



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa

# **A Utilização da “*Next-Generation Sequencing*” no estudo da obesidade monogénica**

Bernardo Afonso Serrasqueiro

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL)

Luísa Veiga (ESTeSL)

Setembro 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



Instituto Superior de Engenharia de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa

## **A Utilização da “*Next-Generation Sequencing*” no estudo da obesidade monogénica**

Bernardo Afonso Serrasqueiro

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL) (ESTeSL)  
Luísa Veiga (ESTeSL)

Júri:

Presidente: António Silvestre  
Vogais: Ana Pires  
Rui Miguel Duque de Brito

Setembro 2018

Bernardo Afonso  
Serrasqueiro

A Utilização da “Next-Generation Sequencing”  
no estudo da obesidade monogénica

2018



Mestrado em  
Engenharia  
Biomédica

Por opção, este trabalho não segue as regras do novo acordo ortográfico.

# Agradecimento

Em primeiro lugar quero agradecer toda a ajuda desde o primeiro dia do Professor Miguel Brito e da Professora Luísa Veiga, que desde o início acompanharam e apoiaram todo o trabalho mostrando sempre disponibilidade e paciência para me guiar e ensinar ao longo de todo o processo, mostrando confiança no meu trabalho ao qual tentei corresponder o melhor que consegui.

Gostaria de agradecer ao Dr. José Silva Nunes pela aquisição das amostras, assim como para o desenvolvimento de todo o processo a que isso obriga. Não podendo também esquecer o apoio da Sofia Santos nos dias passados no laboratório, onde a Carolina Veríssimo foi uma excelente colega não só ao longo deste trabalho como também em todas as aulas e trabalhos de grupo, não só pelo excelente trabalho mas como também pela boa disposição.

Por último, mas certamente nunca em último lugar, quero agradecer aos meus pais por todo o apoio e por tudo o que fizeram para que conseguisse chegar onde cheguei, sem eles nada seria possível.

A todos,

Obrigado por tudo!

## Resumo

A obesidade é uma epidemia que tem vindo a afetar cada vez mais os países industrializados. Esta é uma condição clínica com uma componente genética que aos poucos vai sendo decodificada onde as tecnologias de NGS dão um grande contributo.

Neste trabalho, são analisadas amostras provenientes de 36 pacientes obesos que a partir de uma amostra de células do epitélio bucal foi efectuada uma extração de DNA e feita uma análise em NGS com o objectivo de procurar variantes num painel de genes associados à obesidade.

Foram obtidas 183 variantes snv, 2 inserções e 1 deleção, sendo 141 destas heterozigóticas. Foram identificadas duas mutações missense ainda não descritas para os genes LRP2 12385A>G e SORCS1 2491A>C. Foram ainda identificadas 2 amostras com mutações possivelmente danosas, segundo a previsão polyphen, para o gene POMC.

A tecnologia NGS representa assim um equipamento com potencial não só para auxílio e confirmação de diagnósticos clínicos, como também abre a porta para estratégias de tratamento personalizáveis.

## Abstract

Nowadays obesity is an epidemic that has been affecting industrialized countries. This is a clinical condition with a genetic component where technological evolution, like NGS, give a great contribute towards scientific and medical evolution.

In this project, DNA samples were extracted via mouth epithelial cells from 36 obese patients. DNA was sequenced and analyzed by NGS with the intent of finding variants in a gene panel associated with obesity.

The results showed 183 single nucleotide variations, 2 insertions and 1 deletion, 141 of which were heterozygous. It was identified 2 missense mutations not yet described for the genes LRP2 12385A>G and SORCS1 2491A>C. There were also identified 2 samples that carried a possibly damaging mutation for the POMC gene, according to polyphen prediction.

NGS technology demonstrates a potential in aiding and confirming a clinical diagnosis, allowing also the development for a personalized treatment.

**Palavras Chave:** Obesidade; Obesidade Monogénica; Next-generation Sequencing (NGS)

**Key Words:** Obesity; Monogenic Obesity; Next-generation Sequencing (NGS)

# Índice

1-Enquadramento Teórico.....	1
1.1- Obesidade .....	1
1.2- Genes comuns da obesidade Monogénica. ....	2
1.3- Epidemiologia .....	4
1.4- NGS .....	5
1.4.1 – NGS e Obesidade .....	7
2- Objectivos do Estudo .....	9
3- Metodologia.....	10
3.1- Extracção de DNA: .....	10
3.2- Preparação da Library: .....	13
3.2.1- Marcação de DNA Genómico; .....	13
3.2.2- Limpeza de DNA marcado; .....	15
3.2.3-Amplificação do DNA marcado; .....	15
3.2.4- Lavagem de DNA Amplificado; .....	16
3.2.5- Hibridação de Sondas;.....	19
3.2.6- Captura de Sondas Hibridizadas; .....	19
3.2.7- Segunda Hibridação; .....	19
3.2.8- Segunda Captura de Sondas Hibridizadas; .....	19
3.2.9- Limpeza de Library; .....	19
3.2.10- Amplificação de Library Enriquecida; .....	19
3.2.11- Lavagem de Library Amplificada; .....	19
3.2.12- Verificação de Librarys Enriquecidas; .....	20
3.3 – Quantificação de Librarys; .....	20

3.4 - Procedimento;	20
3.4.1- Sequenciação em NGS;	20
4- Resultados	21
4.1 – Extracção	21
4.2 – Library	22
4.3 – Análise Global	24
4.4 – Análise por Gene;	25
4.4.1 ADRB1	25
4.4.2 ADRB2	26
4.4.3 ADBR3	27
4.4.4 BDNF	28
4.4.5 FTO;	28
4.4.6 IGF2R	28
4.4.7 LEP	29
4.4.8 LEPR	29
4.4.9 LRP2	29
4.4.10 MC3R	31
4.4.11 MC4R	31
4.4.12 NEGR1	31
4.4.13 NPY	31
4.4.14 NPY1R	31
4.4.15 NPY2R	32
4.4.16 NTRK2	32
4.4.17 PCSK1	32
4.4.18 POMC	33

4.4.19 SH2B1 .....	33
4.4.20 SIM1 .....	33
4.4.21 SORCS1 .....	34
4.4.22 UCP1 .....	34
4.4.23 UCP2 .....	34
4.4.24 UCP3 .....	34
4.5 – Distribuição de Genes (Impacto dos genes nas amostras analisadas) .....	35
5- Discussão de resultados .....	38
6- Conclusão .....	44
7- Bibliografia .....	45

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.2.1</b> – Genes associados à obesidade utilizados, com referência à sua localização, fenótipo e referenciação.....	3
Tabela 3.1. 1 - Valores de concentração obtidas em 3 medições da primeira eluição e obtidas em 1 medição da segunda eluição das amostras OM1 e OM2.....	11
Tabela 3.1. 2 - Valores de concentrações obtidas das amostras 60 e 51.....	11
Tabela 3.1. 3- Concentrações obtidas com recurso a <i>QuBit</i> ®, obtidas de todas as amostras em que foi realizada mais que uma extracção. Todas as extracções foram posteriormente concentradas recorrendo a <i>MicroCon</i> ®.....	12
Tabela 3.2.3. 1 - Distribuição de índex. ....	16
Tabela 3.2.4. 1- Concentrações de DNA em cada amostra.....	17
Tabela 3.2.4. 2- Concentração e tamanho de fragmentos de DNA em cada amostra com recurso à TapStation. ....	18
Tabela 4.1. 1- Valores de concentrações obtidas de todas as amostras em 3 medições com recurso ao <i>QuBit</i> ®.....	21
Tabela 4.2. 1- Representação das librarys, concentração média de DNA em cada amostra e volume a retirar para perfazer um total de 500 ng de DNA por library.....	22
Tabela 4.2. 2- Valores referentes à medição de concentração efectuada em fluorometria: .....	23
Tabela 4.2. 3- Valores referentes às medições efetuadas em TapStation, com referencia a concentração e tamanho de fragmentos de interesse. É de salientar que o tamanho ideal recomendado será de 200 pares de bases (bp) a 1000 bp. Library 1.1, Library 2.1 e Library 3.1 são repetições da Library 1, Library 2 e Library 3, respectivamente: .....	23
Tabela 4.3. 1– Número de alterações encontradas em cada variante.....	24
Tabela 4.3. 2– Número total de referências Polyphen encontradas.....	25
Tabela 4.4.1. 1– Alterações missense encontradas no gene ADRB1 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	26

Tabela 4.4.2. 1– Alterações missense encontradas no gene ADRB2 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	26
Tabela 4.4.2. 2– Significância clinica das alterações missense obtidas para o gene ADRB2 segundo informação obtida pela base de dados <i>ClinVar</i> , NCBI.....	27
Tabela 4.4.3.1– Alterações missense obtidas no gene ADRB3 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	27
Tabela 4.4.3.2– Significância clinica das alterações missense obtidas para o gene ADRB3 segundo informação obtida pela base de dados <i>ClinVar</i> , NCBI.....	27
Tabela 4.4.6.1– Alterações missense obtidas no gene IGF2R com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	28
Tabela 4.4.8.1– Alterações missense obtidas no gene LEPROT, LEPR com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	29
Tabela 4.4.8.2– Significância clinica das alterações missense obtidas para o gene LEPROT, LEPR segundo informação obtida pela base de dados <i>ClinVar</i> , NCBI.....	29
Tabela 4.4.9.1– Alterações missense obtidas no gene LRP2 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	30
Tabela 4.4.10.1– Alterações missense obtidas no gene MC3R com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	31
Tabela 4.4.17.1– Alterações missense obtidas no gene PCSK1 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	32
Tabela 4.4.17.2– Significância clinica das alterações missense obtidas para o gene LEPROT, LEPR segundo informação obtida pela base de dados <i>ClinVar</i> , NCBI.....	32

Tabela 4.4.20.1– Alterações missense obtidas no gene Sim1 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada. ....	33
Tabela 4.4.22.1– Alterações missense obtidas no gene UCP1 com informação de alteração de aminoácido e incidência global e na europa segundo a base de dados <i>1000 Genome</i> , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.....	34
Tabela 4.5.1– Representação de amostras onde foram identificados polimorfismos possivelmente danosos segundo a classificação polyphen, onde é representado o gene onde desse polimorfismos assim como o SNP.....	37
Tabela 5.1– Número total de amostras onde foram identificadas variantes cuja consequência clínica está associada à patologia indicada em todas as amostras, e número de amostras que mostravam variantes possivelmente danosas. ....	38
Tabela 5.2– Genes com variantes cuja consequência clínica está associada à obesidade e número de amostras com essas variantes nesses genes.....	39
Tabela 5.4– Discrição de mutações com uma frequência Europeia $\leq 1\%$ organizada por gene, com referência a frequência Europeia, fenótipo e previsão polyphen. ....	42

## Índice de Gráficos

Gráfico 4.3. 1– Percentagem de amostras Homozigóticas e Heterózigóticas.....	24
Gráfico 4.3. 2– Percentagem de variantes encontradas.....	25
Gráfico 4.5.1– Percentagem na distribuição de variações obtidas em cada gene.....	35
Gráfico 4.5.2– Gráfico A: Número de amostras em que foram obtidas variantes de cada gene analisado. Gráfico B: Percentagem do número de amostras em que foram obtidas variantes de cada gene analisado, para um total de 34 amostras. ....	36
Gráfico 4.5.3– Número de genes com variantes alteradas em cada amostra.....	36
Gráfico 4.5.4– Número de polimorfismos em genes, por amostra, com risco elevado associado a previsões polyphen de possivelmente benigno e possivelmente danoso. ....	36

## Índice de Figura

Fig. 1: Ilustração do processo de sequenciação na flow cell por amplificação por ponte. A: Ligação do fragmento de DNA á flow cell por oligonucleotido correspondente; B: Amplificação do fragmento de DNA;C: Eliminação de fragmento de DNA inicial; D: Terminação 3' liga a oligonucleotido correspondente na flow cell criando uma ponte; E: Amplificação de fragmento de DNA; F: Eliminação de fragmento de DNA inicial..... 6

Fig. 2- Diagrama do protocolo *TruSight One*® da *Illumina, Inc.* 2017, utilizada para a preparação da library..... 13

# 1-Enquadramento Teórico

Actualmente a obesidade ganhou a classificação de epidemia, principalmente em países industrializados criando um aumento cada vez maior no desenvolvimento de doenças crónicas que acabam por ter um impacto na saúde pública (1). É aceite que actualmente as rotinas diárias e a urbanização levam a um estilo de vida cada vez mais sedentário, onde alimentos com alto teor calórico também dão o seu contributo para o aumento dos índices de obesidade (2).

Sabe-se no entanto que a obesidade carrega um grande factor genético (2), despertando o interesse para o estudo de alterações genéticas associadas a esta condição, e neste ponto, a evolução tecnológica dá o seu contributo ao criar ferramentas que permitam estudar de forma mais aprofundada o genoma humano com equipamentos e técnicas cada vez mais sofisticadas.

A tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS) são uma das evoluções tecnológicas que deu o seu contributo criando plataformas que permitem sequenciar o DNA e realizar reconhecimento e identificação de variantes de genes com implicação em diferentes patologias contribuindo para a medicina de precisão e consequente abordagem terapêutica (3).

Este trabalho tem assim como objectivo não só confirmar e detectar variantes genéticas associadas à obesidade como o de também explorar e compreender a potencialidade que um equipamento de NGS tem e pode vir a ter para a identificação/confirmação de condições clínicas num indivíduo.

## 1.1- Obesidade

Obesidade é uma doença complexa e multifatorial (4), definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma acumulação excessiva e anormal de gordura que representa um risco para a saúde. É uma patologia que se mantém como uma preocupação a nível mundial estando associada ao aumento da prevalência de doenças crónicas como por exemplo a *Diabetes Mellitus* tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares(5) e cancro(6). A sua patogénese é complexa onde fatores ambientais, socioeconómicos, comportamentais, fisiológicos, genéticos, epigenéticos, entre outros, contribuem não só para a causa como também para a persistência desta doença (5)(6).

O índice de massa corporal (IMC) mantém-se a metodologia mais utilizada para definir a obesidade, que apesar de não apresentar uma medição correta de adiposidade é uma metodologia simples de ser aplicada (5). De acordo com a OMS, o IMC é calculado a partir do quociente entre o peso de um indivíduo (em kg) e a sua altura (em m), sendo que este cálculo não permite diferenciar o peso referente à massa muscular, do peso referente à gordura, o que segundo a OMS permite apenas uma estimativa cruda de medição de gordura.

O intervalo standard para a classificação do IMC de um indivíduo com excesso de peso, recaí

num valor entre os 25 kg/m<sup>2</sup> e os 29,9 kg/m<sup>2</sup> ( $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} \leq 29,9 \text{ kg/m}^2$ ), sendo que um individuo que apresente um valor superior a 30 kg/m<sup>2</sup> ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) será considerado obeso (5)(7).

A obesidade vista como uma doença permite alterar a perspectiva sobre esta condição clinica, sendo possível apontar a causa não apenas ao estilo de vida do individuo, mas também a uma condição fisiológica(5). Factores genéticos herdados de progenitores assim como factores epigenéticos podem estar na génese da obesidade (8). Apesar de casos de obesidade extrema estarem directamente ligados a factores genéticos, a partir do resultado de uma mutação num gene, para a maioria da população a obesidade é o resultado da interação entre vários genes complementada com factores ambientais, comportamentais e sociais (8,9).

Apesar da obesidade ser uma patologia com diversas variáveis para o seu desenvolvimento, actualmete não há duvida que os factores genéticos desempenham um papel importantíssimo. No que toca à genética da obesidade existem dois tipos que se podem desenvolver: Síndrómica e Não-Síndrómica (10).

Por vezes certos síndromes apresentam alterações de genes que levam à obesidade. Este tipo de situações define os casos de obesidade síndrómica, tipicamente associados a episódios de hiperfagia. A obesidade síndrómica pode aparecer em duas formas, quer por síndromes pleiotrópicos como é o caso, por exemplo, do síndrome de Cohen, síndrome de Borjeson ou o síndrome de Bardet-Biedl, quer por rearranjos de cromossomas como no síndrome de Prader-Willi. Em ambas as situações a obesidade apresenta-se não como uma causa, mas sim como uma das características clinicas destes síndromes (10,11).

Dentro do grupo das alterações não-síndrómicas estão a obesidade poligénica e a obesidade monogénica (10). No que toca à obesidade poligénica esta é caracterizada pela interação de variantes em diversos genes, que apesar de serem por vezes variantes comuns e com pouco impacto quando presentes isoladamente, quando diversas destas variantes estão presentes, juntas podem criar uma maior susceptibilidade para desenvolver obesidade (12). A obesidade monogénica por outro lado é caracterizada pelo desenvolvimento de obesidade provocado por uma variante num gene, situação que apesar de rara, revela a importância que o equilíbrio neuronal e hormonal têm perante o controlo de apetite e na regulação de tecidos adiposos (11).

## **1.2- Genes comuns da obesidade Monogénica.**

No que toca ao factor genético na obesidade monogénica diversas mutações podem ter influência não só a um nível metabólico mas como também no controlo do apetite, como foi explicado anteriormente. Diversos genes estão associados ao desenvolvimento de obesidade, segundo o GWAS cerca de 127 *loci* no genoma humano estão ligados de alguma forma à obesidade (13).

Para este trabalho foi escolhido um painel de 28 genes associados a obesidade. Na tabela 1 estes genes são resumidamente descritos para um melhor enquadramento do trabalho efectuado.

**Tabela 1.2.1** – Genes associados à obesidade utilizados, com referência à sua localização, fenótipo e referenciação.

Gene	Nome	Cromossoma	Fenótipo/Consequência Clínica associada a Obesidade	Referência
ADRB 1	Adrenoreceptor- $\beta$ 1	10q25.3	Obesidade e alterações metabólicas	(10,14)
ADRB2	Adrenoreceptor- $\beta$ 2	5q32	Obesidade e desregulação lipídica	(10,15)
ADRB3	Adrenoreceptor- $\beta$ 3	8p11.23	Obesidade e diabetes tipo 2	(10,16)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	11p13	Obesidade e hiperfagia	(11,17,18)
FTO	Fat mass and obesity-associated	16q12	Obesidade, Índice de massa corporal e comportamentos alimentares	(11,13,17,19)
IGF2	Insulin-Like Growth Factor 2	11p15.5	Obesidade na infância	(11,20)
IGF2R	IGF-II receptor gene	6q26	Obesidade associada ao metabolismo, resistência à insulina e Diabetes tipo 2	(21)
LEP	leptin	7q32.1	Obesidade precoce e hiperfagia severa	(10,11,18,22)
LEPR	Leptin receptor	1p31.3	Obesidade precoce e hiperfagia severa	(10,11,18)
LRP2	Low-density lipoprotein receptor 2	2q31.1	Resistência à insulina	(18)
MC3R	Melanocortin 3 receptor	20q13.2	Obesidade, Desequilíbrio metabólico e Homeostasia energética	(13,23,24)
MC4R	Melanocortin 3 receptor	18q21.31	Obesidade, Obesidade de aparecimento precoce	(10,11,13,17,18,23,25–)
NEGR1	Neuronal growth regulator 1	1p31	Risco de obesidade e IMC elevado	(11,13,28,29)
NPY	neuropeptide Y	7p15.3	Obesidade, Estimulo de consumo de alimentos e Regulação metabólica de lípidos	(10,13,18,27)
NPY1R	neuropeptide Y 1 receptor	4q32.2	Metabolismo	(30)
NPY2R	neuropeptide Y 2 receptor	4q32	Hiperfagia	(30)
NTRK2	Neurotrophic tyrosine receptor kinase	9q21.33	Obesidade hiperfágica	(11,31,32)
PCSK1	Prohormone convertase 1	5q15-q21	Obesidade e IMC elevada	(11,13,31,32)
POMC	proopiomelanocortin	2p23.3	Obesidade, IMC elevado e hiperfagia	(10,11,13,31,32)
SH2B1	SH2B adaptor protein 1	16p11.2	Obesidade e Hiperfagia	(11,13,31,32)
SIM1	single-minded family bHLH transcription factor 1	6q16.3	Obesidade	(10,11,13,17,31)

SORCS1	Sortilin related VPS10 domain containing receptor 1	10q25.1	Obesidade e Complicações associadas a Diabetes	(11,33)
SLC6A14	solute carrier family 6member 14	Xq23	Obesidade (controlo de apetite)	(34)
UCP1	uncoupling protein 1	4q31.1	Metabolismo energético, Obesidade, Obesidade aparecimento precoce e Diabetes tipo 2	(10,27,35)
UCP2	uncoupling protein 2	11q13.4	Obesidade, Obesidade aparecimento precoce, Metabolismo energético, Obesidade Diabetes tipo 2	(10,13,27,35)
UCP3	uncoupling protein 3	11q13.4	Obesidade(severa e de aparecimento precoce) Diabetes tipo 2	(10,13,27,31,35)

### 1.3- Epidemiologia

A obesidade é uma patologia complexa que afecta todos os estratos económicos. Segundo a OMS em 1995 estimava-se 200 milhões de adultos seriam obesos, sendo que no espaço de 5 anos esse número cresceu para uma estimativa de 300 milhões de indivíduos adultos o que confere à obesidade uma classificação de epidemia.

Em 2016 estima-se que cerca de 650 milhões de adultos seriam obesos (25). Comparando a 1980 os índices de obesidade duplicaram em mais de 70 países com cerca de 4 milhões de mortes associadas a um IMC elevado, sendo a obesidade e o excesso de peso responsáveis por cerca de 3.4 milhões de mortes anualmente com estes indivíduos a perdem cerca de 3.9% da esperança média de vida (7,36).

Segundo os dados disponibilizados pelo instituto nacional de estatística em 2014, 52.8% da população portuguesa com mais de 18 anos de idade tinha excesso de peso (36.4%) ou obesidade (16.4%), o que representa uma aumento total de 1.9% relativamente aos dados obtidos em 2004/2005 (37).

Segundo um estudo realizado por Carmo *et al* publicado em 2007, a prevalência de excesso de peso e de obesidade em Portugal é maior para o sexo masculino comparativamente ao feminino, sendo que a prevalência de obesidade e de excesso de peso, segundo este autor, "...é idêntico ao de Espanha e mais elevado que Holanda, França e Suécia.". Este aumento da obesidade em Portugal poderá ser explicado pelo desenvolvimento do país, com o aumento da urbanização, rotinas, estilo de vida sedentário e uma alimentação menos cuidada, principalmente para grupos etários mais baixos onde a falta de capacidades económicas levam a uma maior desatenção nos cuidados alimentares, onde os níveis de escolaridade também têm uma influência (6,38).

## 1.4- NGS

O DNA e a sua estrutura sempre foi um tema que despertou o interesse da comunidade científica desde a descoberta da sua estrutura tridimensional por parte de Watson e Crick. Desde então esse interesse tem aumentado virando agora o foco para o mapeamento de toda a estrutura do DNA, assim como as suas funções.

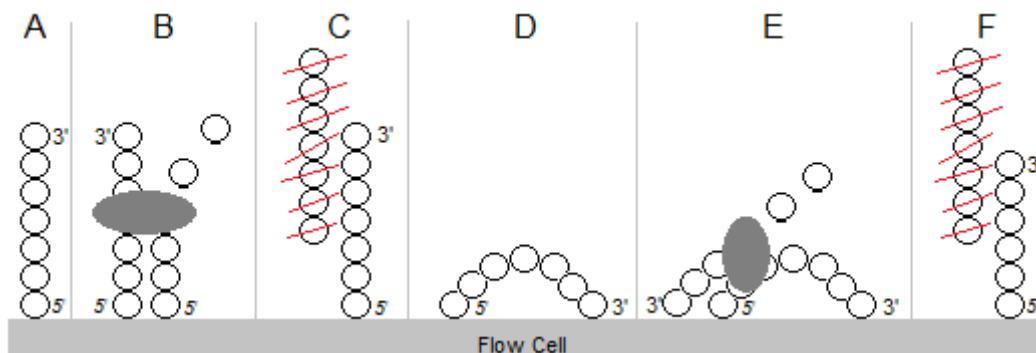
As técnicas de sequenciação de DNA têm evoluído ao longo destes anos e tudo teve início nos anos 70 com 1ª geração de sequenciação de DNA. A sequenciação por electroforese em gel de poliacrilamida foi a técnica que definiu o início desta geração, técnica que sofreu um aperfeiçoamento em 1977 com a técnica de Sanger que conseguiu revolucionar a sequenciação de DNA com uma abordagem que se manteria em utilização durante largos anos, até aos dias de hoje, marcando posição como a principal técnica de sequenciação até 2005 (39,40).

Os avanços tecnológicos continuaram e o aparecimento de técnicas de PCR e tecnologia de DNA recombinante impulsionaram ainda mais este desenvolvimento tecnológico, até surgir um dos primeiros rascunhos para a sequenciação automática com a *ABI PRISM* da *Applied Biosystems* (39) que impulsionou a chegada à 2ª geração da sequenciação.

Com o aparecimento da tecnologia *pyrosequencing* desenvolvido pela *454 Life Sciences* (*Branford, CT, USA*) surgiu o início da época da NGS (*Next Generation Sequencing*) (40) que permitiu aos investigadores sequenciar o genoma humano de uma forma mais célere e com custos reduzidos quando comparado com técnica de Sanger (39). Esta geração de sequenciação é caracterizada pela capacidade de sequenciação em paralelo, abordagem que foi idealizada em 1997 pelos químicos britânicos Shankar Balasubramanian e David Klenerman, que em 2006 desenvolveram o *Solexa Genome Analyzer*, da empresa *Solexa* fundados pelos mesmos em 1998 (41). O lançamento comercial deste equipamento despertou o interesse da *Illumina* que em 2006 adquiriu os direitos desta técnica de sequenciação (39,41).

O princípio geral passa pela sequenciação fazendo passar o DNA por oligonucleótidos dispostos num suporte com ranhuras (“corredores”) transparentes com locais de ligação para oligonucleótidos, este suporte tem o nome de *flow cell* e é aqui que os fragmentos de DNA se vão ligar. O fragmento original liga-se a oligonucleótidos correspondentes dentro da *flow cell* que vai servir de base para a criação do *cluster* (39,41,42).

No que toca à amplificação a *Illumina*® utiliza a *flow cell* para aplicar uma amplificação em ponte. O processo inicia-se com a amplificação dos fragmentos de DNA que se ligaram à *flow cell* (fig1: A e B), na terminação 3' do fragmento são colocadas moléculas capazes de se hibridizarem com oligonucleótidos presentes na *flow cell* (fig 1: C). A terminação 3' destes fragmentos ligam-se à *flow cell*, criando uma ponte entre dois pontos desta (Fig 1: D) onde de seguida é criada uma replicação deste fragmento (Fig 1: E). A ligação no ponto 3' é quebrada e são criados dois fragmentos (Fig 1: F), eliminando o fragmento inicial (42).



**Fig. 1:** Ilustração do processo de sequenciação na *flow cell* por amplificação por ponte. A: Ligação do fragmento de DNA à *flow cell* por oligonucleótidos correspondente; B: Amplificação do fragmento de DNA; C: Eliminação de fragmento de DNA inicial; D: Terminação 3' liga a oligonucleótidos correspondente na *flow cell* criando uma ponte; E: Amplificação de fragmento de DNA; F: Eliminação de fragmento de DNA inicial.

A sequenciação é feita explorando moléculas fluorescentes ligadas a dNTPs, o que significa que o fragmento inicial tem que ser eliminado para permitir uma nova hibridação de dNTP ao terminal 3', ou seja, antes de ocorrer a polimerização do novo fragmento a terminação com dNTP é clivada, garantindo que o novo fragmento polimerizado terá na terminação 3' o nucleótido seguinte onde novamente é ligado dNTP fluorescente. Esta fluorescência apenas acontece excitando a molécula com o comprimento de onda correcto e cada dNTP tem uma molécula fluorescente excitável com um comprimento de onda distinto de forma a diferenciar os 4 nucleótidos presentes no DNA (39).

Após a identificação do nucleótido, inicia-se um novo ciclo e a sequenciação prossegue. A utilização desta abordagem à sequenciação permite obter inúmeras leituras do mesmo gene e do mesmo fragmento o que resulta numa grande quantidade de informação sendo benéfico para a precisão desta metodologia (39,40).

A segunda geração de sequenciação apresenta inúmeras possibilidades no mercado actual através de varias empresas e equipamentos, que apesar de apresentarem diferentes metodologias e reagentes bioquímicos, maioritariamente apresentam o mesmo planeamento de trabalho baseado genericamente em 4 passos. 1º - extracção de DNA; 2º - preparação de bibliotecas, que em certos casos pode incluir amplificação por PCR e adição de index ou códigos (como no caso da *Illumina*®); 3º- Preparação da análise e amplificação das amostras de interesse, por amplificação por ponte ou PCR e 4º- Fase de sequenciação (40).

No que diz respeito à segunda geração de sequenciação a *Illumina* tem conseguido assegurar um maior sucesso com os equipamentos de sequenciação disponíveis no mercado dando um dos maiores contributos para a evolução tecnológica e científica nesta área (39). No entanto, apesar deste facto a evolução continua com a tentativa de rectificar lacunas que ainda existem, onde factores como diferentes metodologias de sequenciação e de preparação de bibliotecas distintas entre diferentes empresas não facilita uma evolução mais célere. A necessidade de uma maior automatização ao juntar a fase de sequenciação e análise de dados assim como melhorar a

capacidade e precisão de leitura dos equipamentos são pontos que necessitam de ser rectificadas e melhoradas nesta geração de sequenciação (40,43).

A lacuna mais relevante desta geração é a necessidade de amplificação do DNA recorrendo a técnicas de PCR, surgindo a necessidade de criar uma alternativa com a capacidade de sequenciação a partir de uma única molécula sem recorrer a métodos de amplificação de DNA, definindo assim a entrada na 3ª geração de sequenciação (39). Esta tendência está a ser seguida e conseguida explorando a nanotecnologia com a criação de nanoporos, área onde a empresa Oxford Nanopore Technologies está a conseguir desenvolver. Apesar da fraca qualidade inicial, esta metodologia pode revolucionar a indústria da sequenciação de DNA podendo trazer uma nova opção com custos reduzidos e rapidez de análise a partir de uma molécula (39).

#### **1.4.1 – NGS e Obesidade**

A segunda geração de sequenciação e os equipamentos de NGS que a caracterizam são as metodologias que são utilizadas actualmente para mapear o genoma humano e a obesidade é uma patologia que desperta o interesse nesta área, principalmente no que toca a formas raras de obesidade (44). Nesta matéria os equipamentos NGS têm dado e podem dar um contributo importante principalmente em certas variantes que não são detectáveis com facilidade e que podem ter influencia no desenvolvimento de obesidade (44).

Nesta matéria os equipamentos NGS têm uma capacidade de sequenciação que permite detetar todas as variantes em simultâneo de um painel alargado de genes, o que para o caso da obesidade apresenta-se como uma opção interessante já que é uma patologia cujas influências genéticas ainda não estão totalmente compreendidas o que permite não só consolidar descobertas anteriores como também abre a porta para o aparecimento de novas variantes ainda não identificadas ou descritas (18,45).

Desta forma, no que toca à genética da obesidade diversos investigadores optam por equipamentos NGS para detetar variantes em genes associados à obesidade. Trabalhos como os de Kleinendorst, *et al*, publicado em Julho de 2018, onde foi utilizado um equipamento NGS para identificar mutações em 52 genes associados à obesidade em 1230 pacientes, numa amostra maioritariamente de nacionalidade Holandesa foi possível confirmar o diagnóstico de obesidade genética em 3.9% dos pacientes, adicionando mais 5.4% pacientes com um possível diagnóstico. Em 48 pacientes com mutações patogénicas associadas à obesidade, 18 pacientes estavam indicados para o gene MC4R (46).

Outro exemplo também poderá ser o trabalho de Nordang, *et al*, onde foi estudada a prevalência de variantes em genes associados à obesidade monogénica (LEP, LEPR, MC4R, PCSK1 e POMC) numa população Norueguesa. O estudo foi conduzido em 487 pacientes com obesidade mórbida e 327 controlos. No total foram identificados 4 casos de obesidade monogénica para o gene MC4R (45).

Estes são apenas dois exemplos de estudos que espelham a importância dos equipamentos NGS para a clínica e para a investigação da obesidade. Como já foi referido os precedentes genéticos associados à obesidade é um tema que ainda não está totalmente compreendido e a utilização de equipamentos NGS permite identificar variantes patogénicas com a capacidade de identificar a sua relevância clínica assim como a que fenótipos as variantes obtidas estão associadas (18). A constante evolução tecnológica e descoberta científica permite também efectuar uma nova análise aos dados obtidos, o que significa que resultados negativos em NGS, podem ser reavaliados no espaço de um ano, já que as plataformas de análise estão em constante actualização (18).

## 2- Objectivos do Estudo

Este trabalho tem dois objectivos:

1- Caracterizar uma pequena amostra (36 indivíduos) de portugueses obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m) procurando variantes em genes que actualmente estão associados a riscos de desenvolvimento desta patologia;

2- Comprovar e salientar a importância das novas tecnologias de sequenciação NGS e o impacto que estas novas metodologias de mapeamento do genoma humano podem ter não só a um nível clínico, com confirmação e sustentação de diagnósticos médicos, mas também a um nível científico com descoberta de novas variantes e alterações até hoje desconhecidas.

## 3- Metodologia

Foram analisadas amostras provenientes de 36 indivíduos obesos (consentimento informado em anexo) com um índice de massa corporal superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>. Todos os participantes são pacientes do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE (Hospital Curry Cabral).

Para a extracção do DNA foi utilizado o *kit ExtractMe*®, da BLIRT SA® sendo que para a preparação da biblioteca (*library*) foi utilizado o *kit TruSight One*® da *Illumina, Inc.* 2017. A sequenciação foi feita com o equipamento *NextSeq550* da *Illumina, Inc.* Para análise de resultados foi utilizado o software da *Illumina*® (*Illumina VarianteStudio 3.0*) onde foram aplicados um filtro PASS e um filtro GQX >= 99 para todas as amostras.

No que toca à metodologia este poderá ser dividido em duas partes, uma fase inicial de extracção de DNA a partir das amostras obtidas e uma segunda fase de preparação da (*Library*) para análise em NGS.

### 3.1- Extracção de DNA:

Para um estudo genético recorrendo à tecnologia de NGS é necessário ter em consideração a concentração mínima de DNA recomendada, não só para viabilizar a análise como também para adquirir dados fidedignos passíveis de serem analisados.

Ao utilizar o *kit TrueSight One*® da *Illumina, Inc* para proceder à preparação das bibliotecas (*library*), está referenciado no protocolo que este foi optimizado para um total de 50 ng de DNA, visto que uma quantidade abaixo deste valor poderá resultar em erros ou perda de fragmentos de DNA ao longo do processo de lavagem. De forma a minimizar estes riscos, a concentração ideal de DNA para cada amostra será de 5 ng/µl. (47)

De forma a reduzir custos e acelerar o processo de aquisição de amostras, as mesmas foram obtidas utilizando manchas de sangue secas (DBSS). Esta primeira tentativa foi feita em linha com um estudo realizado por Hollegard *et al.*, onde o mesmo tipo de amostras foi utilizado também para realizar um estudo recorrendo a técnicas de NGS. (48) Para o processo de extracção de DNA foi utilizado o *kit ExtractMe*®, da *BLIRT SA*®. Neste passo recorreu-se à extracção de DNA a partir de duas amostras (OM1 e OM2) com o objectivo não só de adaptação ao protocolo como também para verificar a se a concentração de DNA obtida estava dentro dos valores mínimos requeridos.

Em ambas as amostras após a primeira extracção o filtro utilizado no passo final foi guardado e foi feita uma segunda eluição, esta opção tornar-se-ia relevante mais tarde permitindo um aumento de concentração de amostras com auxílio de filtros de concentração de DNA (*MicroCon*®). Desta forma, após a extracção de DNA foi feita uma medição de concentração recorrendo a fluometria (*Qubit*®), os resultados obtidos foram os apresentados na tabela 3.1.1:

**Tabela 3.1. 1** - Valores de concentração obtidas em 3 medições da primeira eluição e obtidas em 1 medição da segunda eluição das amostras OM1 e OM2.

Amostra	1ª Eluição				2ª Eluição
	Qubit®				Medição (ng/µl)
	1ª Medição (ng/µl)	2ª Medição (ng/µl)	3ª Medição (ng/µl)	Média (ng/µl)	
OM1	1,04	0,48	0,45	0,657	2,68
OM2	0,12	0,11	0,15	0,13	0,12

Ao avaliar as leituras obtidas na primeira extracção é possível concluir que não existe uma concentração mínima para proceder à análise da amostra em NGS. A opção nesta situação seria a de recorrer à técnica de PCR(48), no entanto, esta opção implicaria correr certos riscos como introdução de erros e contaminações (49). A solução passou então pela obtenção de amostras a partir de células do epitélio bucal com recurso a zaragatoas (50,51). O procedimento de extracção será o mesmo que foi utilizado nas primeiras amostras DBSS recorrendo também ao mesmo *kit* de extracção (*ExtractMe®*, da *BLIRT SA®*) seguindo o protocolo começando no passo 5 (ver Anexo, Protocolo de Extracção).

Mais uma vez, na primeira extracção foram utilizadas duas amostras (60 e 51) onde os resultados finais também se mostraram abaixo dos valores mínimos recomendados, no entanto, a utilização de uma zaragatoa apresenta uma vantagem adicional sendo esta a possibilidade de realizar uma segunda extracção assim como uma segunda eluição se necessário, abrindo a possibilidade para um processo de concentração da amostra. Ao proceder desta forma foram assim obtidas as concentrações desejadas, como é possível verificar na tabela 3.1.2, onde as concentrações excedem os 5 ng/µl sugeridos.

**Tabela 3.1. 2** - Valores de concentrações obtidas das amostras 60 e 51.

Amostra	1ª Extracção
	Qubit®
	Medição (ng/µl)
A51	7,36
A60	6,46

Com os resultados obtidos é assim possível verificar que os valores estão dentro das concentrações mínimas recomendadas para análise em NGS. Ao validar esta possibilidade, o mesmo procedimento foi aplicado a todas as restantes amostras que após a primeira extracção mostraram concentrações iguais ou inferiores a 5 ng/µl.

Foi assim efectuada uma primeira extracção, se se verificasse uma concentração inferior a 5 ng/µl, o que se verificou em 13 amostras, era realizada uma segunda eluição ao repetir todo o protocolo a partir do passo 18 (ver Anexo, Protocolo de Extracção) sendo feita de seguida uma

segunda extracção repetindo também a eluição para esta segunda extracção. No total foram obtidos 4 eluídos em cada uma destas amostras, que no final foram concentradas para 20 µl no *MicroCon*®. Na tabela 3.1.3 estão representados os valores de concentração obtidos em cada um destes passos, assim como as concentrações finais.

**Tabela 3.1. 3-** Concentrações obtidas com recurso a *QuBit*®, de todas as amostras em que foi realizada mais que uma extracção. Todas as extracções foram posteriormente concentradas recorrendo a *MicroCon*®.

Amostr as	1ª Extracção (ng/µl)	2ª Eluição (ng/µl)	2ª Extracção (ng/µl)	2ª Eluição (ng/µl)	Média (ng/µl)	Microcon (ng/µl)
A52	5,460	3,120			4,290	14,10
A54	5,380	3,780			4,580	10,00
A51	1,940	0,810	0,316	0,310	0,844	6,46
A60	1,070	0,280	1,040	0,404	0,699	7,37
A62	2,880	0,970	too low	0,900	1,583	4,20
A59	2,840	2,520	0,108	0,220	1,422	4,46
A12	9,660	1,527			5,594	8,86
A56	0,274	0,402			0,338	1,27
A2	4,780	0,740	0,320		1,947	4,33
A65	3,420	0,218	0,188		1,275	3,77
A70	2,360	0,204	0,112		0,892	2,96
A66	4,080	0,100	too low		2,090	2,52
A68	3,780	0,522	0,190		1,497	3,25

Antes do inicio da preparação da *library* as concentrações de todas as amostras foram medidas 4 vezes no *Qubit*®.

### 3.2- Preparação da *Library*:

Após a extracção de DNA o seguinte processo passa pela preparação da *library* que posteriormente será preparada para análise em NGS. A imagem abaixo representa um esquema apresentado no protocolo *TruSight One*® da *Illumina, Inc.* 2017, que foi o protocolo seguido assim como a utilização do *kit TruSight One*® da *Illumina, Inc.* 2017:

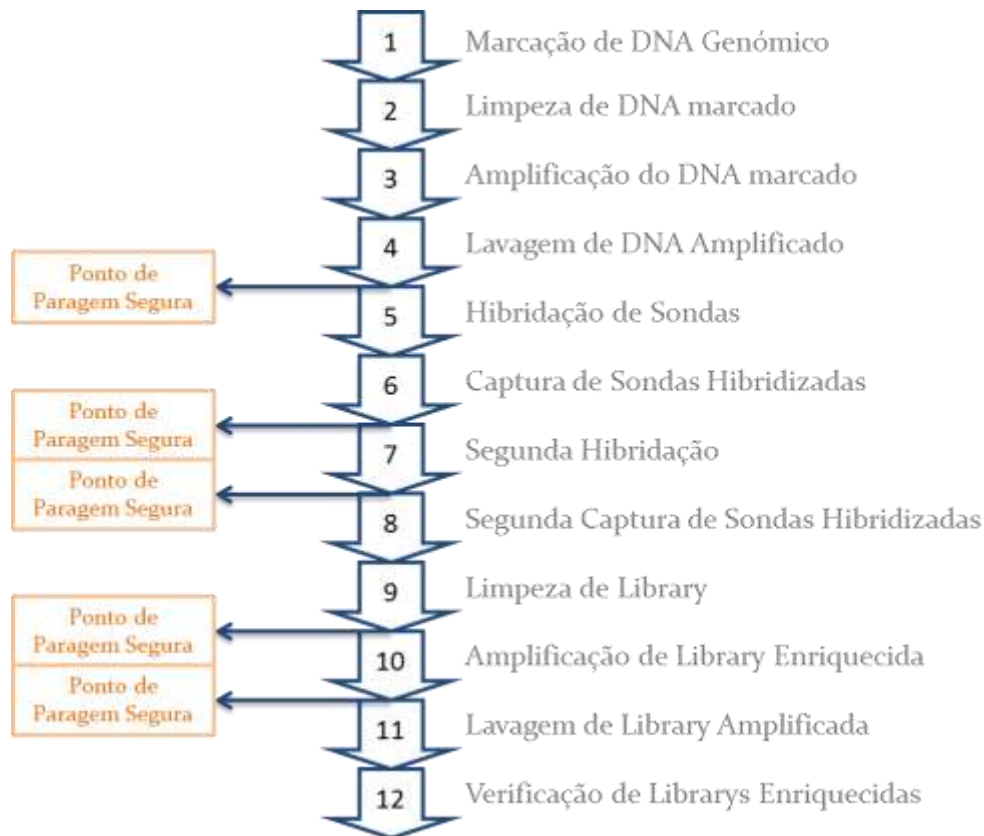


Fig. 2- Diagrama do protocolo *TruSight One*® da *Illumina, Inc.* 2017, utilizada para a preparação da *library*.

#### 3.2.1- Marcação de DNA Genómico;

Este primeiro passo começa por fragmentar o DNA marcando esses fragmentos com adaptadores de sequenciação. Como foi referido anteriormente, para obter a concentração recomendada de DNA é necessário ter 5 ng de DNA em 10 µl de volume total, o que para tal será necessário verificar os valores da concentração média de DNA obtidos após a fase de extracção.

Após o cálculo do valor de concentração de DNA necessária é calculado o volume de Tris-HCL a adicionar de forma a perfazer um volume final de 10 µl. Na tabela 3.2.1.1 estão representados os volumes finais e concentrações para a preparação da *library*:

3.2.1. 1- Valores de concentrações obtidas de todas as amostras em 3 medições com recurso ao *QuBit*®.

Amostras	Média (ng/μl)	DNA (μl)	Tris-Hcl (μl)	Volume final (μ)
A52	15,00	3,33	6,67	10,00
A63	4,93	10,15	0,00	10,15
A54	12,56	3,98	6,02	10,00
A58	34,27	1,46	8,54	10,00
A61	10,15	4,93	5,07	10,00
A40	13,03	3,84	6,16	10,00
A47	8,70	5,75	4,25	10,00
A10	5,49	9,10	0,90	10,00
A39	53,60	0,93	9,07	10,00
A20	6,90	7,25	2,75	10,00
A51	5,29	9,46	0,54	10,00
A60	6,69	7,47	2,53	10,00
A62	4,41	11,33	0,00	11,33
A59	4,24	11,79	0,00	11,79
A8	12,03	4,16	5,84	10,00
A24	12,45	4,02	5,98	10,00
A5	25,77	1,94	8,06	10,00
A29	14,13	3,54	6,46	10,00
A44	9,37	5,33	4,67	10,00
A18	8,04	6,22	3,78	10,00
A37	12,63	3,96	6,04	10,00
A67	7,15	7,00	3,00	10,00
A12	8,86	5,64	4,36	10,00
A64	11,89	4,20	5,80	10,00
A69	8,53	5,86	4,14	10,00
A17	3,94	12,69	0,00	12,69
A56	8,85	5,65	4,35	10,00
A33	12,83	3,90	6,10	10,00
A7	28,20	1,77	8,23	10,00
A32	15,63	3,20	6,80	10,00
A2	4,33	11,54	0,00	11,54
A65	3,77	13,25	0,00	13,25
A70	2,96	16,89	0,00	16,89
A66	2,52	19,82	0,00	19,82
A68	3,25	15,40	0,00	15,40

### **3.2.2- Limpeza de DNA marcado;**

Com os fragmentos de DNA marcados o objectivo passará agora por manter todo o DNA marcado e remover ao máximo todo o que não é DNA marcado. Para esse efeito é utilizado SPB (*Sample Purification Beads*) que tem na sua constituição esferas magnéticas (47). Estas esferas magnéticas (MB) contêm elementos de reconhecimento para uma posterior ligação a um elemento específico (52), sendo neste caso o DNA, que após a hibridação com as MB a amostra é colocada num suporte magnético (*DynaMag®*) explorando assim as propriedades magnéticas das MB e separar os fragmentos de DNA dos restantes compostos.

### **3.2.3-Amplificação do DNA marcado;**

Com a concentração dos fragmentos de DNA é necessário então marcar estes fragmentos de forma a que seja possível distinguir e identificar as diferentes amostras. Com esse objectivo são adicionados dois tipos de adaptadores: um adaptador de sequenciação e dois adaptadores index, um que irá distinguir as diferentes *librarys* (i5) e outro que irá diferenciar todas as amostras (i7). Foi de seguida aplicado um programa de 10 ciclos de PCR, onde é feita a amplificação dos fragmentos de DNA adicionando no processo os index.

A tabela 3.2.3.1 abaixo apresentada representa a distribuição dos index nas amostras utilizadas e nas *librarys*:

**Tabela 3.2.3. 1** - Distribuição de índice.

Amostras	Index i7	Sequência DNA	Index i5	Sequência DNA
A52	N701	TAAGGCGA	E502	CTCTCTAT
A63	N702	CGTACTAG	E502	CTCTCTAT
A54	N703	AGGCAGAA	E502	CTCTCTAT
A58	N704	TCCTGAGC	E502	CTCTCTAT
A61	N705	GGA CTCCT	E502	CTCTCTAT
A40	N706	TAGGCATG	E502	CTCTCTAT
A47	N707	CTCTCTAC	E502	CTCTCTAT
A10	N708	CAGAGAGG	E502	CTCTCTAT
A39	N709	GCTACGCT	E502	CTCTCTAT
A20	N710	CGAGGCTG	E502	CTCTCTAT
A51	N711	AAGAGGCA	E502	CTCTCTAT
A60	N712	G TAGAGGA	E502	CTCTCTAT
A62	N701	TAAGGCGA	E503	TATCCTCT
A59	N702	CGTACTAG	E503	TATCCTCT
A8	N703	AGGCAGAA	E503	TATCCTCT
A24	N704	TCCTGAGC	E503	TATCCTCT
A5	N705	GGA CTCCT	E503	TATCCTCT
A29	N706	TAGGCATG	E503	TATCCTCT
A44	N707	CTCTCTAC	E503	TATCCTCT
A18	N708	CAGAGAGG	E503	TATCCTCT
A30	N709	GCTACGCT	E503	TATCCTCT
A37	N710	CGAGGCTG	E503	TATCCTCT
A67	N711	AAGAGGCA	E503	TATCCTCT
A12	N712	G TAGAGGA	E503	TATCCTCT
A64	N701	TAAGGCGA	E504	AGAGTAGA
A69	N702	CGTACTAG	E504	AGAGTAGA
A17	N703	AGGCAGAA	E504	AGAGTAGA
A56	N704	TCCTGAGC	E504	AGAGTAGA
A33	N705	GGA CTCCT	E504	AGAGTAGA
A7	N706	TAGGCATG	E504	AGAGTAGA
A32	N707	CTCTCTAC	E504	AGAGTAGA
A2	N708	CAGAGAGG	E504	AGAGTAGA
A65	N709	GCTACGCT	E504	AGAGTAGA
A70	N710	CGAGGCTG	E504	AGAGTAGA
A66	N711	AAGAGGCA	E504	AGAGTAGA
A68	N712	G TAGAGGA	E504	AGAGTAGA

### 3.2.4- Lavagem de DNA Amplificado;

Ao obter os fragmentos de DNA amplificados e com índice associados é necessário extrair apenas o DNA de interesse, para tal são utilizadas novamente as MB.

Após descartar o sobrenadante é feita uma medição intermédia de concentração de DNA (Qubit®) e uma medição de tamanho de fragmentos de DNA recorrendo à *TapStation*. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.2.4.1 e na tabela 3.2.4.2:

**Tabela 3.2.4. 1-** Concentrações de DNA em cada amostra.

Amostras	QuBit®		
	1ª Medição (ng/μl)	2ª Medição (ng/μl)	Média (ng/μl)
A52	39,00	39,00	39,00
A63	68,40	68,40	68,40
A54	71,20	71,20	71,20
A58	73,00	73,00	73,00
A61	57,00	57,00	57,00
A40	71,40	71,40	71,40
A47	64,60	64,60	64,60
A10	77,40	77,40	77,40
A39	57,40	57,40	57,40
A20	64,80	64,80	64,80
A51	68,60	68,60	68,60
A60	51,00	51,00	51,00
A62	69,00	71,40	70,20
A59	57,20	60,40	58,80
A8	75,60	73,20	74,40
A24	77,60	70,60	74,10
A5	63,20	64,20	63,70
A29	70,40	67,80	69,10
A44	58,60	67,80	63,20
A18	57,20	56,60	56,90
A30	61,00	60,20	60,60
A37	60,40	62,40	61,40
A67	64,20	61,40	62,80
A12	69,20	63,80	66,50
A64	64,00	68,40	66,20
A69	64,80	56,60	60,70
A17	63,80	58,20	61,00
A56	62,60	63,40	63,00
A33	68,00	73,40	70,70
A7	59,60	52,40	56,00
A32	36,40	33,20	34,80
A2	51,40	52,80	52,10
A65	56,40	57,80	57,10
A70	53,80	58,20	56,00
A66	64,40	62,40	63,40
A68	54,40	60,80	57,60

**Tabela 3.2.4. 2-** Concentração e tamanho de fragmentos de DNA em cada amostra com recurso à TapStation.

Amostras	TapeStation	
	Pmol/l	Tamanho Médio [200 bp;1000 bp]
A52	30.600	Erro
A63	23.800	Erro
A54	16.200	Erro
A58	20.400	Erro
A61	46.900	Erro
A40	33.000	Erro
A47	8.710	Erro
A10	Erro	Erro
A39	23.600	Erro
A20	15.600	Erro
A51	24.400	Erro
A60	29.000	Erro
A62	23.800	293
A59	32.000	321
A8	25.400	296
A24	Erro	Erro
A5	43.000	300
A29	62.900	323
A44	50.500	300
A18	Erro	Erro
A30	51.300	312
A37	Erro	Erro
A67	45.800	351
A12	Erro	Erro
A64	37.300	310
A69	52.900	314
A17	47.700	295
A56	8.710	356
A33	73.700	328
A7	30.000	349
A32	27.400	303
A2	29.000	330
A65	14.800	397
A70	27.900	326
A66	20.000	247
A68	20.700	294

### **3.2.5- Hibridação de Sondas;**

Este passo tem como objectivo juntar 12 amostras criando uma library. Para tal é necessário ter em consideração as concentrações médias de DNA em cada amostra (consultar tabela 3.2.4.1). Ao juntar 12 amostras é necessário ter em consideração que o protocolo recomenda que de cada amostra sejam retirado um total de 500 ng de DNA.

As amostras são distribuídas entre 3 *librarys* e os volumes correctos de cada amostra são adicionados ao tubo *ependorf* da *library* correspondente.

Neste passo são ainda adicionados aos fragmentos de DNA de interesse marcadores específicos que serão explorados nos passos seguintes por sondas de captura (47).

### **3.2.6- Captura de Sondas Hibridizadas;**

De forma a capturar os fragmentos de interesse são adicionadas novas MB que têm a capacidade de se ligarem a marcadores específicos que foram adicionados à amostra no passo anterior. São de seguida feitas lavagens de forma a eliminar zonas de ligação não específicas. Ao terminar este processo o DNA de interesse é eluído das MB ficando assim uma *library* enriquecida.

### **3.2.7- Segunda Hibridação;**

Este passo procura atingir uma maior especificidade, repetindo o passo 3.2.5. a partir apenas do momento em que são adicionados os marcadores específicos.

### **3.2.8- Segunda Captura de Sondas Hibridizadas;**

Repetição do passo 3.2.6, o que permite garantir não só um maior enriquecimento das *librarys* como também uma maior especificidade na captura de regiões de interesse.

### **3.2.9- Limpeza de Library;**

São utilizados outro tipo e MB sendo que neste caso o objectivo será o de manter apenas o DNA de interesse e eliminar todo o restante conteúdo. O resultado deste processo deverá ser uma *library* enriquecida onde o DNA presente pertence apenas às regiões de interesse.

### **3.2.10- Amplificação de Library Enriquecida;**

Já com as *librarys* enriquecidas é realizada uma amplificação das mesmas recorrendo a PCR.

### **3.2.11- Lavagem de Library Amplificada;**

Explorando o mesmo principio que foi aplicado no passo 3.2.9, são utilizadas MB para que seja possível remover todos os reagentes/compostos não desejados. O resultado será uma biblioteca enriquecida apenas com DNA de interesse amplificado pronto para análise em NGS.

### **3.2.12- Verificação de Librarys Enriquecidas;**

O Objectivo deste último passo será o de quantificar as *librarys*, para esse efeito foram feitas 3 tipos de medições recorrendo a fluorometria (*QuBit®*), à *TapStation* e ao PCR em tempo real.

### **3.3 – Quantificação de Librarys;**

A quantificação de *librarys* é um passo importante na sequenciação em NGS onde as concentrações de DNA e o tamanho dos fragmentos têm relevância na qualidade da análise final (53).

Para este trabalho foram utilizados dois equipamentos, o *Qubit®* da *Thermo Fisher Scientific Inc.* e a *Tapstation* da *Agilent Technologies*. Ambos os equipamentos mostraram a capacidade de obter resultados de concentração aproximadas dos valores *standard* indicados pela marca (53).

O sistema *Tapstation*, é um equipamento de electroforese automática com capacidade para analisar e distinguir amostras com um tamanho entre 200 a 60000 pb, mostrando ser um equipamento fiáveis para quantificação em NGS (54).

### **3.4 - Procedimento;**

#### **3.4.1- Sequenciação em NGS;**

Para a sequenciação foi utilizado o equipamento *NextSeq550* da *Illumina, Inc.* Onde foi aplicada o seguinte procedimento, como recomendado no protocolo:

- Preparação de *cartridge* e de *flow cell*:
- Desnaturação e diluição de *librarys*, para um volume final de 1.3 ml.
- Concentração final de *librarys* é colocada no poço 10 da *cartridge*.
- No equipamento, é seleccionada a opção *sequence*.
- É colocada a *flow cell*.
- É colocado o recipiente de regentes tampão e de regentes.
- São introduzidos os parâmetros finais, assim como as referências das amostras de acordo com os *index* correctos.
- Dá-se início à sequenciação.

## 4- Resultados

### 4.1 – Extracção

Antes de iniciar a preparação das *librarys* é necessário avaliar as concentrações de DNA recolhidas das amostras, tendo em atenção para a concentração de DNA mínima recomendada de 5 ng/μl. A tabela 4.1.1 representa as concentrações obtidas por amostra após a extracção de DNA.

**Tabela 4.1. 1-** Valores de concentrações obtidas de todas as amostras em 3 medições com recurso ao *QuBit*®.

Amostras	1ª Medição (ng/μl)	2ª Medição (ng/μl)	3ª Medição (ng/μl)	Média (ng/μl)
A52	15,70	15,70	13,60	15,00
A63	4,56	4,44	5,78	4,93
A54	19,00	10,10	8,58	12,56
A58	37,00	34,80	31,00	34,27
A61	8,84	11,30	10,30	10,15
A40	11,50	11,10	16,50	13,03
A47	4,96	13,70	7,44	8,70
A10	4,62	5,92	5,94	5,49
A39	46,60	37,80	76,40	53,60
A20	7,74	7,64	5,32	6,90
A51	5,28	4,94	5,64	5,29
A60	6,00	7,18	6,90	6,69
A62	4,20	4,66	4,38	4,41
A59	4,46	4,56	3,70	4,24
A8	10,90	11,80	13,40	12,03
A24	18,40	12,50	6,44	12,45
A5	34,00	26,80	16,50	25,77
A29	17,50	12,70	12,20	14,13
A44	7,22	10,90	10,00	9,37
A18	12,40	6,40	5,32	8,04
A30	6,24	7,94	8,32	7,50
A37	16,30	15,30	6,28	12,63
A67	10,40	5,56	5,48	7,15
A12	9,66	9,20	7,72	8,86
A64	13,10	12,90	9,68	11,89
A69	10,30	7,70	7,58	8,53
A17	5,28	3,22	3,32	3,94
A56	14,80	6,90	4,86	8,85
A33	13,90	12,50	12,10	12,83
A7	34,20	24,40	26,00	28,20
A32	16,20	16,30	14,40	15,63
A2	3,18	4,82	5,00	4,33
A65	3,12	4,20	4,00	3,77
A70	2,14	3,38	3,36	2,96
A66	1,65	3,18	2,74	2,52
A68	3,10	3,44	3,20	3,25

## 4.2 – Library

No total foram criadas 3 *libraries* onde foram incluídas, de forma aleatória, 12 amostras em cada uma delas. Para esse efeito seria necessário garantir que cada amostra contribuiria com 500 ng de DNA. Para esse efeito foi aplicado o cálculo apresentado no subcapítulo 3.2.5 de onde foi obtido o volume necessário a ser retirado a cada amostra. A tabela 4.2.1 apresenta o volume total adicionada de cada amostra, ilustrando também a distribuição das amostras pelas respectivas *libraries*.

**Tabela 4.2. 1-** Representação das *libraries*, concentração média de DNA em cada amostra e volume a retirar para perfazer um total de 500 ng de DNA por *library*.

	QuBit®		
	Amostras	Média (ng/μl)	Para 500 ng de massa de DNA (μ)
Library 1	A52	39,00	12,82
	A63	68,40	7,31
	A54	71,20	7,02
	A58	73,00	6,85
	A61	57,00	8,77
	A40	71,40	7,00
	A47	64,60	7,74
	A10	77,40	6,46
	A39	57,40	8,71
	A20	64,80	7,72
	A51	68,60	7,29
	A60	51,00	9,80
Library 2	A62	70,20	7,12
	A59	58,80	8,50
	A8	74,40	6,72
	A24	74,10	6,75
	A5	63,70	7,85
	A29	69,10	7,24
	A44	63,20	7,91
	A18	56,90	8,79
	A30	60,60	8,25
	A37	61,40	8,14
	A67	62,80	7,96
	A12	66,50	7,52
Library 3	A64	66,20	7,55
	A69	60,70	8,24
	A17	61,00	8,20
	A56	63,00	7,94
	A33	70,70	7,07
	A7	56,00	8,93
	A32	34,80	14,37
	A2	52,10	9,60
	A65	57,10	8,76
	A70	56,00	8,93
	A66	63,40	7,89
	A68	57,60	8,68

Ao terminar a preparação das *libraries* é necessário obter dois tipos de medições, sendo o primeiro os valores de concentração de DNA, que estão representados na tabela 4.2.2, e em segundo lugar o tamanho médio dos fragmentos de DNA obtidos em cada *library*. No caso do último, é recomendado um tamanho médio que esteja entre o intervalo de 200 a 1000 pares de bases. Os resultados obtidos para o tamanho médio dos fragmentos de DNA em cada *library* é apresentada na tabela 4.2.3.

**Tabela 4.2. 2-** Valores referentes à medição de concentração efectuada em fluorometria:

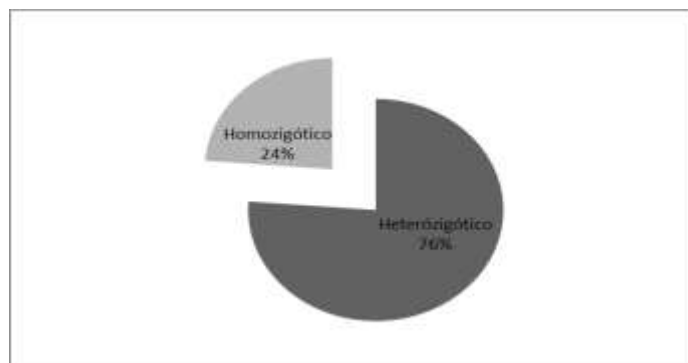
	QuBit®			
	1ª Medição (ng/μl)	2ª Medição (ng/μl)	3ª Medição (ng/μl)	Média (ng/μl)
Library 1	1,040	0,962	0,890	0,964
Library 2	0,726	0,680	0,728	0,711
Library 3	0,504	0,472	0,484	0,487

**Tabela 4.2. 3-** Valores referentes às medições efetuadas em TapStation, com referencia a concentração e tamanho de fragmentos de interesse. É de salientar que o tamanho ideal recomendado será de 200 pares de bases (bp) a 1000 bp. Library 1.1, Library 2.1 e Library 3.1 são repetições da Library 1, Library 2 e Library 3, respectivamente:

	TapeStation		
	Pg/μl	(Pmol/l)	Tamanho Médio [200 bp;1000 bp]
Library 1	1.190	5.320	345
Library 1.1	1.140	5.040	349
Library 2	836	3.530	373
Library 2.1	774	3.380	352
Library 3	543	2.400	347
Library 3.1	558	2.460	349

### 4.3 – Análise Global

No total foram encontradas 186 alterações, destas, 183 são variações de um nucleótido (snv), duas inserções e uma deleção. Relativamente ao genótipo, 141 alterações são heterozigóticas e 44 homozigóticas, 76% e 24% respectivamente (Gráfico 4.3.1).

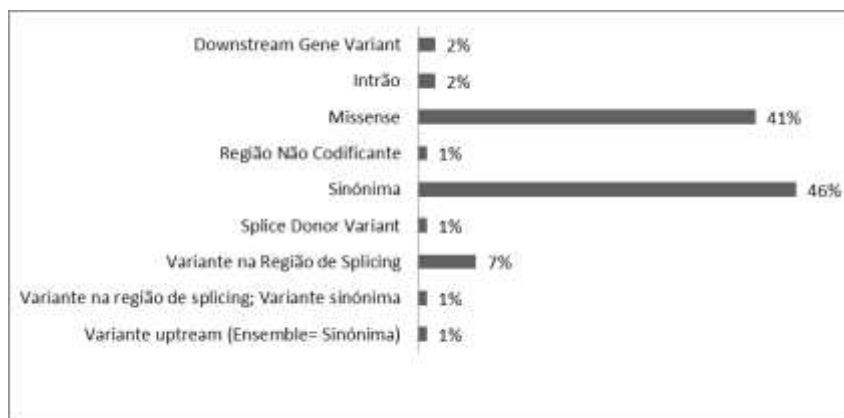


**Gráfico 4.3. 1**– Percentagem de amostras Homozigóticas e Heterozigóticas.

No que toca à consequência foram obtidas 9 tipos de alterações, sendo de destacar as variantes missense e sinónimas que ambas representam 87% do total das variações encontradas. A tabela abaixo apresentada apresenta o número de variantes encontradas (Tabela 4.3.2), já o gráfico representa a distribuição destas mesmas variantes por percentagem (Figura 4.3.2).

**Tabela 4.3. 1**– Número de alterações encontradas em cada variante.

Consequência	Nº de Alterações Encontradas
Downstream Gene Variant	3
Intrão	3
Missense	77
Região Não Codificante	2
Sinónimas	85
Splice Donor Variant	1
Variante na Região de <i>Splicing</i>	13
Variante na região de splicing; Variante sinónima	1
Variante upstream (Ensemble= Sinónima)	1



**Gráfico 4.3. 1**– Percentagem de variantes encontradas.

As previsões polyphen ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)) são uma ferramenta importante cujo objectivo passa (a partir de um cálculo automático) por prever um possível impacto de uma variante não-sinónima (55). Segundo esta previsão, tanto a partir do *software* utilizado como em consulta no *site Ensemble* foram obtidas referências em 80 alterações sendo 77 pertencentes a variações missense, 1 a variação Intrão, 1 a Variante *upstream* (Ensemble= Silenciosa) e 1 a *Downstream* do gene. As previsões Polyphen encontradas são apresentadas na Tabela 4.3.2.

**Tabela 4.3. 2**– Número total de referências Polyphen encontradas.

Informação Polyphen	Total Encontradas
Benigno	58
Possivelmente Benigno	1
Possivelmente Patogénico	21

Ao analisar os dados obtidos a partir da *base de dados 1000 Genome* foi possível constatar de 50 das variações obtidas apresentavam uma incidência global abaixo de 1%, o que poderá indicar a possibilidade de mutação (56), havendo 49 heterózigóticos e um homozigótico.

## 4.4 – Análise por Gene;

Os valores de prevalência apresentados têm por base resultados adquiridos a partir de *1000 Genome project*. No que toca à significância clínica associadas ao fenótipo, as mesmas serão baseadas na informação *ClinVar* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)) obtida a partir da base de dados NCBI (accedida entre os meses de Julho e Agosto de 2018), quando disponíveis na base de dados, se esta não tiver informação disponível a significância clínica estará devidamente referenciada.

### 4.4.1 ADRB1

Variante deste gene são referentes ao cromossoma 10, todos *snv*. Alterações neste gene foram encontradas em 19 das amostras analisadas, sendo 3 homozigóticas e 16 heterozigóticas.

Uma alteração missense foi encontrada, a informação da mesma é apresentada na tabela seguinte (Tabela 4.4.1.1).

**Tabela 4.4.1. 1**– Alterações missense encontradas no gene ADRB1 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº de Amostras
rs1801253	1165G>C	Gly389Arg	70,17%	68,49%	19

Esta variante missense tem uma previsão polyphen de benigna estando associada ao peso à nascença (57) sendo que segundo a base de dados *1000 Genome*, nenhuma destas variantes têm uma prevalência global e/ou europeia abaixo de 1%.

#### 4.4.2 ADRB2

Gene com variantes no cromossoma 5 tendo sido obtidas 13 variações snv sendo 7 heterozigóticas e 6 homozigóticas. Das amostras analisadas 23 apresentaram alterações neste gene.

A tabela abaixo apresentada revela as variantes missense encontradas (Tabela 4.4.2.1).

**Tabela 4.4.2. 1**– Alterações missense encontradas no gene ADRB2 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, , assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº de Amostras
rs1042713	46G>A	Gly16Arg	47,56%	38,57%	13
rs1042714	79G>C	Glu27Gln	79,57%	59,04%	20
rs1800888	491C>T	Thr164Ile	0,4%	1,79%	2
rs3729943	659C>G	.Ser220Cys	0,98%	0%	1

À excepção da variante 659C>G que tem uma previsão polyphen de possivelmente patogénica, todas as restantes apresentam uma previsão polyphen de benigno. No que toca às implicações clínicas associadas a estas alterações, a tabela 4.4.2.2 indica essas mesmas alterações:

**Tabela 4.4.2. 2**– Significância clínica das alterações missense obtidas para o gene ADRB2 segundo informação obtida pela base de dados *ClinVar*, NCBI.

Missense	Significância Clínica
46G>A	Risco de obesidade
79G>C	Susceptibilidade a Obesidade
491C>T	Resposta reduzida a agonista de Adrenoreceptor-Beta-2
659C>G	Hipertensão (58)

#### 4.4.3 ADBR3

Gene com variantes no cromossoma 8 tendo sido obtidas 4 variações snv sendo todas heterozigóticas. Das amostras analisadas, 4 apresentaram alterações neste gene. Foram obtidas variantes missense e uma variante na região de *splicing* (1205+3A>G) sem identificação ou informação.

A tabela 4.4.3.1 apresentada revela as alterações missense obtidas:

**Tabela 4.4.3.1**– Alterações missense obtidas no gene ADRB3 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº de Amostras
rs374271379	1033A>G	Ile345Val	0,06%	0%	1
rs4994	190T>C	Trp64Arg	11,5%	8,15%	4
rs4995	794C>T	Thr265Met	0,42%	0%	1

Uma das variantes obtidas (1033A>G) apresenta uma previsão polyphen de possivelmente patogénica, sendo as restantes benigno. A significância clínica associada a estas variantes é apresentada na tabela 4.4.3.2.

**Tabela 4.4.3.2**– Significância clínica das alterações missense obtidas para o gene ADRB3 segundo informação obtida pela base de dados *ClinVar*, NCBI.

Missense	Significância Clínica
1033A>G	Sem Informação disponível
190T>C	Obesidade
794C>T	Sem Informação disponível

#### 4.4.4 BDNF

Gene no cromossoma 11 tendo sido obtidas 3 variações snv sendo as 3 heterózigóticas. Das amostras analisadas, 9 apresentaram alterações neste gene. Foram obtidas uma variante *downstream gene* para o gene BDNF e duas variantes em região não codificante para o gene BDNF-AS, BDNF, sendo elas 434C>T (rs6265) e 358G>T (rs745707481). A primeira (434C>T) com uma prevalência global de 20.13% e europeia de 19.68% segundo a base de dados *1000 Genome Project* tendo também uma previsão polyphen de benigno, estando esta associada a anorexia nervosa e bulimia nervosa. A segunda variante, 358G>T, não apresenta informação de *1000 Genome Project* e *ClinVar*.

#### 4.4.5 FTO;

Gene no cromossoma 16 tendo sido obtidas 3 variações snv sendo as 3 heterózigóticas. Das amostras analisadas, 3 apresentaram alterações neste gene. Uma variante missense foi obtida, (rs144743617) 767G>A Ser256Asn, com uma incidência global de 0.16% e europeia de 0.4% com uma previsão polyphen de benigno, sendo que para este alelo não existe informação *ClinVar* disponível.

#### 4.4.6 IGF2R

Gene no cromossoma 6 tendo sido obtidas 27 variações snv sendo 20 heterózigóticas. Das amostras analisadas 33 apresentaram alterações neste gene. Na tabela 4.4.6.1 apresentada estão descritas as alterações missense obtidas.

**Tabela 4.4.6.1**– Alterações missense obtidas no gene IGF2R com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº de Amostras
rs629849	4855A>G	Arg1619Gly	90,32%	86,38%	28
rs8191754	754C>G	Leu252Val	16,03%	14,81%	7
rs8191842	3320C>T	Thr1107Met	2,08%	0,1%	1
rs150809922	745C>T	Arg249Trp	0,76%	0%	1
rs77999960	4511C>T	Thr1504Ile	0,12%	0,2%	1
rs139109340	6857G>A	Ser2286Asn	0,04%	0%	1
rs148608443	1063G>A	Asp355Asn	0,02%	0,1%	1
rs146110381	4094A>G	Asp1365Gly	0%	0%	1

Segundo a classificação polyphen 3 das variações obtidas correspondem a variações possivelmente patogénica, sendo elas 754C>G, 3320C>T e 745C>T. As restantes estão classificadas

como benignas. No que toca ao fenótipo, nenhuma das variantes indicadas apresentam informação *ClinVar*, sendo que o SNP rs629849 reflete alterações associadas à obesidade (59).

#### 4.4.7 LEP

Gene no cromossoma 7 tendo sido obtidas 1 variações snv sendo esta heterózigótica. Das amostras analisadas 1 apresenta alterações neste gene. A variante obtida é missense (rs17151919) 280G>A Val94Met, com uma classificação polyphen de benigno com uma prevalência global de 2.75% e uma prevalência europeia de 0%. Segundo a informação da base de dados ClinVar, esta variante está associada a deficiência ou disfunção de leptina, obesidade monogénica não-sintomática e diabetes monogénica.

#### 4.4.8 LEPR

Gene no cromossoma 1 tendo sido obtidas 8 variações snv havendo 5 heterózigóticas. Das amostras analisadas 33 apresentam alterações neste gene. A tabela 4.4.8.1 descreve as alterações missense obtidas.

**Tabela 4.4.8.1**– Alterações missense obtidas no gene LEPROT, LEPR com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
rs1137101	668A>G	Gln223Arg	58,43%	46,92%	24
rs1805094	1968G>C	Lys656Asn	14,24%	15,11%	12

As variantes obtidas para este gene são variantes benignas segundo a classificação polyphen. A significância clínica associada a estas variante são apresentadas na tabela 4.4.8.2.

**Tabela 4.4.8.2**– Significância clínica das alterações missense obtidas para o gene LEPROT, LEPR segundo informação obtida pela base de dados ClinVar, NCBI.

Missense	Significância Clínica
668A>G	Polimorfismo receptor da leptina, Deficiência receptor da leptina, obesidade monogénica não-sintomática
1968G>C	Polimorfismo receptor da leptina, Diabetes monogénica (significância incerta)

#### 4.4.9 LRP2

Gene com variantes no cromossoma 2 tendo sido obtidas 59 variações snv, 43 dos quais são heterózigóticos. Das amostras analisadas 33 apresentam alterações neste gene. A tabela 4.4.9.1 descreve as alterações missense obtidas:

**Tabela 4.4.9.1**– Alterações missense obtidas no gene LRP2 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
Sem informação	12385A>G	Asn4129Asp	0%	0%	1
rs138269726	6160G>A	Asp2054Asn	0,04%	0,20%	1
rs144081819	10804G>A	Ala3602Thr	0,88%	0,10%	1
rs147058423	3110G>A	Arg1037Lys	0,02%	0,10%	2
rs150552608	3452C>T	Pro1151Leu	1,52%	0,20%	2
rs17848169	7894A>G	Asn2632Asp	1,72%	3,97%	1
rs189273089	9592G>A	Glu3198Lys	0,04%	0%	2
rs2075252	12280A>G	Lys4094Glu	77,80%	76,24%	28
rs2228171	8614G>A	Ala2872Thr	26,80%	25,94%	15
rs2229263	248A>G	Asn83Ser	30,63%	27,83%	13
rs34291900	2006G>A	Gly669Asp	1,50%	3,68%	1
rs34355135	11092G>A	Val3698Met	0,38%	0,60%	1
rs34693334	775G>C	Gly259Arg	4,03%	8,05%	2
rs35086590	9413G>A	Arg3138His	0,34%	0,10%	1
rs371867711	13156G>A	Gly4386Arg	0%	0%	1
rs41268685	13250G>A	Gly4417Asp	0,58%	1,19%	1
rs4667591	12628A>C	Ile4210Leu	55,59%	79,32%	24
rs79723119	11996T>G	Val3999Gly	0,42%	1,79%	2

Das variantes missense obtidas a variante LRP2 12385A>G Asn4129Asp não apresenta informação apesar de uma previsão polyphen de possivelmente patogénica. As restantes variantes com previsão polyphen de possivelmente patogénica são as variantes LRP2 6160G>A Asp2054Asn, LRP2 10804G>A Ala3602Thr, LRP2 2006G>A Gly669Asp, LRP2 13250G>A Gly4417Asp e LRP2 12628A>C Ile4210Leu, sendo que as restantes variantes têm uma previsão de benigno.

No que toca à significância clínica, estas variantes não apresentam fenótipo directamente associado a obesidade segundo informação da base de dados *ClinVar*. O SPN rs34291900, tem uma associação ao nível de colesterol HDL (60).

#### 4.4.10 MC3R

Gene com variantes no cromossoma 20 tendo sido obtidas 2 variações snv havendo uma heterózigótica. Das amostras analisadas 5 apresentam alterações neste gene. A tabela 4.4.10.1 descreve as alterações missense obtidas.

**Tabela 4.4.10.1**– Alterações missense obtidas no gene MC3R com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
rs3827103	130G>A	Val44Ile	25,22%	7,65%	5

A variante missense obtida tem uma classificação polyphen de benigno, sendo que relativamente ao fenótipo, existe uma associação à susceptibilidade de desenvolver obesidade infantil e resistência à insulina para o SNP rs3827103 do gene MC3R (61).

#### 4.4.11 MC4R

Gene no cromossoma 18 tendo sido obtidas 1 variante snv sendo esta heterózigótica. Das amostras analisadas 2 apresentam alterações neste gene. A variante obtida é missense MC4R (rs2229616) 307G>A Val103Ile, com uma classificação polyphen de benigno com uma prevalência global de 1.62% e uma prevalência europeia de 0.69%. Segundo a informação da base de dados ClinVar, o fenótipo está associada ao risco de desenvolver obesidade e diabetes monogénica.

#### 4.4.12 NEGR1

Gene no cromossoma 1 tendo sido obtidas 3 variantes snv havendo 2 heterózigóticas. Das amostras analisadas 32 apresentam alterações neste gene. As variantes obtidas são sinónimas.

#### 4.4.13 NPY

Gene no cromossoma 7 tendo sido obtidas 5 variantes snv havendo 3 heterózigóticas. Das amostras analisadas 23 apresentam alterações neste gene. Foi obtida uma variante missense NPY (rs16139) 20T>C Leu7Pro numa amostra, com uma previsão polyphen de possivelmente patogénica com uma prevalência global de 1.70% e uma prevalência europeia de 3.97%. Este SNP está associado à predisposição para desenvolver diabetes tipo 2 (62).

#### 4.4.14 NPY1R

Gene no cromossoma 4 tendo sido obtidas 1 variante snv sendo esta heterózigótica. Das amostras analisadas 2 apresentam alterações neste gene. Foi obtida uma variante missense NPY1R (rs5578) 1121A>C Lys374Thr, com uma previsão polyphen benigno com uma prevalência global de

0.30% e uma prevalência europeia de 0.69%. Não foi encontrada informação relativamente ao fenótipo.

#### 4.4.15 NPY2R

Gene no cromossoma 4 tendo sido obtidas 5 variantes snv havendo 3 heterózigóticas. Das amostras analisadas 27 apresentam alterações neste gene. Todas as variantes encontradas são sinónimas.

#### 4.4.16 NTRK2

Gene no cromossoma 9 tendo sido obtidas 2 variantes snv ambas heterózigóticas. Das amostras analisadas 5 apresentam alterações neste gene. Uma variante obtida é sinónima, sendo a segunda uma variante na região de *splicing*.

#### 4.4.17 PCSK1

Gene no cromossoma 5 tendo sido obtidas 8 variantes snv havendo 5 heterózigóticas. Das amostras analisadas 29 apresentam alterações neste gene. A tabela 4.4.17.1 descreve as alterações missense obtidas.

**Tabela 4.4.17.1**– Alterações missense obtidas no gene PCSK1 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
rs6232	661A>G	Asn221Asp	2,10%	3,28%	2
rs6235	2069G>C	Ser690Thr	24,38%	25,94%	13
rs6234	1993C>G	Gln665Glu	25,92%	26,04%	5

Todas estas variantes são benignas segundo a previsão polyphen, no que toca ao fenótipo a tabela 4.4.17.2 apresenta as consequências clínicas associadas a estas variantes.

**Tabela 4.4.17.2**– Significância clínica das alterações missense obtidas para o gene LEPROT, LEPR segundo informação obtida pela base de dados *ClinVar*, NCBI.

Missense	Significância Clínica
661A>G	Índice de massa corporal
2069G>C	Obesidade monogénica não sintomática
1993C>G	Obesidade monogénica não sintomática

#### 4.4.18 POMC

Gene com variante no cromossoma 2 onde foi obtidas uma inserção, heterozigótica, proveniente de uma amostra POMC (rs10654394) 289\_297dupAGCAGCGGC Gly99\_Ala100insSerSerGly, esta variante apresenta uma prevalência global de 7.71% e uma prevalência europeia de 4.27%, sendo que não se encontrou informação polyphen. O fenótipo associado a esta variante segundo a base de dados *ClinVar* é de obesidade monogénica não sintomática.

A segunda variante obtida para este gene, é uma variante snv heterozigótica POMC (rs28932472) 706C>G Arg236Gly, proveniente de duas amostras, com uma prevalência global de 0.24% e uma prevalência europeia de 0.30% sendo esta variante possivelmente patogénica de acordo com a base de dados polyphen. Esta variante está associada à susceptibilidade a obesidade pela base de dados *ClinVar*.

#### 4.4.19 SH2B1

Gene no cromossoma 16 tendo sido obtidas 4 variantes snv havendo 3 heterózigóticas. Das amostras analisadas 13 apresentam alterações neste gene. A variante missense obtida em 9 amostras, SH2B1 (rs7498665) 1450A>G Thr484Ala, é uma variante benigna segundo a base de dados polyphen, com uma prevalência global de 26,14% e europeia de 32,9%. O SNP rs7498665 está associado a obesidade (63).

#### 4.4.20 SIM1

Gene no cromossoma 6 tendo sido obtidas 3 variantes snv todas heterózigóticas. Das amostras analisadas 9 apresentam alterações neste gene. As alterações missense obtidas são apresentadas na tabela 4.4.20.1.

**Tabela 4.4.20.1**– Alterações missense obtidas no gene Sim1 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
rs3734354	1054C>A Pro352Thr	17,81%	14,71%	6
rs3734355	1112C>T Ala371Val	17,85%	14,71%	5

Todas estas alterações são benignas segundo a classificação polyphen, no que toca á consequência clinica associada ao fenótipo, esta apresenta associação a obesidade e tendência para IMC elevado (64–66).

#### 4.4.21 SORCS1

Gene no cromossoma 10 tendo sido obtidas 6 variantes snv todas heterózigóticas. Das amostras analisadas 17 apresentam alterações neste gene. Foi obtida uma variante missense proveniente de uma amostra, SORCS1 2491A>C Thr831Pro, esta variante não apresenta informação, à excepção de ser uma alteração possivelmente patogénica segundo a previsão polyphen.

#### 4.4.22 UCP1

Gene no cromossoma 4 tendo sido obtidas 4 variantes snv todas heterózigóticas. Das amostras analisadas 6 apresentam alterações neste gene. Duas alterações missense foram obtidas, estando estas representadas na tabela 4.4.22.1.

**Tabela 4.4.22.1**– Alterações missense obtidas no gene UCP1 com informação de alteração de aminoácido e prevalência global e na europa segundo a base de dados *1000 Genome*, assim como o número de amostras em que esta foi variante foi encontrada.

refSNP	Missense	Aminoácido	Prevalência Global segundo <i>1000 Genome Project</i>	Prevalência Europeia segundo <i>1000 Genome Project</i>	Nº Amostras
rs2270565	685A>T	Met229Leu	7,21%	7,85%	2
rs45539933	190G>A	Ala64Thr	8,59%	7,65%	2

Ambas as variantes são benignas segundo a previsão polyphen. Não foi encontrada informação na base de dados *ClinVar* relativamente à consequência clínica.

#### 4.4.23 UCP2

Gene no cromossoma 11 tendo sido obtidas 2 variantes snv sendo uma heterózigótica. Das amostras analisadas 12 apresentam alterações neste gene. Foi obtida uma variante missense, UCP2 (rs660339) 164C>T Ala55Va, é uma variante benigna segundo a previsão polyphen, com uma prevalência global de 41,61% e europeia de 40,46%. Polimorfismo do gene UCP2 (rs660339) está associado a susceptibilidade de desenvolver obesidade na população sul-europeia (67).

#### 4.4.24 UCP3

Gene no cromossoma 11 tendo sido obtidas 5 variantes snv 4 destas heterózigóticas. Das amostras analisadas 20 apresentam alterações neste gene. Das variantes obtidas uma missense foi obtida, presente numa amostra, UCP3 (rs143786748) 211A>C Thr71Pro com uma prevalência global e europeia de 0%. Esta variante missense é benigna segundo a previsão polyphen.

Neste gene, foi ainda obtida uma variante *splice donor* (824+1G>A) no intrão 6-7 presente numa amostra. A prevalência global desta variante é de 3.29%, com uma prevalência europeia de 0.3%, sendo que esta variante não apresenta informação *ClinVar*.

## 4.5 – Distribuição de Genes (Impacto dos genes nas amostras analisadas)

Dos genes analisados foram as variantes no gene LRP2 que teve um maior impacto, representando 31,7% do total de variantes obtidas, contrastando com os genes BDNF, IGF2, LEP, MC4R e NPY1R que preenchem respectivamente 0,5% dos genes analisados. O gráfico 4.5.1 ilustra o impacto de variações obtidas em cada gene nas amostras analisadas.

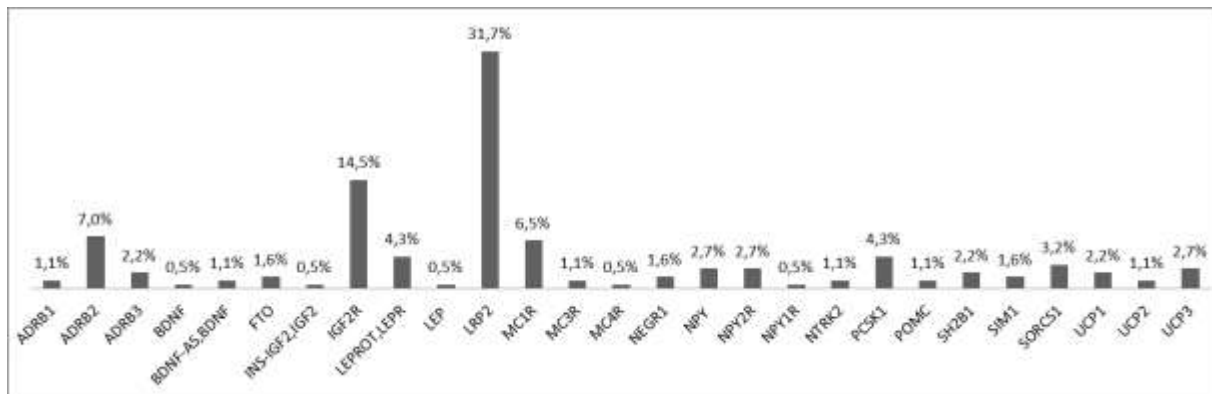
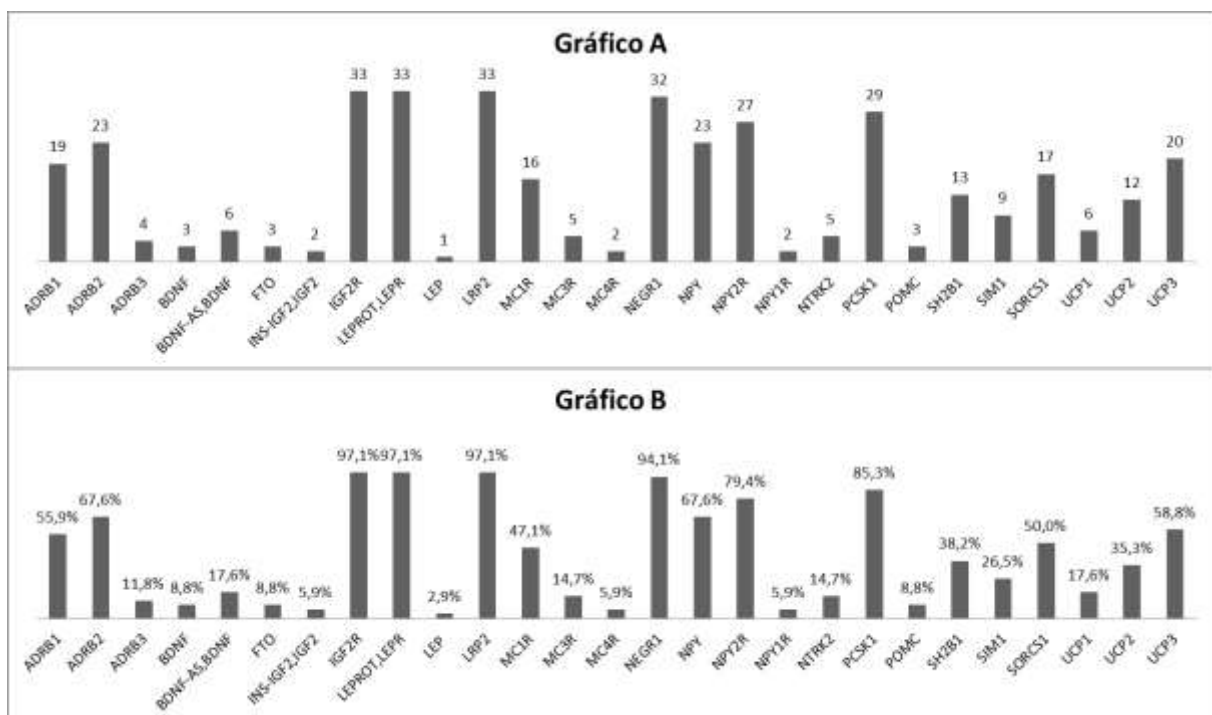


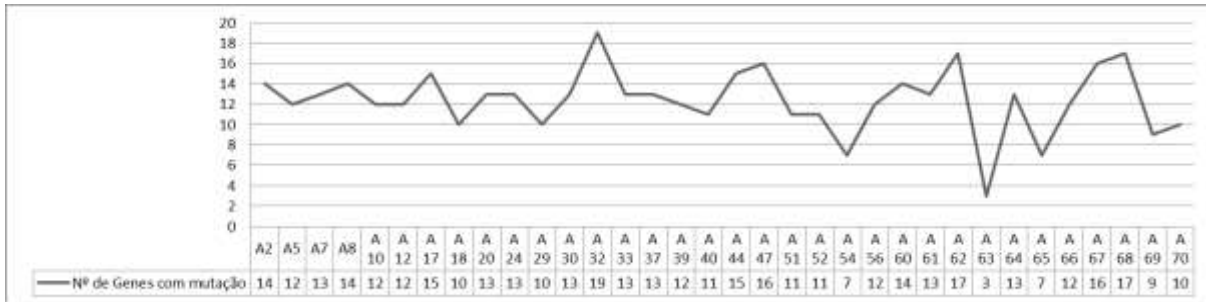
Gráfico 4.5.1– Percentagem na distribuição de variações obtidas em cada gene.

No que toca ao impacto das variantes nos genes em cada amostra para um total de 34 amostras os genes IGF2R, LEPR e LRP2 apresentam variantes em 33 amostras, o que significa que cada gene tem uma variação presente em 97,1% das amostras analisadas. Já o gene LEP apenas apresenta variantes numa única amostra. Os dois gráficos abaixo apresentados ilustram esta mesma situação para todos os genes, onde o Gráfico A representa o número de amostras em que foram obtidas variantes de um determinado gene, onde o Gráfico B ilustra a percentagem desse mesmo valor para um total de 34 amostras.



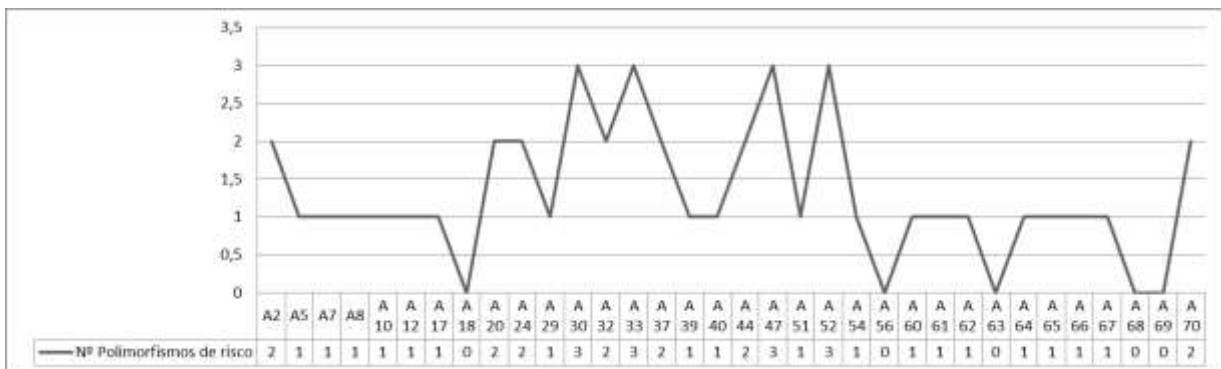
**Gráfico 4.5.2**– Gráfico A: Número de amostras em que foram obtidas variantes de cada gene analisado. Gráfico B: Percentagem do número de amostras em que foram obtidas variantes de cada gene analisado, para um total de 34 amostras.

Em média cada amostra apresenta 12 genes com variantes alteradas, considerando um desvio padrão de 3,1, sendo que será de salientar que não foram obtidos resultados em duas amostras (A58 e A59). O gráfico 4.5.3 apresentado ilustra o número de genes com variantes alteradas em cada amostra.



**Gráfico 4.5.3**– Número de genes com variantes alteradas em cada amostra.

No que toca à previsão polyphen, o gráfico 4.5.4 representa o número de variantes com uma classificação polyphen de possivelmente patogénica, distribuídas pelas amostras afectadas, representando assim polimorfismos em genes que possam explicar uma maior susceptibilidade para desenvolver obesidade:



**Gráfico 4.5.4**– Número de polimorfismos em genes, por amostra, com risco elevado associado a previsões polyphen de possivelmente benigno e possivelmente danoso.

A tabela 4.5.1, representa os genes que apresentavam um polimorfismo possivelmente danoso segundo a previsão polyphen representando a amostra em que esse polimorfismo foi identificado, assim como o SNP de referência.

**Tabela 4.5.1**– Representação de amostras onde foram identificados polimorfismos possivelmente danosos segundo a classificação polyphen, onde é representado o gene onde desse polimorfismos assim como o SNP.

Amostra	Gene	refSNP
A2	LRP2	rs4667591
	POMC	rs28932472
A5	LRP2	rs4667591
A7	LRP2	rs4667591
A8	LRP2	rs4667591
A10	LRP2	rs4667591
A12	LRP2	rs4667591
A17	LRP2	rs4667591
A20	LRP2	rs4667591
	LRP2	rs34291900
A24	IGF2R	rs8191754
	LRP2	rs4667591
A29	LRP2	rs4667591
A30	IGF2R	rs8191754
	LRP2	rs4667591
	LRP2	12385A>G Asn4129Asp
A32	ADRB3	rs374271379
	IGF2R	rs8191754
A33	ADRB2	rs3729943
	LRP2	rs4667591
	POMC	rs28932472
A37	LRP2	rs4667591
	NPY	rs16139
A39	LRP2	rs4667591
A40	LRP2	rs4667591
A44	LRP2	rs4667591
	IGF2R	rs8191754
A47	IGF2R	rs8191842
	IGF2R	rs150809922
	LRP2	rs144081819
A51	IGF2R	rs8191754
A52	IGF2R	rs8191754
	LRP2	rs4667591
	LRP2	rs41268685
A54	LRP2	rs4667591
A60	LRP2	rs4667591
A61	LRP2	rs4667591
A62	LRP2	rs4667591
A64	IGF2R	rs8191754
A65	LRP2	rs138269726
A66	LRP2	rs4667591
A67	LRP2	rs4667591
A70	LRP2	rs4667591
	SORCS1	2491A>C Thr831Pro

## 5- Discussão de resultados

Das 36 amostras analisadas obtiveram-se resultados em 34 visto ter ocorrido um erro de leitura e análise no NGS nas amostras A58 e A59. Dos resultados obtidos foram identificadas 183 variações de nucleótidos, duas inserções e uma deleção, destas alterações 141 são heterozigóticas. Das mutações obtidas duas mutações missense não estão descritas, sendo elas a LRP2 12385A>G e SORCS1 2491A>C.

Explorando a base de dados *ClinVar*, e quando necessário, por falta de informação com pesquisa de publicações de artigos científicos, é possível obter informação relativamente à consequência clínica associado a uma variante de um gene. Sendo o objectivo procurar alterações associadas à obesidade, a tabela abaixo apresentada indica a significância clínica das variantes obtidas que apresentavam essa informação e o número total de amostras em que estas variantes estavam presentes, assim como o número de amostras em que foram identificadas variantes possivelmente patogénicas.

**Tabela 5.1**– Número total de amostras onde foram identificadas variantes cuja consequência clínica está associada à patologia indicada em todas as amostras, e número de amostras que mostravam variantes possivelmente patogénica.

Significância Clínica	Nº total de Amostras	Nº de amostras com variantes possivelmente patogénicas.
Influência no IMC	8	0
Susceptibilidade a Obesidade	21	2
Obesidade	6	0
Anorexia nervosa e Bulimia nervosa	5	0
Deficiência ou Disfunção de Leptina	25	0
Obesidade Monogénica não-sintomática	28	0
Diabetes Monogénica	12	0
Polimorfismo Receptor da Leptina	29	0
Hipertensão Arterial	1	1
Obesidade infantil e Resistência à insulina	5	0
Predisposição para desenvolver diabetes tipo 2	1	1

Em média 12 amostras apresentam alterações com significância clínica conhecida relevante para a obesidade, o que representa cerca de 35.3% do total de amostras analisadas. Polimorfismo no receptor da leptina, Obesidade monogênica não-sintomática e susceptibilidade a obesidade são três consequências clínicas que têm um impacto nas amostras analisadas entre os 60% e os 85%.

Ter-se-á de se considerar no entanto que diversos genes poderão ter variantes associadas a estas consequências clínicas e que nem todos os polimorfismos representam alterações de risco, muitas delas sendo benignas. A tabela 5.2 tenta ilustrar essa mesma situação onde é possível verificar que variantes em diferentes genes contribuem para a mesma condição clínica, sendo que a grande maioria representam uma alteração benigna segundo a previsão polyphen.

**Tabela 5.2**– Genes com variantes cuja consequência clínica está associada à obesidade e número de amostras com essas variantes nesses genes.

Significância Clínica	Genes	SNP	Previsão polyphen	Nº de Amostras
Influência no IMC	PCSK1	rs6232 (661A>G)	Benigno	2
	SIM1	rs3734354 (1054C>A)	Benigno	6
		rs3734355 (1112C>T)		5
Susceptibilidade a Obesidade	ADBR2	rs1042714 (79G>C)	Benigno	20
		rs1042713 (46G>A)		13
	IGF2R	rs629849 (4855A>G)	Benigno	28
	POMC	rs28932472 (706C>G)	Possivelmente patogénica	2
	UCP2	rs660339 (164C>T)	Benigno	12
Obesidade	ADBR3	rs4994 (190T>C)	Benigno	4
	MC4R	rs2229616 (307G>A)	Benigna	2
	SH2B1	rs7498665 (1450A>G)	Benigno	9
Anorexia nervosa e Bulimia nervosa	BDNF	rs6265 (434C>T)	Benigno	5

(continua na página seguinte)

(Continuação de tabela 5.2)

Significância Clínica	Genes	SNP	Previsão polyphen	Nº de Amostras
Deficiência ou Disfunção de Leptina	LEP	rs17151919 (280G>A)	Benigno	1
	LEPR	rs1137101 (668A>G)	Benigno	24
Obesidade Monogénica não-sintomática	LEP	rs17151919 (280G>A)	Benigno	1
	LEPR	rs1137101 (668A>G)	Benigno	24
	PCSK1	rs6235 (2069G>C)	Benigno	18
		rs6234 (1993C>G)		
POMC	rs10654394 (289_297dupAGCAGCGGC Gly99_Ala100insSerSerGly)	Sem informação	1	
Diabetes Monogénica	LEP	rs17151919 (280G>A)	Benigno	1
	LEPR	rs1805094 (1968G>C)	Benigno	12
	MC4R	307G>A (rs2229616)	Benigno	2
Polimorfismo Receptor da Leptina	LEPR	rs1137101 (668A>G)	Benigno	29
		rs1805094 (1968G>C)		
Hipertensão Arterial	ADRB2	rs3729943 (659C>G)	Possivelmente patogénica	1
Obesidade infantil e Resistência à insulina	MC3R	rs3827103 (130G>A)	Benigno	5
Predisposição para desenvolver diabetes tipo 2	NPY	rs16139 (20T>C)	Possivelmente patogénica	1

À exceção do gene ADRB2 todos os restantes genes apresentados na tabela anterior têm uma incidência inferior a 5% do total de variantes obtidas (consultar gráfico 4.4), o que significa que variantes destes genes, que no seu total representam cerca de 20% do total de variantes obtidas apresentam mutações em cerca de metade das amostras analisadas. Sendo que os genes ADRB2 e LEPR, para este caso, em média têm presença em cerca de 60% do total de amostras analisadas.

A interação de vários tipos de variantes de diversos genes associados a uma patologia poderá ser indicativa de uma maior probabilidade de manifestação de uma doença (68).

Existem no entanto diversas variáveis que contribuem para a manifestação de uma patologia, desde a interação entre diferentes genes, como já foi referido, até a factores ambientais (68). Dependendo do local onde se dá a mutação, esta poderá ou não representar uma alteração patológica para o ser humano, desta forma, é sempre importante distinguir uma mutação que levará a uma alteração de fenótipo com consequências patológicas de uma variante benigna (49).

A distinção entre ambas pode ser feita analisando a frequência com que uma mutação aparece na população, aceitando-se que uma mutação com uma frequência acima de 1% seria contabilizada como um polimorfismo que se desenvolveu naturalmente com consequência neutra ou benéfica (56). Em contraste, mutações com uma prevalência abaixo de 1% seriam mutações raras, que poderão representar fenótipos patológicos (56).

Explorando os resultados obtidos com a base de dados *1000 Genome Project*, dos genes analisados foram obtidas 57 variantes snv, uma inserção e uma deleção, todas heterózigóticas com uma prevalência europeia  $\leq 1\%$ . A tabela 5.4 reúne mutações obtidas distribuídas por número de amostras.

**Tabela 5.3**– Discrição de mutações com uma frequência Europeia ≤1% organizada por gene, com referência a frequência Europeia, fenótipo e previsão polyphen.

Nº de Amostras	Gene	Mutação	Prevalência Europeia segundo 1000 Genome Project	Fenótipo	Previsão Polyphen
1	ADRB2	659C>G	0%	Hipertensão	Possivelmente patogénica
1	ADRB3	1033A>G	0,0%	Sem Informação	Possivelmente patogénica
		794C>T	0,0%	Sem Informação	Benigno
1	FTO	767G>A	0,4%	Sem Informação	Benigno
5	IGF2R	4094A>G	0,0%	Sem Informação	Benigno
		1063G>A	0,1%	Sem Informação	Benigno
		6857G>A	0,0%	Sem Informação	Benigno
		4511C>T	0,20%	Sem Informação	Benigno
		745C>T	0,0%	Sem Informação	Possivelmente patogénica
		3320C>T	0,1%	Sem Informação	Possivelmente patogénica
1	LEP	280G>A	0,0%	Deficiência ou disfunção de leptina, Obesidade monogénica não-sintomática e Diabetes monogénica	Benigno
13	LRP2	12385A>G	Sem Informação	Sem Informação	Possivelmente patogénica
		6160G>A	0,20%	Sem relevância	Possivelmente patogénica
		10804G>A	0,10%	Sem relevância	Possivelmente patogénica
		3110G>A	0,10%	Sem relevância	Benigno
		9592G>A	0,0%	Sem relevância	Benigno
		11092G>A	0,60%	Sem relevância	Benigno
		9413G>A	0,10%	Sem relevância	Benigno
		13156G>A	0%	Sem relevância	Benigno
		3452C>T	0,20%	Sem relevância	Benigno
2	MC4R	307G>A	0,69%	Obesidade e Diabetes monogénica	Benigno
2	NPY1R	1121A>C	0,69%	Sem Informação	Benigno
2	POMC	706C>G	0,30%	Susceptibilidade a obesidade	Possivelmente patogénica
1	SORCS1	2491A>C	Sem Informação	Sem Informação	Possivelmente patogénica
1	UCP3	211A>C	0,0%	Sem Informação	Benigno

No que toca à tabela 5.3, 3 genes apresentaram variantes cuja significância clínica está associada à obesidade, sendo estes os genes LEP 280G>A, MC4R 307G>A e POMC 706C>G, o que indica que duas amostras (A47 e A48) para o gene MC4R e uma amostra (A10) para o gene LEP têm uma mutação associada a obesidade, apesar de que esta poderá representar uma mutação benigna segundo a previsão polyphen. No entanto, duas amostras (A2 e A33) para o gene POMC, estão em risco de obesidade, tendo uma mutação para a condição clínica indicada na tabela anterior. A mutação no gene POMC 706C>G é o único que poderá ser possivelmente patogénica segundo a previsão polyphen. Das previsões polyphen obtidas 41.4% são previsões de mutações possivelmente patogénicas apesar de que apenas uma destas mutações apresenta informação *clinvar* associado à obesidade (gene POMC), as restantes não apresentam informação ou esta não está associada a obesidade.

## 6- Conclusão

Relativamente à obesidade e aos resultados obtidos foi possível identificar duas mutações ainda não descritas no gene LRP2 (12385A>G) para uma amostra e no gene SORCS1 (2491A>C) também para uma amostra. Foi possível identificar também uma mutação no gene POMC que representa um risco para desenvolver obesidade em duas das amostras analisadas. Para terminar, foram identificados polimorfismos que apesar de já se encontrarem identificados não foi possível identificar um fenótipo específico.

Estes resultados permitem não só constatar que a obesidade tem de facto genes cuja mutação cria uma predisposição para desenvolver obesidade (45) como também consegue explorar o potencial dos equipamentos NGS na sequenciação do genoma humano, o que nos leva para o segundo objectivo deste trabalho.

A capacidade de sequenciar todo o genoma de 34 amostras em simultâneo e identificar mutações num painel de genes definido pelos objectivos de um estudo é um contributo importante para a evolução e crescimento científico e tecnológico que permite não só cimentar descobertas feitas por outros trabalhos como também descobrir novas alterações, onde a utilização de um software em constante actualização permite analisar os genes existente, havendo a possibilidade de fazer uma nova análise num espaço de 6-12 meses, permitindo uma constante reavaliação dos resultados (18), mostrando também a capacidade de permitir decifrar mutações genéticas menos comuns e raras, como acontece em certos casos de obesidade monogénica (32,69).

Para além dos contributos tecnológicos e científicos dos equipamentos NGS, estes também permitem dar um apoio e um auxílio extremamente importante na confirmação de diagnósticos clínicos. Trabalhos como o de *Kleinendorst et al.*, mostram que equipamentos NGS têm a capacidade para dar um enorme contributo na confirmação de diagnósticos, como no caso da obesidade, permitindo não só distinguir casos de obesidade que implicam uma abordagem terapêutica mais complexa, como os de obesidade monogénica, de casos mais comuns. Isto permite não só confirmar as suspeitas de um diagnóstico de forma mais célere, o que permite actuar de uma forma preventiva, como também pode abrir a porta a terapias personalizadas (18,31).

Em suma, os equipamentos NGS representam o futuro da sequenciação genética, onde a evolução tecnológica contribui para o crescimento da ciência, auxiliando não só no diagnóstico mas também na caracterização de uma população, abrindo a possibilidade para novas abordagens terapêuticas e principalmente no acompanhamento precoce na evolução de patologias como a obesidade.

## 7- Bibliografia

1. Ghanemi A, St-Amand J. Redefining obesity toward classifying as a disease. *Eur J Intern Med*. 2018;55(April):20–2.
2. Chesi A, Grant SFA. The Genetics of Pediatric Obesity. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2015;26(12):711–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.08.008>
3. Khodakov D, Wang C, Zhang DY. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;105:3–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.005>
4. Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare Genetic Forms of Obesity: Clinical Approach and Current Treatments in 2016. *Obes Facts* [Internet]. 2016;9(3):158–73. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/445061>
5. Gadde KM, Martin CK, Berthoud HR, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(1):69–84.
6. Santos J, Kislaya I, Gaio V. Influência dos fatores socioeconómicos no excesso de peso e obesidade na população portuguesa em 2014. *Bol Epidemiológico do Insituto Nac Saúde Pública Ricardo Jorge* [Internet]. 2016;(17):32–7. Available from: [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4110/1/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_N17\\_2016\\_artigo8.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4110/1/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N17_2016_artigo8.pdf)
7. GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jul 6;377(1):13–27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1614362>
8. Fall T. Recent Advances in Human Genetics and Epigenetics of. *Gastroenterology* [Internet]. 2017;152(7):1695–706. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.054>
9. Berthoud HR, Klein S. Advances in Obesity: Causes, Consequences, and Therapy. *Gastroenterology* [Internet]. 2017;152(7):1635–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.03.045>
10. Campbell L V. Genetics of obesity. *Aust Fam Physician* [Internet]. 2017;46(7):456–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2011.08.005>
11. Waalen J. The genetics of human obesity. *Transl Res* [Internet]. 2014 Oct;164(4):293–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.010>
12. Loos RJF, Janssens ACJW. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. *Cell*

- Metab [Internet]. 2017;25(3):535–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.013>
13. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *Comptes Rendus - Biol* [Internet]. 2017;340(2):87–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2016.11.007>
  14. Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, Kissoon N, et al. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism*. 2007;56(6):757–65.
  15. Ramos-lopez O, Riezu-boj JI, Milagro FI, Goni L, Cuervo M. Nutrition , Metabolism & Cardiovascular Diseases Differential lipid metabolism outcomes associated with ADRB2 gene polymorphisms in response to two dietary interventions in overweight / obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2018;28(2):165–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.11.006>
  16. Ryuk JA, Zhang X, Ko B-S, Daily JW, Park S. Association of  $\beta$ 3-adrenergic receptor rs4994 polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2017 Jul;129:86–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.034>
  17. Van Der Klaauw AA, Farooqi IS. The hunger genes: Pathways to obesity. *Cell* [Internet]. 2015;161(1):119–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.008>
  18. da Fonseca ACP, Mastronardi C, Johar A, Arcos-Burgos M, Paz-Filho G. Genetics of non-syndromic childhood obesity and the use of high-throughput DNA sequencing technologies. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2017;31(10):1549–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.04.026>
  19. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet*. 2010;26(6):266–74.
  20. Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, Huang Z, Bernal A, et al. Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns : results from a Newborn Epigenetics Study ( NEST ) cohort. 2013;1–10.
  21. Lv K, Guo Y, Zhang Y, Wang K, Jia Y, Sun S. Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA-insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):101–5.
  22. Fourati M, Mnif M, Kharrat N, Charfi N, Kammoun M, Fendri N, et al. Association between Leptin gene polymorphisms and plasma leptin level in three consanguineous families with

- obesity. *Gene*. 2013;527(1):75–81.
23. Novoselova T V, Chan LF, Clark AJL. Pathophysiology of melanocortin receptors and their accessory proteins [Internet]. Vol. 32, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Ltd; 2018. p. 93–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.02.002>
  24. Demidowich AP, Jun JY, Yanovski JA. Polymorphisms and mutations in the melanocortin-3 receptor and their relation to human obesity [Internet]. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier; 2017. p. 2468–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.018>
  25. Ju SH, Cho GB, Sohn JW. Understanding melanocortin-4 receptor control of neuronal circuits: Toward novel therapeutics for obesity syndrome [Internet]. Vol. 129, *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 10–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.004>
  26. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* [Internet]. 2011;69(1):41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.02.018>
  27. Das UN. Obesity: Genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* [Internet]. 2010;26(5):459–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.09.020>
  28. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* [Internet]. 2011 May;69(1):41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.02.018>
  29. Kim H, Chun Y, Che L, Kim J, Lee S, Lee S. The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Jan;482(4):1367–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.043>
  30. Butler AA, Cone RD. Knockout models resulting in the development of obesity [Internet]. Vol. 17, *Trends in Genetics*. 2001. p. S50–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952501024817>
  31. Maltese PE, Iarossi G, Ziccardi L, Colombo L, Buzzonetti L, Crinò A, et al. A Next Generation Sequencing custom gene panel as first line diagnostic tool for atypical cases of syndromic obesity: Application in a case of Alström syndrome. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2018;61(2):79–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.016>
  32. Böttcher Y, Körner A, Kovacs P, Kiess W. Obesity genes: Implication in childhood obesity. Vol. 22, *Paediatrics and Child Health*. 2012. p. 31–6.

33. Kebede MA, Attie AD. Insights into obesity and diabetes at the intersection of mouse and human genetics. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014;25(10):493–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.006>
34. Miranda RCK, Vetter SB, Genro JP, Campagnolo PDB, Mattevi VS, Vitolo MR, et al. SLC6A14 and 5-HTR2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem* [Internet]. 2015;48(18):1277–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.003>
35. Elbers CC, Onland-Moret NC, Franke L, Niehoff AG, van der Schouw YT, Wijmenga C. A strategy to search for common obesity and type 2 diabetes genes. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Jan;18(1):19–26. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276006002384>
36. María CR, Carrillo-Ávila JA, Jacqueline SRV, Emilio GJ, Sofia V, Javier M, et al. Genetic association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and obesity-related phenotypes. *Gene* [Internet]. 2018;640(October 2017):51–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.029>
37. Jorge DR, Ue R. Inquérito Nacional de Saúde Mais de metade da população com 18 ou mais anos tinha excesso de peso. 2015;1–17.
38. Carmo I, Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. National Prevalence of Obesity Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003 – 2005. 2007;2005:11–9.
39. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* [Internet]. 2016;107(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
40. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018;24(4):335–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>
41. Voelkerding K V, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing : From Basic Research to Diagnostics CONTENT : SUMMARY : 2009;658:641–58.
42. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014;1842(10):1932–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
43. Reuter JA, Spacek D V., Snyder MP. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell* [Internet]. 2015;58(4):586–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

44. Apal Sammy YD, Mohamed Z. Obesity and genomics: Role of technology in unraveling the complex genetic architecture of obesity. *Hum Genet.* 2015;134(4):361–74.
45. Nordang GBN, Busk ØL, Tveten K, Hanevik HI, Fell AKM, Hjelmsæth J, et al. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes LEP, LEPR, MC4R, PCSK1 and POMC in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2017 Oct 27];121(1):51–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096719216308319>
46. Kleinendorst L, Massink MPG, Cooman MI, Savas M, van der Baan-Slootweg OH, Roelants RJ, et al. Genetic obesity: next-generation sequencing results of 1230 patients with obesity. *J Med Genet* [Internet]. 2018;jmedgenet-2018-105315. Available from: <http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2018-105315>
47. Strategy CD, Assay C. TruSight One Sequencing Panel. 2017;(August):3–6.
48. Hollegaard MV, Grauholm J, Nielsen R, Grove J, Mandrup S, Hougaard DM. Archived neonatal dried blood spot samples can be used for accurate whole genome and exome-targeted next-generation sequencing. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013 Sep;110(1–2):65–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.004>
49. Vieira A. Engenharia Genética: Princípios e Aplicação. 2<sup>a</sup>. Edição. Lisboa: LIDEL; 2011.
50. Badulli C, Sbarsi I, Di Giorgio D, Mantovani M, Maserati R, Barbarini G, et al. A new approach to safely type for HLA the HIV infected people eligible to abacavir therapy: Saliva or buccal swab as reliable DNA sources. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011;412(21–22):1995–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.003>
51. Montgomery MC, Petraroia R, Weimer ET. Buccal swab genomic DNA fragmentation predicts likelihood of successful HLA genotyping by next-generation sequencing. *Hum Immunol* [Internet]. 2017;78(10):634–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.08.003>
52. Paleček E, Fojta M. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta.* 2007;74(3):276–90.
53. Hussing C, Kampmann ML, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2015 Dec;5:e276–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176815301542>
54. Nitsche R, Connelly M, Bayne C, Glück S, Gassmann M. Performance of the Genomic DNA Assay for the Agilent 4200 TapeStation System. *Cancer Genet* [Internet]. 2016 May;209(5):249. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210776216301624>

55. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* [Internet]. 2013 Jan;76(1):7.20.1-7.20.41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg0720s76>
56. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2015 Dec 15;8(1):37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
57. Horikoshi M, Yaghoobkar H, Mook-kanamori DO, Taal HR, Hennig BJ, Bradfield JP, et al. Europe PMC Funders Group New loci associated with birth weight identify genetic links between intrauterine growth and adult height and metabolism. 2013;45(1):76–82.
58. Yan Z-T, Li N-F, Yang J, Zhou L, Liu H, Luo Q. Genetic variations of beta 2-adrenergic receptor gene are associated with essential hypertension in Xinjiang Kazakans. *J Geriatr Cardiol*. 2010;7(1):52–7.
59. Yang S-A. Association between exonic polymorphism (rs629849, Gly1619Arg) of *IGF2R* gene and obesity in Korean population. *J Exerc Rehabil* [Internet]. 2015 Oct 28;11(5):282–6. Available from: <http://e-er.org/journal/view.php?number=2013600221>
60. Paththinige CS, Sirisena ND, Dissanayake VHW. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review. 2017;1–22.
61. Yoshiuchi I. Evidence for natural selection at the melanocortin-3 receptor gene in European and African populations. *Acta Diabetol*. 2016;53(4):583–7.
62. Patel R, Dwivedi M, Mansuri MS, Ansarullah, Laddha NC, Thakker A, et al. Association of Neuropeptide-Y (NPY) and Interleukin-1beta (IL1B), genotype-phenotype correlation and plasma lipids with Type-II diabetes. *PLoS One*. 2016;11(10):1–16.
63. Volckmar A-L, Bolze F, Jarick I, Knoll N, Scherag A, Reinehr T, et al. Mutation screen in the GWAS derived obesity gene SH2B1 including functional analyses of detected variants. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2012 Dec 27;5(1):65. Available from: <http://bmcmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-5-65>
64. Ghossaini M, Stutzmann F, Couturier C, Vatin V, Durand E, Lecoecur C, et al. Analysis of the SIM1 contribution to polygenic obesity in the french population. *Obesity* [Internet]. 2010;18(8):1670–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.468>
65. Windholz J, Kovacs P, Schlicke M, Franke C, Mahajan A, Morris AP, et al. Copy number variations in “classical” obesity candidate genes are not frequently associated with severe early-onset obesity in children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;30(5):507–15.

66. Swarbrick MM, Evans DS, Valle MI, Favre H, Wu SH, Njajou OT, et al. Replication and extension of association between common genetic variants in SIM1 and human adiposity. *Obesity* [Internet]. 2011;19(12):2394–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.79/nature06264>
67. Alonso P, Martinez-hervas S, Mansego ML, Marco G De, Martinez F, Morcillo S, et al. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with body fat distribution and risk of abdominal obesity in Spanish population. 2012;42:171–8.
68. Brookes AJ. The essence of SNPs. Vol. 234, *Gene*. 1999. p. 177–86.
69. Cui H, Dhroso A, Johnson N, Korkin D. The variation game: Cracking complex genetic disorders with NGS and omics data. *Methods* [Internet]. 2015;79:18–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.04.018>



# Consentimento Informado

Vem-se, por este meio, propor a sua participação num projeto intitulado “*Estudo da obesidade monogénica com recurso a tecnologia de ponta – Next Generation Sequencing*” centralizado no Grupo de Investigação de Genética e Metabolismo da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) do Instituto Politécnico de Lisboa (IPL). Este projeto, financiado pelo IPL, pretende avaliar a possível influência de alguns genes no desenvolvimento de obesidade.

A sua colaboração implicará a colheita de uma pequena amostra de sangue capilar, de onde será extraído o ácido desoxirribonucleico (ADN) a ser analisado num equipamento com tecnologia de ponta específico para o efeito, a *Next Generation Sequencing* (NGS).

A sua participação é voluntária e todos os seus dados e resultados do estudo serão confidenciais (apenas com conhecimento do próprio e da equipa de investigação).

## **ALGUMAS INFORMACÕES:**

### **O que é a obesidade monogénica?**

A obesidade está descrita pela Organização Mundial de Saúde como uma acumulação excessiva de gordura. Além de fatores associados ao estilo de vida, existem fatores genéticos envolvidos na génese da obesidade. Nos casos de obesidade monogénica, existem alterações num gene específico que vão conferir uma predisposição para um aumento da gordura corporal.

### **O que vamos procurar e porque é necessária uma amostra de sangue?**

O objetivo do estudo consiste na avaliação de genes que podem conferir risco de obesidade. Para tal, é necessário uma pequena amostra de sangue que, sendo de fácil obtenção (através de picada de um dedo), é um excelente fluido biológico para colheita de ADN. De forma a avaliar a existência ou a ausência de genes alterados (no ADN), vai ser utilizado um equipamento laboratorial cujo nome é *Next Generation Sequencing* (NGS). Este equipamento permite analisar todo o genoma humano de uma forma mais rápida e mais eficaz, comparativamente a métodos mais tradicionais.

### **O que podemos encontrar?**

Neste estudo, todo o genoma presente na amostra de ADN será analisado de forma a encontrar alterações associadas ao risco de obesidade. No entanto, considerando as capacidades do equipamento a ser utilizado, existe a possibilidade de serem encontrados genes alterados que poderão estar associados a outro tipo de patologias que

não a obesidade. Estas alterações podem ser relevantes para a sua saúde podendo, em certos casos, serem passíveis de uma atuação preventiva.

Eu \_\_\_\_\_

nascido(a) a \_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ com Cartão de Cidadão/BI nº \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado(a) acerca do projeto intitulado “*Estudo da obesidade monogénica com recurso a tecnologia de ponta – “Next Generation Sequencing”*” a ser realizado pelo Grupo de Investigação em Genética e Metabolismo da ESTeSL-IPL e que me foi explicado todo o procedimento, assim como as análises que serão efetuadas ao meu ADN.

Igualmente, declaro que:

- li a informação sobre o estudo e compreendo que é necessária a doação de uma amostra de sangue que será analisada, no laboratório de investigação da ESTeSL-IPL, para estudo genético com o objetivo de identificar genes que poderão contribuir para o desenvolvimento de obesidade;
- reconheço que a doação de sangue é totalmente voluntária e que sou livre de participar neste projeto, sabendo que em qualquer altura posso interromper a minha participação sem a obrigatoriedade de a justificar e que tenho o direito de negar que a minha amostra seja analisada, mesmo depois da doação;
- percebo que a minha aceitação/negação em participar neste estudo não afeta o meu plano terapêutico atual ou futuro sabendo, ainda, que não receberei quaisquer compensações materiais pela participação;
- compreendo que apesar do método de análise utilizado no estudo permitir analisar todo o genoma, o alvo deste estudo não contempla a análise de toda a informação genética, tendo apenas como foco os genes associados à obesidade monogénica (LEP, LEPR, POMC, MC4R) e, eventualmente, outros genes associados à obesidade (PCSK1, NPY, SIM1, BDNF, NTRK2, FTO, SORCS1, IGF2, ADRB1, ADRB2, ADRB3, UCP1, UCP2, UCP3, MC1R, MC2R, MC3R, SLC6A14, NEGR1, TUB, SH2B1, MRAP2, KSR2, LRP2, TBX15, NEGR1, SDCCAG8, FANCL, TMEM18, LRP1B, TFAP2B, NCR3, AIF1, VEGFA, PRL, MSRA, MTCH2, BDNF, ITPR2–SSPN, HOXC13, PRKD1, NRXN3, SH2B1, MAF, NPC1);
- tenho conhecimento de que, com este método, é possível encontrar outras alterações genéticas, para além daquelas incluídas no objetivo deste estudo e que essas alterações podem estar relacionadas com um maior risco para o desenvolvimento de outras patologias;
- aceito participar no estudo, consentindo doar uma amostra de sangue para estudo genético relacionado à obesidade e doenças associadas.

***No final do estudo, após ser terminada a análise genética, pretendo que:***

- a) nada me seja transmitido, independentemente dos resultados;***
- b) me seja transmitido a existência/ausência de genes que conferem risco de obesidade;***
- c) me seja transmitido a existência/ausência de genes que conferem risco de obesidade e de outros que poderão representar um fator de risco patológico.***

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2018      Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

O médico: José Silva Nunes      Assinatura: \_\_\_\_\_

## Protocolo de Extração:

### Protocolo extração de DNA - Tradução

- Colocar tampão de eluição(Elution Buffer) a 80 °C. (será utilizado no ponto 18). Ter em atenção que serão utilizados 50 µl por amostra.

1. Transferir 200-1000 µl de amostra para um Eppendorf esterilizado de 1.5-2 ml;  
Adicionar o mesmo volume de solução tampão (Buffer) RBC Lyses (p.ex.: se adicionados 200 µl de amostra, adicionar de seguida 200 µl de Buffer RBC Lyses);
2. Misturar solução;
3. Centrifugar durante 4 min. A 8.6K x g0;
4. Descartar sobrenadante;
5. Adicionar 375 µl de BL Lysis Buffer;  
Ao isolar apartir de plasma, linfócitos ou fluidos corporais, misturar invertendo o tubo;
6. Adicionar 6 µl de proteinase K;  
Colocar no vortex;
7. Incubar a 55°C durante 10 min;  
Caso não haja suspensão total do pellet, estender o período de incubação, colocando no vortex a cada 1-2 min;
8. Adicionar 400 µl de BB Buffer e misturar;
9. Colocar no vortex por 15-20 segundos;
10. Transferir Lysate?? Para uma minicoluna de purificação inserida num tubo colector;  
Centrifugar durante 1 min a 11-15k x g;
11. Transferir a minicoluna de purificação para um novo tubo colector;  
Nota: antigo tubo colector é descartado;
12. Adicionar 600 µl de BW1 Buffer e centrifugar durante 30 segundos a 11-15k x g.
13. Descartar solução filtrada e reutilizar o tubo colector;
14. Adicionar 400 µl de BW2 Buffer e centrifugar durante 30 segundos a 11-15k x g;
15. Descartar solução filtrada e reutilizar tubo colector;

16. Centrifugar durante 1-2 min a 15-21k x g;

17. Descartar tubo colector e solução filtrada;

Transferir minicoluna de purificação para um tubo Eppendorf esterilizado de 1.5 ml;

Nota: Identificar numero de amostra;

18. Adicionar 20 µl de Elution Buffer, pré-aquecido a 80°C, directamente sobre a membrana da minicoluna de purificação;

19. Incubar durante 10 min à temperatura ambiente;

20. Centrifugar durante 1 min a 11-15k x g;

21. Remover a minicoluna;

Conteúdo com DNA isolado;

Para um curto espaço de tempo armazenar a +4°C;

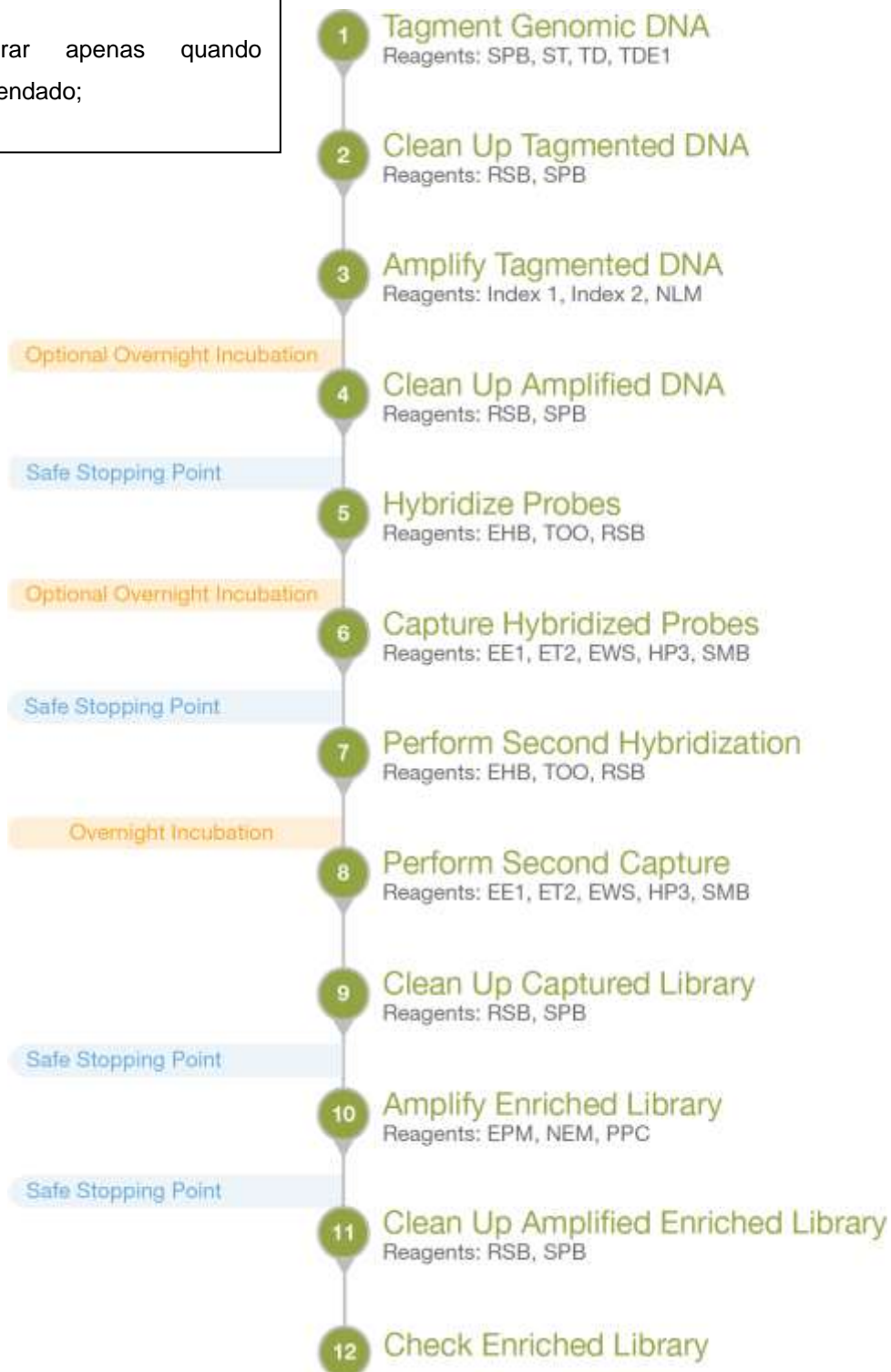
Para um longo espaço de tempo armazenar a -20°C;

## **Protocolo preparação de Library para NGS:**

## Protocolo TruSight One - Tradução

Esquema do Protocolo;

- Parar apenas quando recomendado;



### 1- Marcar DNA genómico (gDNA)

(1.1) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
gDNA	-25 °C a -15 °C	Colocar em gelo;  Misturar;  Centrifugar brevemente;
TD	-25 °C a -15 °C	Colocar em gelo;  Misturar;  Centrifugar brevemente;
TDE1	-25 °C a -15 °C	Colocar em gelo;  Misturar;  Centrifugar brevemente;  Manter em gelo;
SPB	2 °C a 8°C	Colocar 30 minutos à temperatura ambiente;  Manter à temperatura ambiente;
ST	15 °C a 30°C	Verificar precipitação, se existente, colocar no vortex até partículas ficarem suspensas;

Consumíveis:

- SPB
- ST
- TD
- TDE1
- gDNA (50 ng por amostra)
- PCR – grade water
- tris-HCl, 10 mM, pH 8.5
- Microplacas 96 poços (1)
- Selos adesivos 'B'

- Pré-aquecer sistema de aquecimento de microplacas a 58°C;

(1.2) Procedimento:

- Quantificar e Normalizar gDNA:

\* Quantificar gDNA utilizando métodos fluorométricos, como QuantiFluor ou Qubit;

\* Normalizar gDNA em Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 para 10 ng/μl;

\* Quantificar gDNA normalizado usando o mesmo método de quantificação fluorométrica utilizada inicialmente;

\* Diluir gDNA normalizado em Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 para um volume final de 10 µl a 5ng/µl (total de 50 ng);

- Marcar DNA:

\*Adicionar os seguintes itens por ordem a cada um dos poços da microplaca:

1) gDNA normalizado (10µl);

2) TD (25µl);

3) TDE1 (5µl);

4) PCR-grade water (10µl);

\*Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;

\* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;

\* Colocar no sistema de aquecimento de microplacas a 58 °C, com tampa fechada, durante 10 minutos;

\* Adicionar 15 µl de ST a cada poço;

\* Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;

\* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;

\* Encubar à temperatura ambiente, durante 4 minutos;

## 2- Lavagem de DNA marcado.

### (2.1) Sobre Reagentes:

- Vortex SPB antes de utilizar;

- Vortex SPB frequentemente para garantir que estão precipitados estão uniformemente distribuídos;

- Aspirar e dispensar lentamente SPB devido à viscosidade da solução;

#### Consumíveis:

- RSB;

- SPB;

- Etanol 80% (EtOH), acabado de preparar;

- Placas de PCR 96 poços 0.3 ml (96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate);

- Microseal 'B' adhesive seals;

### (2.2) Preparação:

- Preparar os seguintes consumíveis:

Item	Armazenamento	Instruções
RSB	2°C a 8°C	Manter 30 minutos à temperatura ambiente
SPB	2°C a 8°C	Manter 30 minutos à temperatura ambiente

- Preparar EtOH 80%;

### (2.3) Procedimento:

- Adicionar 65 µl SPB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 8 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar em suporte magnético e aguardar até líquido estar limpo (≈ 2 minutos)
- Remover e descartar todo o sobrenadante em cada poço;
- Lavar **duas vezes** da seguinte forma:
  - \* Adicionar 200 µl de EtOH 80% a cada poço.
  - \* Incubar no suporte magnético, durante 30 segundos.
  - \* Remover e descartar todo o sobrenadante em cada poço.
- Utilizar pipeta de 20 µl para remover EtOH residual em cada poço;
- Secar ao ar no suporte magnético, durante 10 minutos;
- Remover de suporte magnético;
- Adicionar 22.5 µl de RSB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar em suporte magnético e aguardar até líquido estar limpo (≈ 2 minutos)
- Transferir 20 µl de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova placa de PCR;

### 3- Amplificar DNA marcado.

#### Consumíveis:

- Adaptadores Index 1 (i7);
- Adaptadores Index 2 (i5);
- NML;
- Tubos 1.7 ml (1 por cada tubo de adaptador index);
- Microseal 'A' film;
- Microseal 'B' adhesive seal;
- OPCIONAL: TruSeq Index Plate Fixture Kit;

### (3.1) Preparação

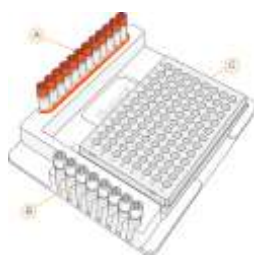
Item	Armazenamento	Instruções
Adaptadores de Index (i7 e i5)	-25°C a -15°C	- Remover apenas adaptadores a serem utilizados. - Colocar à temperatura ambiente, durante 20 minutos. - Colocar no vortex cada tubo. - Centrifugar brevemente utilizando um tubo Eppendorf de 1.7 ml.
NLM	-25°C a -15°C	Colocar no gelo

- Guardar o seguinte programa NLM AMP no termociclador:

- \* Escolher opção de pré-aquecimento de tampa e colocar a 100°C
- \* 72°C por 3 minutos
- \* 98°C por 30 segundos
- \* 10 ciclos de : a) 98°C por 10 segundos  
b) 60°C por 30 segundos  
c) 72°C por 30 segundos
- \* 72°C por 5 minutos
- \* Manter a 10°C

### (3.2) Procedimento:

- Organizar Adaptador Index 1 (i7) para ser colocado em cada coluna;
- Organizar Adaptador Index 2 (i5) para ser colocado em cada linha;
- EX:



A Columns 1–12: Index 1 (i7) adapters (orange caps)  
B Rows A–H: Index 2 (i5) adapters (white caps)  
C 96-well PCR plate

- Adicionar 5 µl de adaptador índice 1 (i7) em cada coluna;
- Substituir a tampa em cada tubo de adaptador índice 1 (i7);
- Adicionar 5 µl de adaptador índice 2 (i5) em cada linha;
- Substituir a tampa em cada tubo de adaptador índice 2 (i5);
- Adicionar 20 µl de NLM a cada poço. (**O volume total em cada poço será de 50 µl**);

- Agitar a 1200 rpm, durante 1 minuto;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar no termociclador previamente programado e correr o programa NLM AMP;

**SAFE STOPPING POINT**

(Se interromper, selar a placa e armazenar entre 2°C a 8°C até 2 dias. Em alternativa, deixar no termociclador durante a noite)

#### 4- Limpar DNA amplificado

##### (4.1) Sobre Reagentes

- Vortex SPB antes de utilizar;
- Vortex SPB frequentemente para garantir que estão precipitados estão uniformemente distribuídos;
- Aspirar e dispensar lentamente SPB devido à viscosidade da solução;

Consumíveis:

- RSB;
- SPB;
- Etanol 80% (EtOH), acabado de preparar;
- Placa PCR 96 poços 0.3 ml; (96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate);
- 96-well midi plate;
- Microseal 'B' adhesive seals;

##### (4.2) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
RSB	2°C a 8°C	Colocar à temperatura ambiente durante 30 minutos;
SPB	2°C a 8°C	Colocar à temperatura ambiente durante 30 minutos;

- Preparar Etanol 80% (EtOH);

##### (4.3) Procedimento:

- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Transferir 50 µl de sobrenadante para um poço correspondente numa nova placa (midi plate);
- Adicionar 90 µl de SPB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- Lavar **2 vezes** da seguinte forma:
  - \* Adicionar 200 µl de EtOH 80% a cada poço;
  - \* Incuba em suporte magnético, durante 30 segundos;
  - \* Remover e descartar todo o sobrenadante em cada poço;
- Usar pipeta de 20 µl para remover EtOH residual em cada poço;
- Secar à temperatura ambiente no suporte magnético, durante 10 minutos;
- Adicionar 27.5 µl de RSB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- Transferir 25 µl de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova placa de PCR;
- Quantificar a biblioteca utilizando método fluorométrico, como QuantiFluor ou Qubit;
- OPCIONAL: Correr 1 µl da biblioteca num bioanalisador Agilent Technologies 2100 utilizando um chip DNA 1000.

## **SAFE STOPPING POINT**

(Ao interromper, selar a placa e armazenar à temperatura entre -25°C a -15°C, até 14 dias)

### **5- Hibridação de Sondas**

#### (5.1) Sobre Reagentes:

Consumíveis:

- EHB;
- TOO ou TOE;
- RSB;
- Placa PCR 96 poços 0.3 ml; (96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate);
- Microseal 'B' adhesive seal;
- [Optional] Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter unit (0.5 ml, 30 kDa) (1 per pooled sample)

- Antes de utilizar EHB, usar vortex para suspender a

solução;

- Certificar que não existem cristais ou nebulosidades;

- Utilizar vortex até solução estar homogênia;

#### (5.2) Preparação:

- Preparar os seguintes consumíveis:

Item	Armazenamento	Instruções
TOO ou TOE	-25°C a -15°C	Colocar à temperatura ambiente
EHB	-25°C a -15°C	Colocar à temperatura ambiente
RSB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos

- Guardar o seguinte programa (NRC HYB) no termociclador:

\* Seleccionar pré-aquecimento de tampa a 100°C;

\* 95°C, por 10 minutos;

\* 94°C, por 1 minuto;

\* 92°C, po 1 minuto;

\* 90°C, por 1 minuto;

- \* 88°C, por 1 minuto;
- \* 86°C, por 1 minuto;
- \* 84°C, por 1 minuto;
- \* 82°C, por 1 minuto;
- \* 80°C, por 1 minuto;
- \* 78°C, por 1 minuto;
- \* 76°C, por 1 minuto;
- \* 74°C, por 1 minuto;
- \* 72°C, por 1 minuto;
- \* 70°C, por 1 minuto;
- \* 68°C, por 1 minuto;
- \* 66°C, por 1 minuto;
- \* 64°C, por 1 minuto;
- \* 62°C, por 1 minuto;
- \* 60°C, por 1 minuto;
- \* Manter a 58°C;

(5.3) Biblioteca (Pool Libraries):

(5.4) Procedimento:

- Adicionar os seguintes itens, pela ordem apresentada, a cada poço de uma nova placa de PCR;

\* Biblioteca de DNA (40 µl);

\* EHB (50 µl);

\* TOO ou TOE (10 µl);

- Agitar a 1200 rpm, durante 1 minuto;

- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;

- Colocar no termociclador pré-programado e correr o programa NRC HYB. (cada poço contem 100 µl);

- Manter a 58°C ao longo de pelo menos 90 minutos até 24 horas;

## 6- Captura de Sondas Hibridizadas

### (6.1) Sobre Reagentes:

- EWS pode estar turvo ao atingir temperatura

Ambiente;

- Vortex EWS antes de utilizar;

- Certificar que é **utilizado SMB (tubo de 2 ml)** e não SPB (tubo de 15 ml);

- Inverter e colocar no vortex mistura de SMB antes de utilizar;

- **Discard elution premix after use.**

### (6.2) Preparação:

-

#### Consumíveis:

- EE1;
- ET2;
- EWS;
- HP3;
- SMB;
- 96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate
- 96-well midi plate
- 1.7 ml microcentrifuge tube
- Microseal 'B' adhesive seals

Item	Armazenamento	Instruções
EE1	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
EWS	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
HP3	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;

ET2	2°C a 8°C	- Manter à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideais;
SMB	2°C a 8°C	- Manter à temperatura ambiente durante 30 minutos;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideais;

- Pré-aquecer sistema de aquecimento de midi plate a 50°C;

(6.3) Procedimento:

- 1ª Ligação:

- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Transferir todos os volumes para os poços correspondentes de uma nova placa midi plate;
- \* Adicionar 250 µl de SMB a cada poço;
- \* Agitar a 1200 rpm, durante 5 minutos;
- \* Incubar à temperatura ambiente, durante 25 minutos;
- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- \* Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- \* Remover de suporte magnético;

- 1ª Lavagem: Efectuar **2 lavagens** da seguinte forma, respeitando a ordem:

- 1) Adicionar 200 µl de EWS a cada poço;
- 2) Agitar a 1800 rpm, durante 4 minutos;
- 3) Pipetar para suspender bead pellet (Pipette to resuspend the bead pellet further.);

- 4) Colocar no sistema de microaquecimento a 50°C com tampa fechada, durante 30 minutos;
- 5) Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- 6) Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- 7) Remover de suporte magnético;

- 1ª Eluição

- \* Criar reagente de eluição combinando os seguintes itens: EE1 (28.5 µl) e HP3 (1.5 µl). Colocar no vortex;
- \* Adicionar 23.5 µl de reagente de eluição a cada poço;
- \* Agitar a 1800 rpm, durante 2 minutos;
- \* Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;
- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- \* Transferir 21 µl de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova placa de PCR;
- \* Adicionar 4 µl de ET2 a cada poço;
- \* Agitar a 1200 rpm, durante 1 minuto;
- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;

**SAFE STOPPING POINT**

(Ao interromper, selar a placa e armazenar à temperatura entre -25°C a -15°C, até 7 dias)

**7- Segunda Hibridação:**

(7.1) Sobre Reagentes:

Consumíveis:

- EHB;
- TOO ou TOE;
- RSB;
- Microseal 'B' adhesive seals;

- Antes de utilizar EHB, usar vortex para suspender a solução;

- Certificar que não existem cristais ou nebulosidades;
- Utilizar vortex até solução estar homogênia;

(7.2) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
TOO ou TOE	-25°C a -15°C	Colocar à temperatura ambiente;
EHB	-25°C a -15°C	Colocar à temperatura ambiente;
RSB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos;

(7.3) Procedimento:

- Adicionar os seguintes reagentes **por ordem** a cada poço com amostra;
  - \* RSB (15 µl);
  - \* EHB (50 µl);
  - \* TOO ou TOE (10 µl);
- Agitar a 1200 rpm, durante 1 minuto;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar no termociclador e correr o programa NRC HYB previamente guardado. (cada poço contém 100 µl);
- Manter a 58°C entre 14.5 horas a 24 horas;

## 8- Segunda Captura

(8.1) Sobre Reagentes:

- EWS pode estar turvo ao atingir temperatura Ambiente;

Consumíveis:

- EE1;
- ET2;
- EWS;
- HP3;
- SMB;
- 96-well midi plate (2);
- 1.7 ml microcentrifuge tube;
- Microseal 'B' adhesive seals;

- Vortex EWS antes de utilizar;
- Inverter SMB antes de utilizar;
- **Discard elution premix after use.**

(8.2) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
EE1	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
EWS	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
HP3	-25°C a -15°C	- Colocar à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
ET2	2°C a 8°C	- Manter à temperatura ambiente;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;
SMB	2°C a 8°C	- Manter à temperatura ambiente durante 30 minutos;  - Após utilizar colocar em condições de armazenamento ideias;

- Pré-aquecer sistema de aquecimento de midi plate a 50°C;

(8.3) Procedimento:

- 2ª Ligação:

- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Transferir todos os volumes para os poços correspondentes de uma nova placa midi plate;
- \* Adicionar 250 µl de SMB a cada poço;
- \* Agitar a 1200 rpm, durante 5 minutos;
- \* Incubar à temperatura ambiente, durante 25 minutos;
- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- \* Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- \* Remover de suporte magnético;

- 2ª Lavagem: Efectuar **2 lavagens** da seguinte forma, respeitando a ordem:

- 1) Adicionar 200 µl de EWS a cada poço;
- 2) Agitar a 1800 rpm, durante 4 minutos;
- 3) Pipetar para suspender bead pellet (Pipette to resuspend the bead pellet further.);
- 4) Colocar no sistema de microaquecimento a 50°C com tampa fechada, durante 30 minutos;
- 5) Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- 6) Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- 7) Remover de suporte magnético;

- 2ª Eluição

- \* Criar solução de eluição combinando os seguintes reagentes: EE1 (28.5 µl) e HP3 (1.5 µl). Colocar no vortex;
- \* Adicionar 23.5 µl de reagente de eluição a cada poço;
- \* Agitar a 1800 rpm, durante 2 minutos;
- \* Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;

- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- \* Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- \* Transferir 21 µl de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova midi plate;
- \* Adicionar 4 µl de ET2 a cada poço. (volume total por poço na nova midi plate é de 25 µl);
- \* Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- \* Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;

## 9- Lavagem de Biblioteca Capturada

### (9.1) Sobre Reagentes:

- Vortex SPB antes de utilizar;
- Vortex SPB frequentemente para garantir homogeneidade;
- Aspirar e dispensar SBP lentamente devido à viscosidade da solução;

#### Consumíveis:

- RSB;
- SPB;
- Etanol 80% (EtOH), acabado de preparar;
- Placas de PCR 96 poços 0.3 ml (96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate);
- Microseal 'B' adhesive seals;

### (9.2) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
RSB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos;
SPB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos;

- Preparar EtOH 80%;

### (9.3) Procedimento:

- Adicionar 45 µl de SPB a cada poço. (Volume total por poço será de 70 µl);
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos;

- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- Remover e descartar todo o sobrenadante de todos os poços;
- Lavar **2 vezes** da seguinte forma:
  - \* Adicionar 200 µl de EtOH 80% a cada poço;
  - \* Incubar no suporte magnético, durante 30 segundos;
  - \* Remover e descartar todo o sobrenadante de todos os poços;
- Utilizar pipeta de 20 µl para remover resíduos de EtOH de cada poço;
- Secar à temperatura ambiente no suporte magnético, durante 10 minutos;
- Adicionar 27.5 µl de RSB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- Transferir 25 µl de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova placa de PCR;

**SAFE STOPPING POINT**

(Ao interromper, selar a placa e armazenar à temperatura ambiente)

Consumíveis:

- NEM;
- PPC;
- Microseal 'A' film;
- Microseal 'B' adhesive seals;

**10- Amplificar biblioteca**

(10.1) Preparação:

Item	Armazenamento	Instruções
NEM	-25°C a -15°C	Colocar em gelo;
PPC	-25°C a -15°C	Colocar em gelo;

- Guardar o seguinte programa (NEM AMP10) no termociclador:

\* Seleccionar opção de pré-aquecimento de tampa, à temperatura de 100°C;

\* 98°C, durante 30 segundos;

\* 10 ciclos da seguinte sequência:

a) 98°C, durante 10 segundos;

b) 60°C, durante 30 segundos;

c) 72°C, durante 30 segundos;

\* 72°C, durante 5 minutos;

\* Manter a 10°C;

### (10.2) Procedimento:

- Adicionar 5 µl de PPC a cada poço;
- Adicionar 20 µl de NEM a cada poço. (Volume total por poço é de 50 µl);
- Aplicar o selo e agitar a 1200 rpm, durante 1 minuto;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar no termociclador e correr o programa NEM AMP10;

### **SAFE STOPPING POINT**

(Ao interromper, selar a placa e armazenar à temperatura entre 2°C

## **10-Limpar Biblioteca enriquecida e amplificada**

### (10.1) Sobre Reagentes:

- Vortex SPB antes de utilizar;
- Vortex SPB frequentemente para garantir homogeneidade;
- Aspirar e dispensar SBP lentamente devido à viscosidade da solução;

### (10.2) Preparação:

#### Consumíveis:

- RSB;
- SPB;
- Etanol 80% (EtOH), acabado de preparar;
- Placas de PCR 96 poços 0.3 ml (96-well Hard-Shell 0.3 ml PCR plate);
- 96-well midi plate;
- Microseal 'B' adhesive seals;

Item	Armazenamento	Instruções
RSB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos;
SPB	2°C a 8°C	Manter à temperatura ambiente, durante 30 minutos;

- Preparar EtOH 80%;

### (10.3) Procedimento:

- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Transferir 50 µl para um poço correspondente de uma nova midi plate;
- Adicionar 90 µl de SPB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos;
- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar (≈ 2 minutos);
- Remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço;
- Lavar **2 vezes** da seguinte forma:
  - \* Adicionar 200 µl de EtOH 80% a cada poço;
  - \* Incubar no suporte magnético, durante 30 segundos;
  - \* Remover e descartar todo o sobrenadante de todos os poços;
- Utilizar pipeta de 20 µl para remover resíduos de EtOH de cada poço;
- Secar à temperatura ambiente no suporte magnético, durante 10 minutos;
- Adicionar 32.5 µl de RSB a cada poço;
- Agitar a 1800 rpm, durante 1 minuto;
- Incubar à temperatura ambiente, durante 2 minutos;

- Centrifugar a 280xg, durante 1 minuto;
- Colocar num suporte magnético e aguardar até líquido limpar ( $\approx$  2 minutos);
- Transferir 30  $\mu$ l de sobrenadante para um poço correspondente de uma nova placa de PCR;

**SAFE STOPPING POINT**

(Ao interromper, selar a placa e armazenar à temperatura entre  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ , até 7 dias)