



Análise de SNPs em Crianças com Obesidade

Dias, IMG¹; Calipo, LM¹; Torsoni, AD²; Palhares, HMC³; Balarin, MAS⁴; de Mello, MP¹(co-orientadora); Soardi, FC¹(orientadora).

¹Laboratório de Genética Humana, Centro e Biologia Molecular e Engenharia Genética. Universidade Estadual de Campinas;

²Laboratório dos Distúrbios do Metabolismo. Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP;

³Departamento de Pediatria do Hospital da Clínicas. Universidade Federal do Triângulo Mineiro;

⁴Disciplina de Genética Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

E-mail: belagibrim@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Este fenótipo é particularmente grave em crianças de países em desenvolvimento, no qual a prevalência de casos de obesidade vem aumentando exponencialmente. Estudos moleculares apontam para a existência de uma base genética transmissível, que teria como função manter nos indivíduos um peso corporal tendenciosamente fixo. Assim, a procura de novas mutações e/ou polimorfismos no DNA que possam explicar a causa genética da obesidade ou definir haplótipos relacionados ao fenótipo vem sendo realizadas para diferentes genes. Um dos polimorfismos investigados e associados à obesidade é o polimorfismo rs7012413 do gene *FGFR1* (*Fibroblast growth factor receptor 1*). Esse gene atua na sinalização da regulação do balanço energético, promovendo a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos humanos. Além do polimorfismo no gene *FGFR1*, recentemente pesquisadores do consórcio EGG (*Early Growth Genetics*) por meta-análise associaram à obesidade infantil os SNPs rs9568856 no gene *OLFM4*, e rs9299 no gene *HOXB5* (Bradfield *et al.*, 2012). Entretanto, é possível que ambos os genes apresentem impacto sobre o IMC via diferentes funções. O gene *OLFM4* codifica a proteína olfatomedina 4, a secreção desta glicoproteína facilita a adesão celular via lectinas e caderinas na superfície celular. Apesar da função desta proteína não ser muito bem compreendida, existem dados que sugerem sua ação na microflora intestinal e uma relação entre o microbioma e risco de obesidade. O gene *HOXB5* codifica a B5 *homeobox*, proteína espacial e temporalmente regulada durante o desenvolvimento. O papel desta proteína ainda não está esclarecido, entretanto estudos moleculares em casos de perda de gordura demonstraram uma super regulação de fatores de regulação homeobox. Desta forma, foram objetivos deste estudo investigar por análise molecular, os polimorfismos de única base (SNPs) rs7012413 no gene *FGFR1*, rs9568856 no gene *OLFM4* e rs9299 no gene *HOXB5* em pacientes com obesidade infantil e controles.

MÉTODOS

O grupo de estudo é composto por indivíduos entre 7 e 15 anos, com fenótipo de obesidade infantil (acima de P95), e com fenótipo de sobre-peso (entre P85 e P95). Todos encaminhados pela Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do ICS-UFTM. A extração do DNA genômico foi feita segundo método de fenol-clorofórmio adaptado pelo laboratório de Genética Humana-CBMEG/UNICAMP.

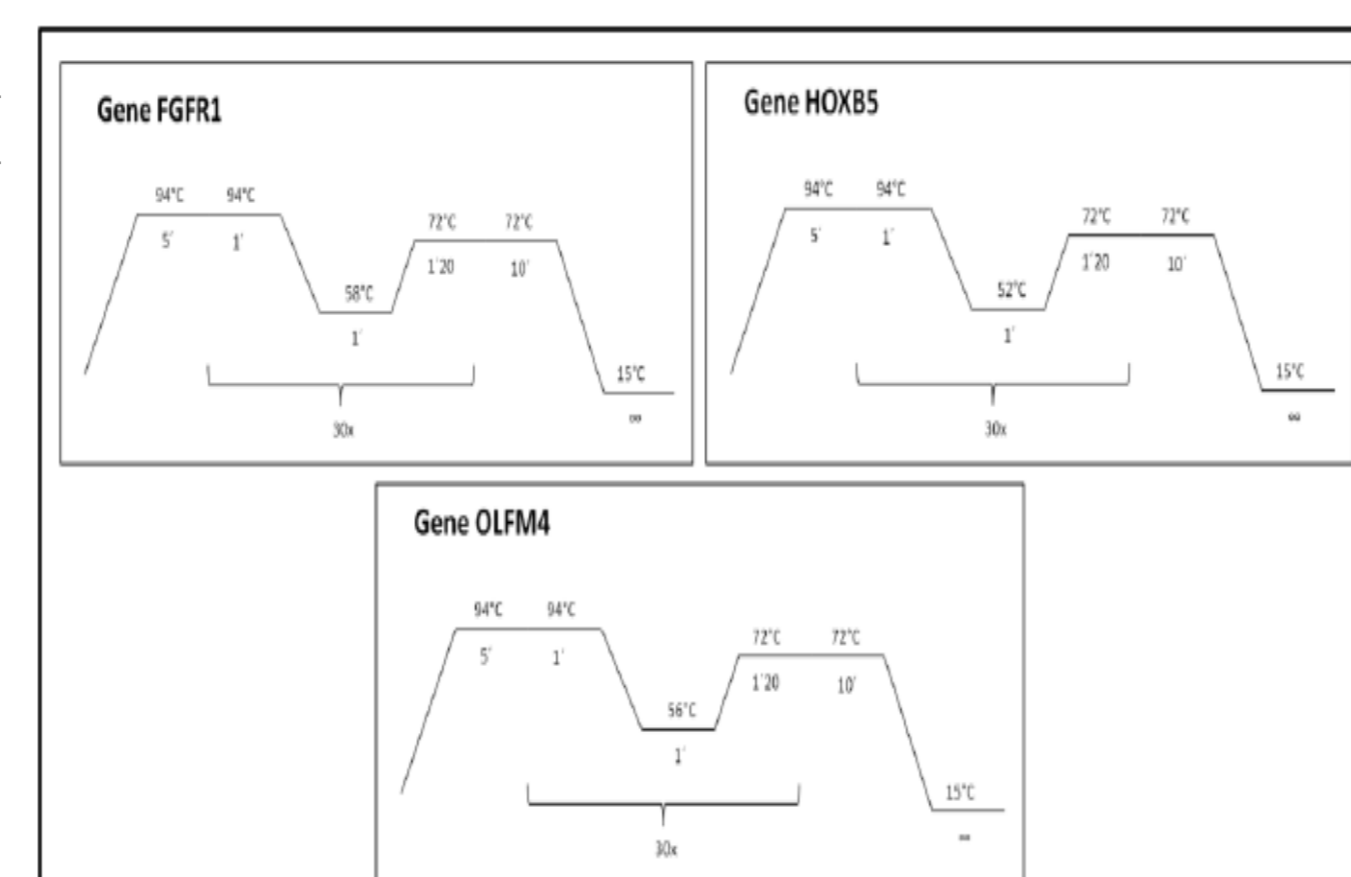
Os *primers* alelo-específicos (Tabela 1), foram construídos com base nas sequências dos genes depositadas no banco de sequências *Ensembl* (www.ensembl.org).

Tabela 1: Sequência dos primers para amplificação alelo-específica.

Nome	Sequência (5'-3')	Tm (°C)
FGFR1F	GTCTCACTCCGTCACCCAG	63,6
FGFR1aR	GCTTGATTGTCAGTTCCAT	60,3
FGFR1gR	GCTTGATTGTCAGTTCCAC	60,9
HOXB5F	GAATGTGGGCATCTGGAGTA	56,7
HOXB5aR	GCCACAGGAAGACCTAAGAT	54,9
HOXB5gR	GCCACAGGAAGACCTAAGAC	55,1
OLFM4F	CACGGCAGTA GGTGAGGC	60,1
OLFM4aR	TCCTGGACAGATGATTGACAT	53,4
OLFM4gR	TCCTGGACAGATGATTGACAC	56,2

Para avaliação da presença dos polimorfismos rs7012413A/G no gene *FGFR1*, rs9299A/G no gene *HOXB5* e rs9568856A/G no gene *OLFM4* foi realizada PCRs com condições específicas de amplificação, conforme demonstrado a seguir.

Reagente	Gene FGFR1 Volume (µL)	Gene HOXB5 Volume (µL)	Gene OLFM4 Volume (µL)
Água ultra-pura	20,5	20,7	20,0
Tampão 10x (Invitrogen)	3,0	3,0	3,0
MgCl ₂ (50µM)	0,7	0,5	0,9
dNTP (2µM)	2,5	2,5	2,5
Primer sense (20pmoles)	1,0	1,0	1,0
Primer antisense (20pmoles)	1,0	1,0	1,0
BSA 0,1%	0	0	0,3
Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen)	0,3	0,3	0,3
Volume total	30,0	30,0	30,0



RESULTADOS E DISCUSSÃO

FGFR1

A amplificação do polimorfismo rs7012413A/G no gene *FGFR1* foi realizada para os pacientes e controles e visualizada em gel de agarose (Figura 1). Após a amplificação e teste em gel de todas as amostras, foram encontrados os genótipos descritos na Tabela 2.

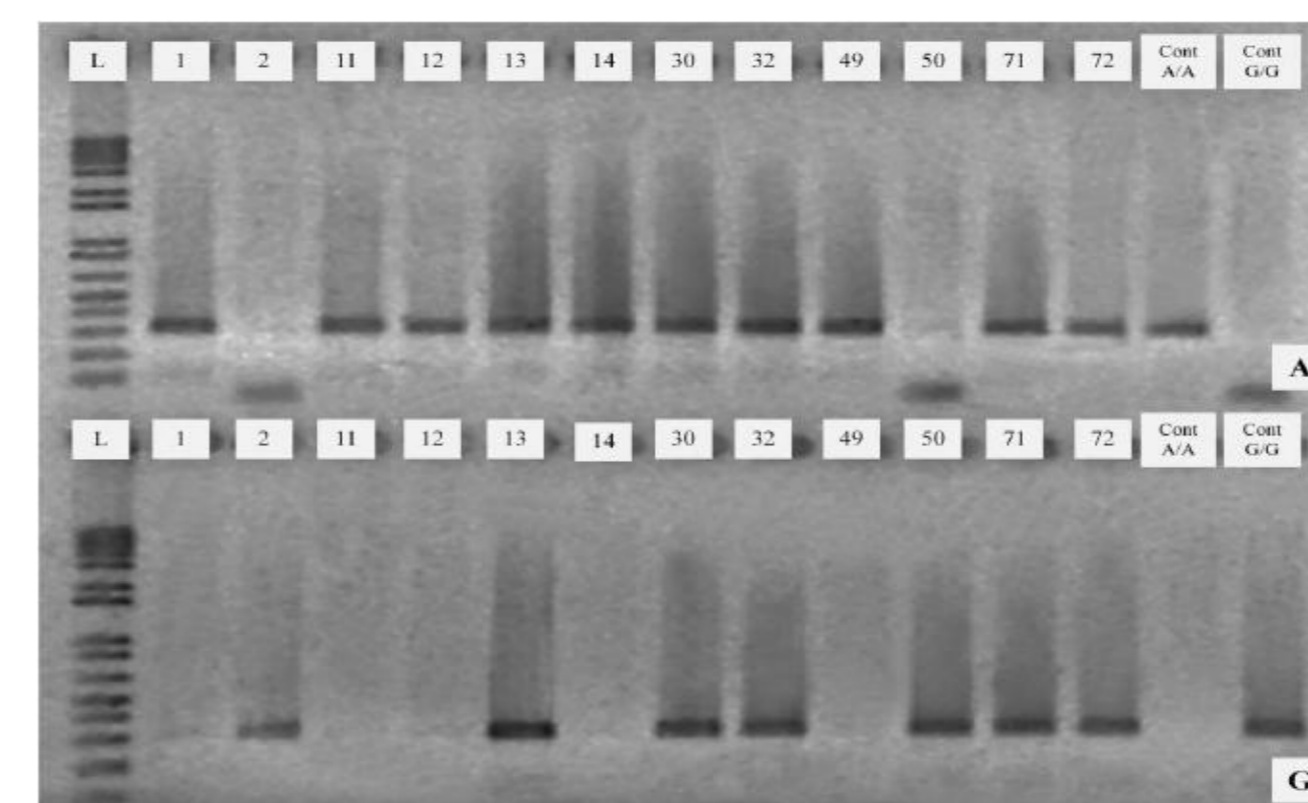


Figura 1: Teste do produto da PCR em gel de agarose 1%, onde: L- peso molecular *Ladder* 1Kb Plus (Invitrogen®), linha de cima amplificação do alelo A e linha de baixo amplificação do alelo G.

Tabela 2: Genótipos encontrados para o polimorfismo rs7012413A/G no gene *FGFR1*.

Indivíduos	A/A	A/G	G/G	Total
Controles	25	55	5	85
Obesos	3	13	3	19
Sobrepeso	6	11	1	18
Total	34	79	9	

Indivíduos	Alelo A (%)	Alelo G (%)	χ^2	p	Equilíbrio de HW
Controles	62	38	11,63	0,0006	Não
Obesos	50	50	2,58	0,11	Sim
Sobrepeso	64	36	1,89	0,17	Sim

Os resultados encontrados na análise estatística sugerem que o polimorfismo rs7012413A/G no gene *FGFR1* parece não estar diretamente relacionado à obesidade e sobrepeso na amostra populacional estudada.

HOXB5

A amplificação do polimorfismo rs9299A/G no gene *HOXB5* foi realizada para os pacientes e controles e visualizada em gel de agarose (Figura 2). Após a amplificação e teste em gel de todas as amostras, foram encontrados os genótipos descritos na Tabela 3.

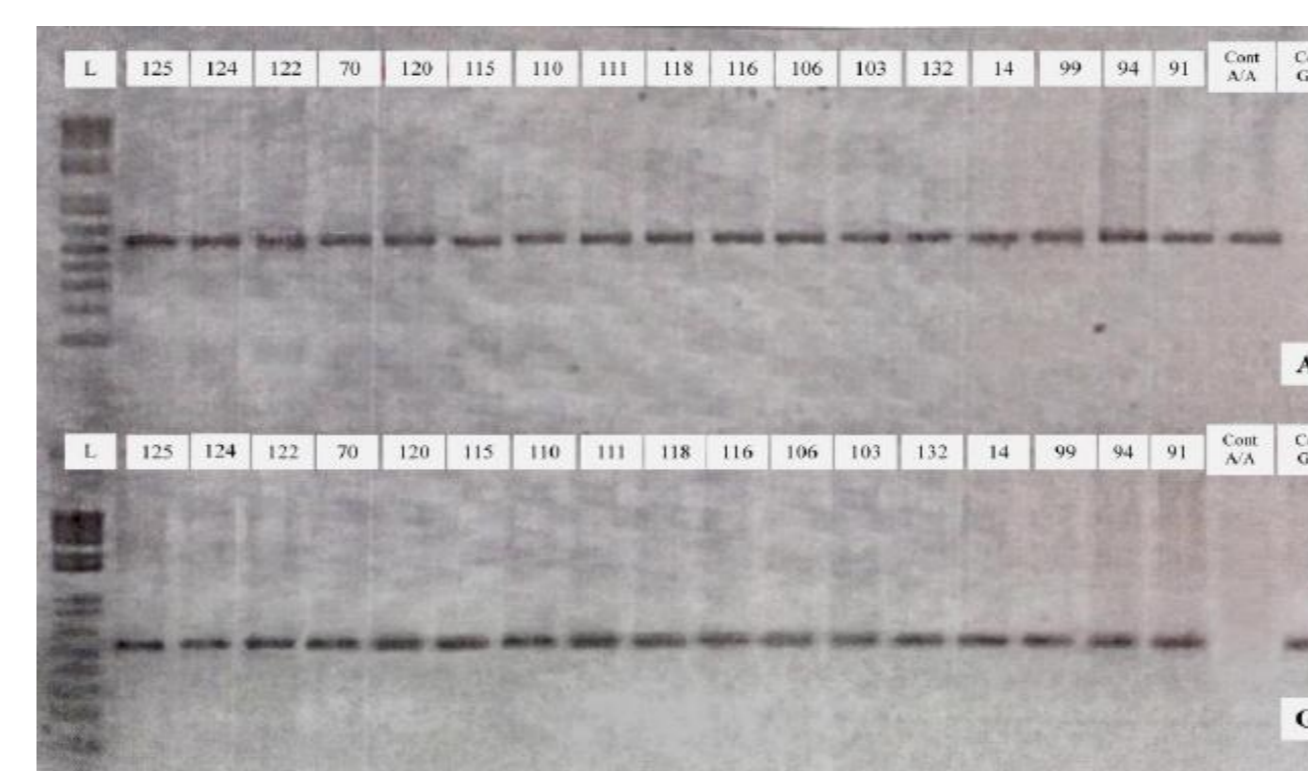


Figura 2: Teste do produto da PCR em gel de agarose 1%, onde: L- peso molecular *Ladder* 1Kb Plus (Invitrogen®), linha de cima amplificação do alelo A e linha de baixo amplificação do alelo G.

Tabela 3: Genótipos encontrados para o polimorfismo rs9299A/G no gene *HOXB5*.

Indivíduos	A/A	A/G	G/G	Total
Controles	4	75	5	84
Obesos	0	13	2	15
Sobrepeso	0	13	1	14
Total	4	101	8	

Indivíduos	Alelo A (%)	Alelo G (%)	χ^2	p	Equilíbrio de HW
Controles	49	51	51,89	<0,0001	Não
Obesos	51	57	8,77	0,031	Não
Sobrepeso	46	54	10,51	0,0012	Não

De acordo com os resultados obtidos, não é possível afirmar ou descartar se há relação do SNP do gene *HOXB5* com os fenótipos de obesidade e/ou sobrepeso da amostra analisada.

OLFM4

A amplificação do SNP rs9568856A/G no gene *OLFM4* foi realizada para os pacientes e controles e visualizada em gel de agarose (Figura 3). Após a amplificação e teste em gel de todas as amostras, foram encontrados os genótipos descritos na Tabela 4.

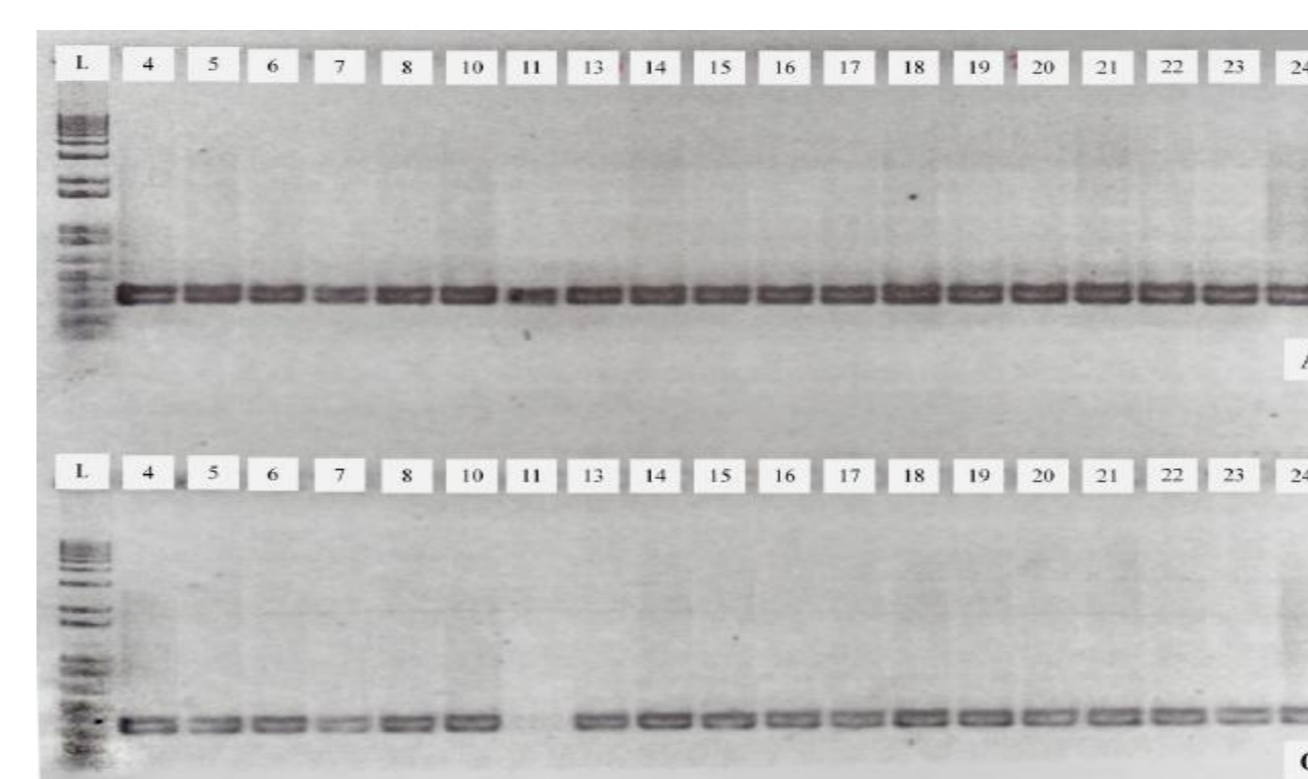


Figura 3: Teste do produto da PCR em gel de agarose 1%, onde: L- peso molecular *Ladder* 1Kb Plus (Invitrogen®), linha de cima amplificação do alelo A e linha de baixo amplificação do alelo G.

Tabela 4: Genótipos encontrados para o polimorfismo rs9568856A/G no gene *OLFM4*.

Indivíduos	A/A	A/G	Total
Controles	0	88	84
Obesos	0	16	15
Sobrepeso	1	13	14
Total	1	117	

Conforme observado (Tabela 4), a amostra estudada é altamente heterozigota para o polimorfismo rs9568856A/G, resultado que nos permite excluir a relação deste polimorfismo com o fenótipo de obesidade na amostra populacional investigada. Devido aos resultados obtidos, não foi possível realizar a análise estatística para este SNP.