

ELABORAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO RECEPTOR DE PROLACTINA EQUINA

ALESSANDRA NEIS¹; FREDERICO SCHMITT KREMER¹; LARISSA OLIVEIRA DANELUZ¹; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON¹

¹Universidade Federal de Pelotas – alessandra_neis@hotmail.com

¹Universidade Federal de Pelotas - fred.s.kremer@gmail.com

¹Universidade Federal de Pelotas - larissa.daneluz@gmail.com

¹Universidade Federal de Pelotas – primleon@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico secretado pela glândula pituitária e envolvido no estímulo à lactação, estando também relacionado a distúrbios gestacionais, imunológicos, reprodutivos e oncológicos em mulheres. Altos níveis de prolactina sérica implicam em galactorreia e infertilidade em humanos (FREEMAN et al., 2000). Em equinos, a estrutura e interação proteína-receptor não é totalmente elucidada, existindo apenas modelos humanos preditos.

A fim de avaliar a relação entre modificações genéticas e sua influência sobre determinadas patologias, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), mutações mais frequentes no material genético, demonstram sua importância em doenças humanas no sentido de virem à intervir no papel biológico da proteína e na transdução de sinais. Como exemplo disso, têm-se a influência dos polimorfismos no desenvolvimento de infertilidade relacionada à endometriose (YANG et al., 2015). Para a detecção destes polimorfismos, métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento são empregados (GIESECKE et al., 2009).

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi a elaboração de um teste de diagnóstico molecular de SNPs no receptor da prolactina equina através de análises computacionais. Assim, a partir deste, pode-se diagnosticar em éguas a relação entre os polimorfismos e a infertilidade, e seu impacto sobre a via de sinalização intracelular investigada.

2. METODOLOGIA

Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo (NEIS et al., 2016) constataram a presença de três SNPs na região codificadora do gene PRLR equino (21:29917887..30073887) (Genbank: NW_001867391.1). Enquanto que a modelagem das proteínas afetadas pelas mutações revelou que estas não modificam a região extracelular ou a transmembrana (PDB: 3NPZ e 2N71), partes já resolvidas disponíveis nos bancos de dados, mas o domínio intracelular, que possui apenas modelos hipotéticos disponíveis.

Para obter dados sobre a frequência de ocorrência dessa mutação e sua relação com a infertilidade e outros efeitos biológicos em éguas, foi necessário desenvolver um ensaio capaz de detectar a presença desse SNP em amostras biológicas, já que as análises estruturais se mostram incapazes de demonstrar a real interferência. Para isso, o método de PCR-RFLP foi escolhido, que utiliza a amplificação do fragmento de interesse e consequente reconhecimento de um sítio de restrição enzimática. Baseando-se no fato de que a presença do polimorfismo caracterizaria a ligação da enzima, dois fragmentos seriam gerados, permitindo-nos diferenciar aqueles que apresentam ou não a mutação. Assim, as

análises *in silico* constituem passo fundamental na obtenção de ensaio preliminar para a detecção dos polimorfismos.

As buscas por sítios de restrição capazes de reconhecer discriminatoriamente cada SNP foram realizadas com a ferramenta *restrictionmapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>). O desenho dos *primers* foi realizado com o programa Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Informações como o tempo de ação da enzima, temperatura da reação e demais especificações foram obtidos junto ao fornecedor New England Biolabs® (<https://www.neb.com/products/r0635-bseyi>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados os três SNPs potencialmente impactantes na transdução de sinal através de ferramentas bioinformáticas, conforme apresentado na tabela 1. Foi possível discriminar o sítio de restrição enzimática “CCCAGC”, na sequência selvagem, para o SNP rs396467081, onde age a enzima de restrição *BseYI*. Já a presença da mutação acarreta na sequência “GCCAGC”, que interferirá nas regiões mais próximas às estruturas preditas em comparação aos demais polimorfismos, por se localizar na posição 540 do gene PRLR.

Como as estruturas disponíveis nos bancos de dados incluem a região transmembrana e o domínio extracelular, (conforme apresentados na figura 1), delimitados pelos primeiros 300 aminoácidos, a localização do SNP afeta a região intracelular transdutora de sinal, ainda sem estruturas disponíveis.

Tabela 1. SNPs analisados no trabalho.

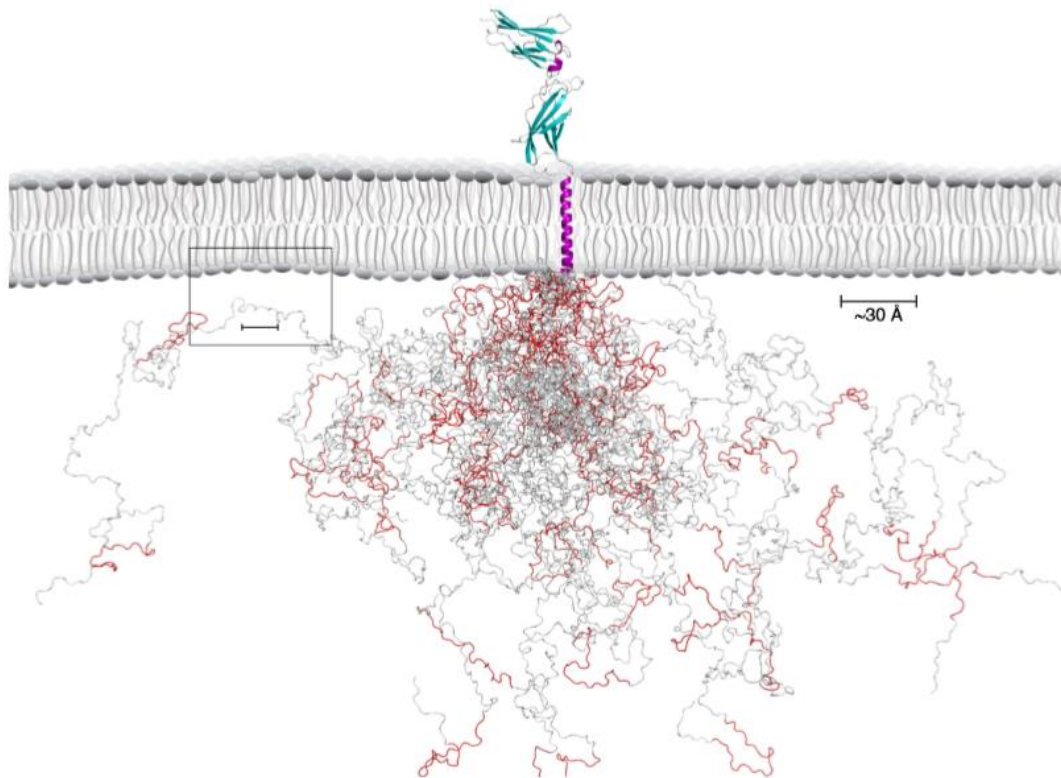
Código	Troca de Base	Troca de Aminoácido	Posição na proteína
<u>rs394089265</u>	C → G	Q → H	588
<u>rs395329519</u>	A → T	I → K	593
<u>rs396467081</u>	C → G	P → A	540

O conjunto de *primers* desenhados através da ferramenta Primer3, foram “AGCCTTGGATTACGTGGAGA” (*forward*) e “TTCTTCGAACAAAGCCAGGT” (*reverse*) para a amplificação da região alvo, tendo o *amplicon* 208 pares de base (pb). A restrição enzimática tem tempo de reação de 1 hora e resultará na digestão do genótipo selvagem, diferenciando as amostras polimórficas. Portanto, o genótipo selvagem resultará em duas bandas de 113 pb e 95 pb, enquanto o mutado terá apenas uma banda de 208 pb, permitindo a diferenciação entre os genótipos do gene PRLR equino por eletroforese em gel de agarose.

GIESECKE et al. (2009), realizaram uma reação de PCR seguido de sequenciamento do cDNA em garanhões Hanoverianos, mostrando uma associação entre a presença de dois SNPs nas regiões intrônicas do gene do PRLR em tecido testicular com altas taxas de prenhez por estro. Distúrbios reprodutivos podem estar presentes em éguas, já que sabe-se que em humanos há relação hereditária de mutações no PRLR e infertilidade em casos de hiperprolactinemia familiar, como descrito por NEWHEY e colaboradores (2013). Aliado a isso, há relatos de que a ausência de prolactina interfere na síntese de progesterona e gera um metabólito inativado, criando um quadro de infertilidade (FREEMAN et al., 2000). Esses dados fortalecem a hipótese que disfunções na via de sinalização da prolactina acarretam em distúrbios reprodutivos.

Os polimorfismos analisados podem ser os precursores de modificações nas vias de sinalização intracelular e acarretar em distúrbios relacionados à fertilidade equina. Isso, por sua vez, só será comprovado através da detecção dos mesmos em amostras biológicas, representadas por uma coorte em posse de nosso grupo, referente a 197 éguas da raça Puro Sangue Inglês e levantamento de dados referentes a dez temporadas reprodutivas.

Figura 1. Estruturas disponíveis nos bancos de dados para o receptor de prolactina. É possível visualizar os domínios extracelular e transmembrana do PRLR, que já possuem estruturas resolvidas. Um dos modelos do domínio intracelular de 10 resíduos está em destaque. Adaptado de BUGGE, K. et al. (2016)



4. CONCLUSÕES

O presente trabalho estabeleceu um protocolo *in silico* para a determinação da presença de SNPs no gene PRLR equino por PCR-RFLP, a fim de analisar *in vitro* posteriormente tecidos de éguas inférteis e estabelecer relação entre sua presença e disfunções reprodutivas. Foi encontrado sítio de restrição na sequência canônica para um dos SNPs avaliados, e desenhados os *primers forward* e *reverse* para a amplificação da sequência. A enzima *Bse*YI foi encontrada como a responsável por reconhecer o sítio de restrição e causar a fragmentação. Através deste diagnóstico molecular, torna-se possível testar a relação entre a presença dos polimorfismos e distúrbios de fertilidade em equinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUGGE, K. et al. A combined computational and structural model of the full-length human prolactin receptor. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 1–11, 2016.

FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiological Reviews**, Tallahassee, v. 80, n. 4, p. 1523-1631, 2000.

GIESECKE, K. et al. Evaluation of prolactin receptor (prlr) as candidate gene for male fertility in hanoverian warmblood horses. **Reproduction in Domestic Animals**, Hanover, v. 45 n. 5, p. 124–130, 2009.

NEIS, A. et al., Abordagem *in silico*: impacto de SNPs sobre a estrutura e função biológica do receptor da prolactina equina. In: **1º CONGRESSO DE BIOTECNOLOGIA DA REGIÃO SUL - BIOTECSUL**, 1, Lajeado, 2016. Anais do 1º Congresso de Biotecnologia da Região Sul, Lajeado: Editora Univates, 2016, v.1, p. 76.

NEWHEY, P. et al. Mutant Prolactin Receptor and Familial Hyperprolactinemia. **New England Journal of Medicine**, v. 369 n. 21, p. 2012–2020, 2013.

UNTERGASSER A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res**, Heideberg, v. 40, n. 15, 12 p, 2012.

YANG, C.-W. et al. Genetic variations of MUC17 are associated with endometriosis development and related infertility. **BMC medical genetics**, v. 16, n. 60, p. 1-7, 2015.