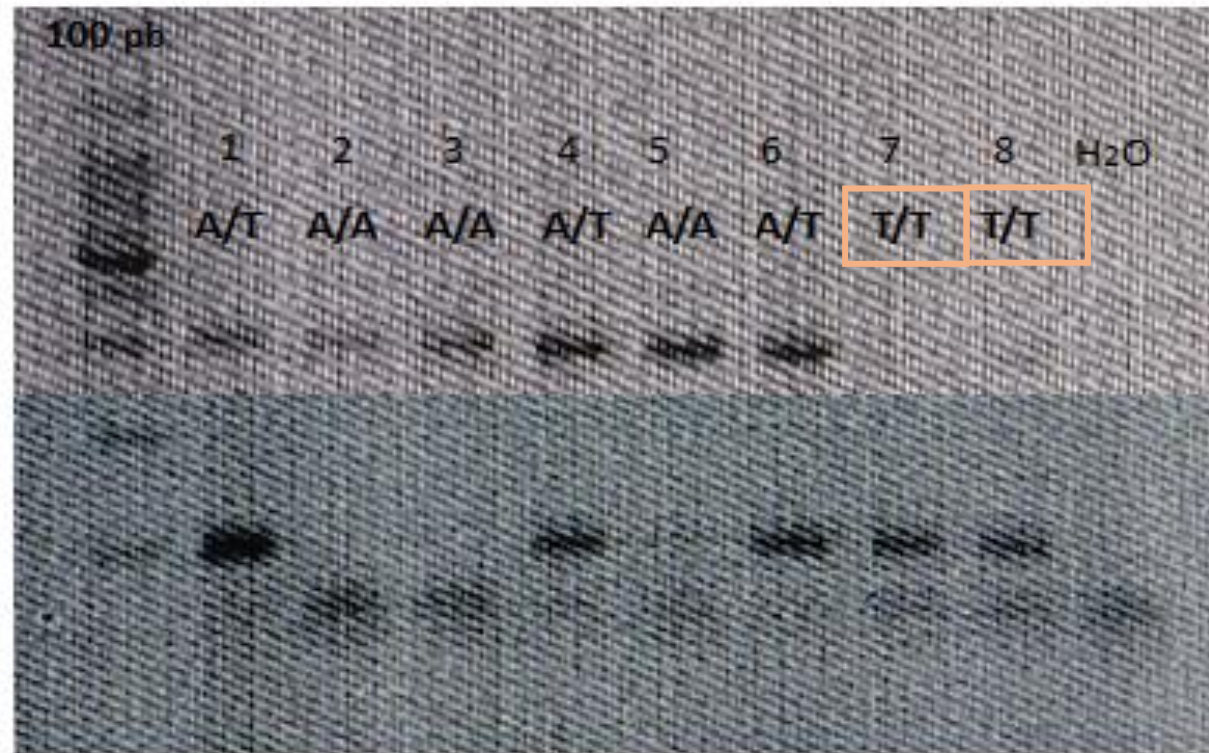
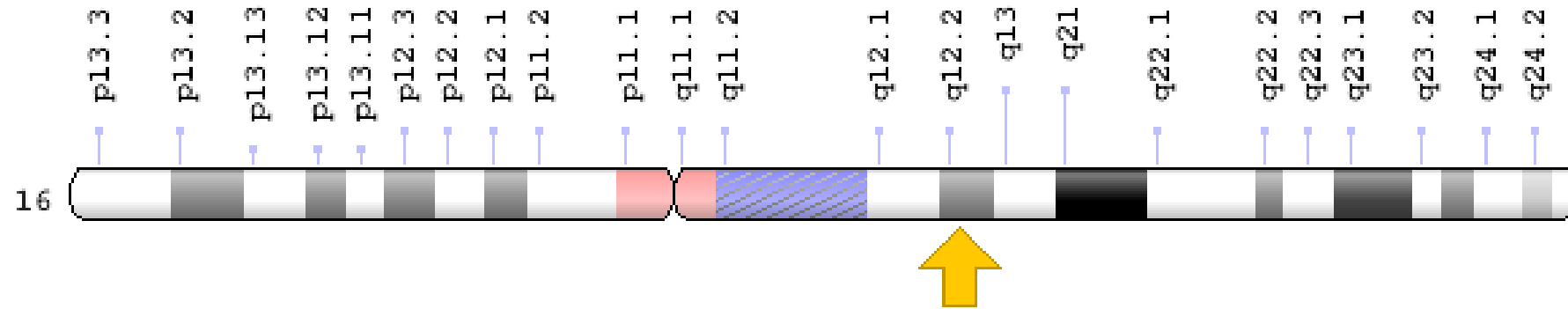


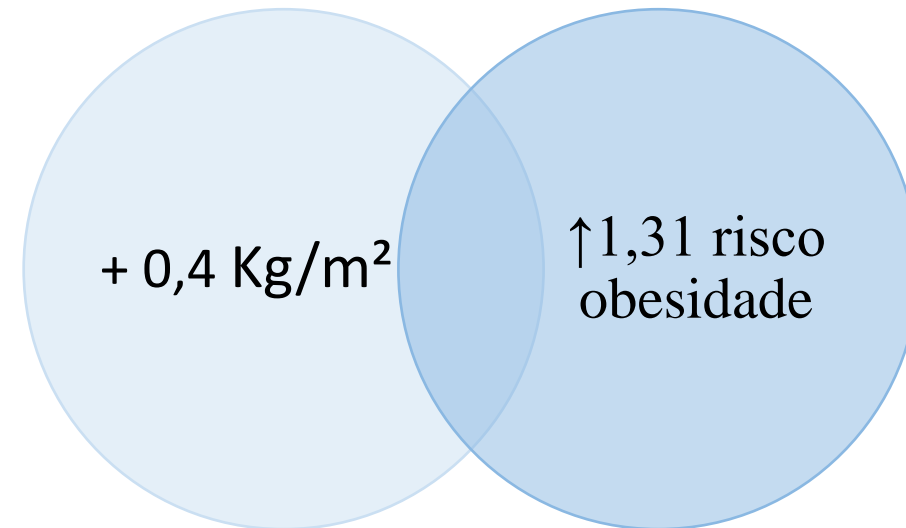
Figura 7. Genotipagem do polimorfismo FTO (rs9939609).

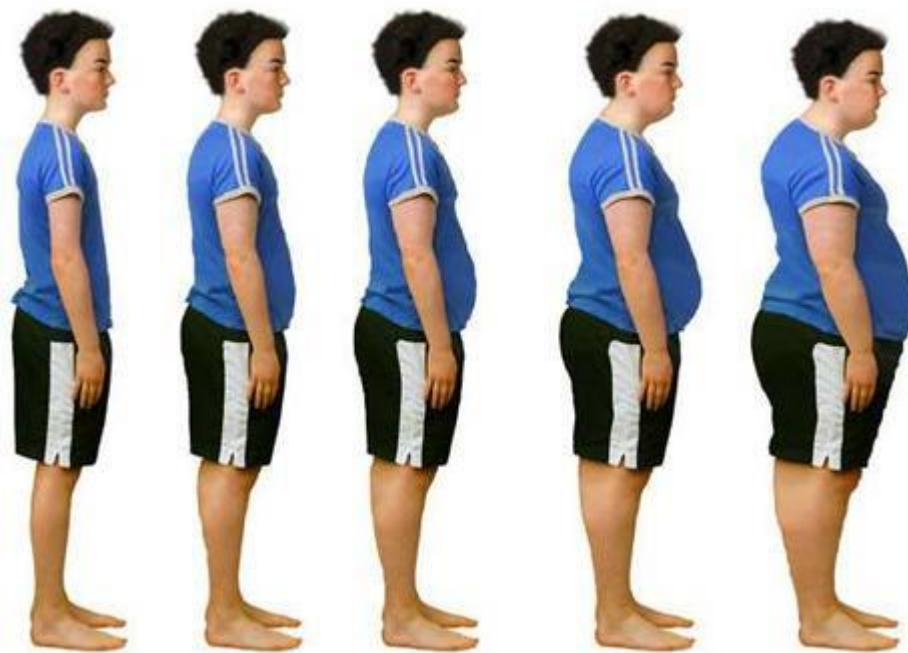
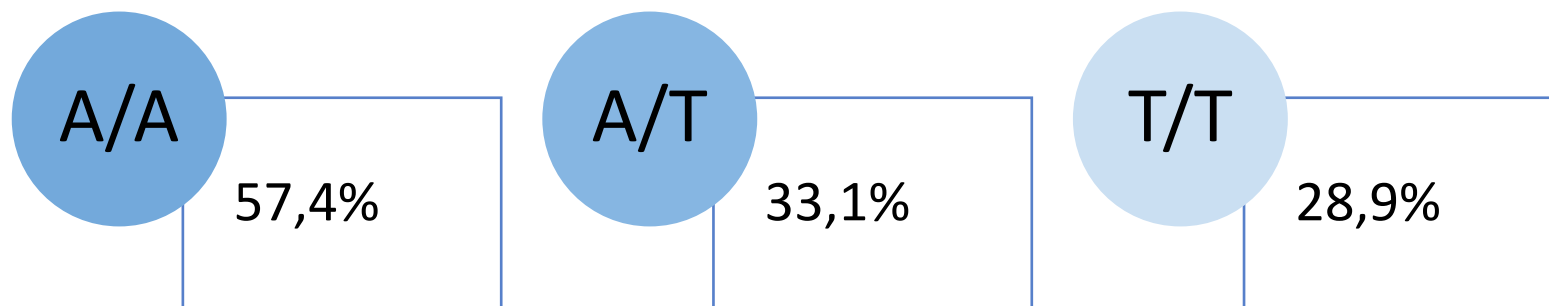


DISCUSSÃO



- 9 *exons* e 8 *introns* → 2.348 SNPs
 - 26 – IMC → rs9939609
 - ↑ Risco obesidade
 - Alelo A





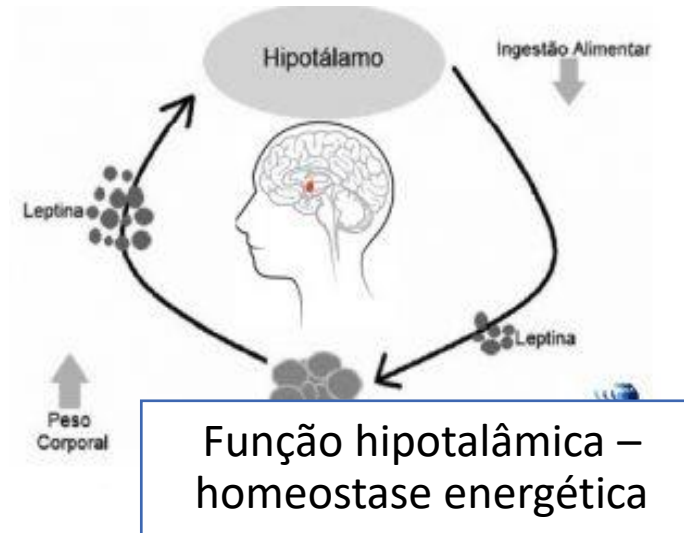
Associação
Excesso de peso e obesidade
Escolares brasileiros
(Reuter et al., 2016)

Regulação metabolismo energético

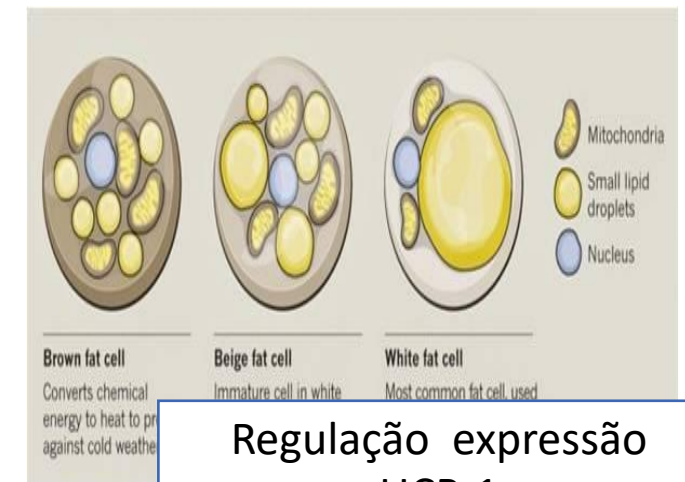
Polimorfismo FTO x OBESIDADE



Função transcricional -
adipogênese



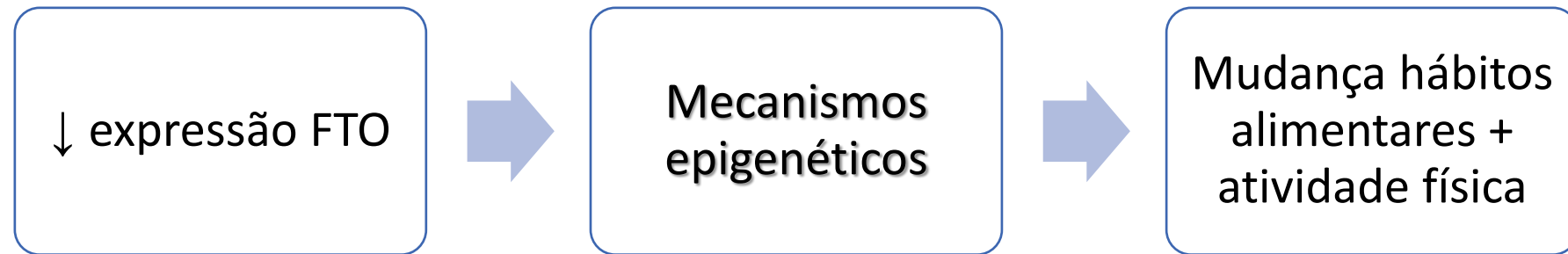
Função hipotalâmica –
homeostase energética

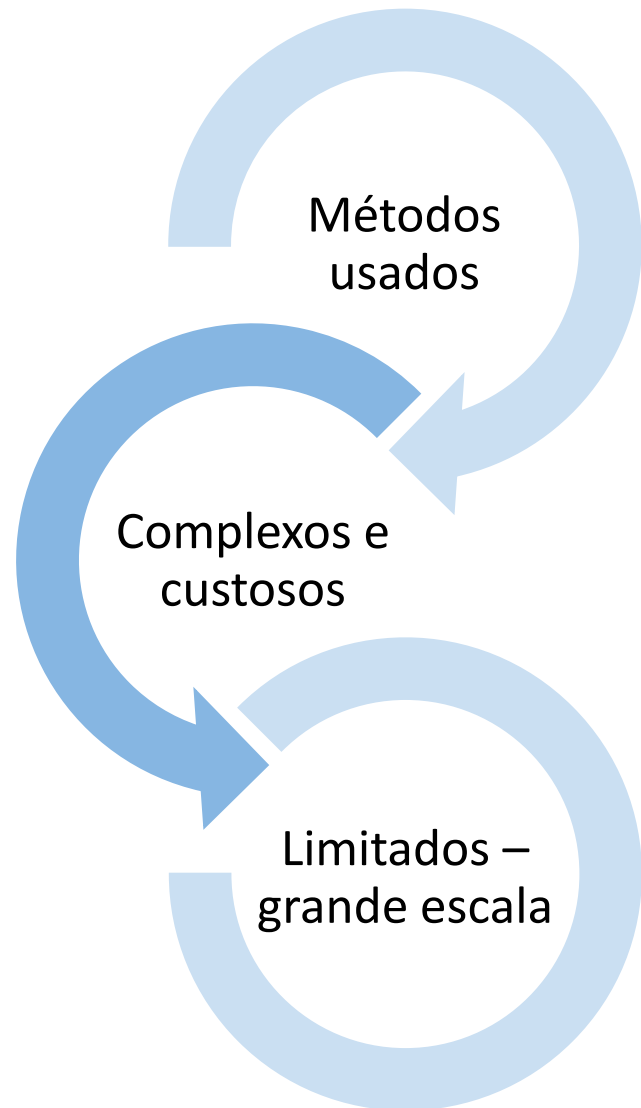


Regulação expressão
UCP-1

Evidências

Polimorfismo FTO x OBESIDADE





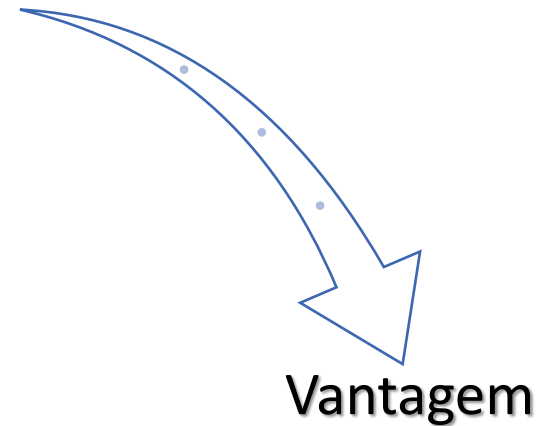
Uso do teste genético → polimorfismo rs9939609
população

Fator limitante
Custo envolvido



Adaptação do método (Ye et al., 2001):

- Identificar polimorfismo FTO
 - Duas simples PCR's



- Fragmentos de diferentes tamanhos
 - Visualizados em gel de agarose



CONCLUSÃO

Um método simples, eficiente e de baixo custo para a genotipagem do polimorfismo rs9939609 do gene FTO usando duas simples PCR's foi descrito.

Desta forma, pretende-se contribuir para o estudo da relação entre o genótipo e o risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas à dieta, bem como para a criação de recomendações dietéticas cada vez mais individualizadas baseadas na compreensão das necessidades nutricionais para a prevenção e o tratamento de doenças.

OBRIGADA!!

