

PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM PARA UM POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE DO RECEPTOR DA BRADICININA B2

NELSON LUIZ DE LIMA IAHNKE¹; CARLOS CASTILHO DE BARROS²

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UFPel – niahnke@yahoo.com.br

²Faculdade de Nutrição – UFPel – e-mail do autor 2 (se houver)

1. INTRODUÇÃO

A associação da genética com a biologia do exercício estuda como variações genéticas influenciam as adaptações geradas pela aplicação de treinamento físico, em população saudável e em atletas de elite. Neste contexto, a prática regular de exercício físico causa adaptações benéficas no indivíduo. Contudo, fica claro que há uma considerável variabilidade individual na resposta a um treinamento similar. Isso significa que algumas pessoas têm maior ou menor ganho de desempenho após realizar treinamento físico estruturado (SKINNER et. Al, 1999; FEITOSA 2002). Isto ocorre devido as diferenças no DNA (ácido desoxirribonucleico). Desta forma, já foram identificadas algumas variações genéticas associadas ao desempenho físico e ao metabolismo energético. Atualmente, mais de 200 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), definidos como a variação de apenas um nucleotídeo na sequencia em determinado locus (região do DNA), estão associados com fenótipos do desempenho físico (BRAY et al., 2009; SHARP, 2008; MACARTHUR et. Al, 2005). Identificar e compreender as vias metabólicas que contribuem para a resposta individual ao treinamento físico é desafiador, mas tem implicações potenciais interessantes para o desenvolvimento futuro de programas de treinamento de exercícios individualizados (JONES et. Al, 2017).

Dentro dessas variações genéticas que influenciam no desempenho físico o gene que codifica para o Receptor de bradicinina B2 (BDKRB2) é importante pois participa de diversas funções biológicas. Este é um receptor que regula a expressão de uma proteína envolvida na vasodilatação dependente do endotélio. Um dos peptídeos conhecidos como cininas é a bradicinina (BK) - um vasodilatador significativo, liberado dos cininogênios pela atividade proteolítica das calicreínas. A proteína está envolvida em regulação vascular, inflamação, edema, dor, neurotransmissão, proliferação celular, contração da musculatura lisa e modulação do metabolismo da glicose (GRENDÁ et. al., 2014; ZMIJEWSKI P et. Al, 2016). Os receptores estão localizados na membrana plasmática as células do músculo esquelético e o endotélio vascular. A ativação de BDKRB2 resulta no aumento da captação de glicose no músculo esquelético durante a atividade física, no fluxo sanguíneo nos músculos e, como resultado, no aumento do desempenho de resistência. Além disso, a síntese do óxido nítrico vasodilatador (NO) a partir da arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) tem sido descrita (GRENDÁ et. al., 2014; ZMIJEWSKI P et. Al, 2016).

Desta forma, a variação rs1799722 é um SNP que ocorre no gene BDKRB2 e a troca da base C pela T e foi relatada em literatura como modulador do ganho de condicionamento físico devido à alta prevalência em maratonistas do alelo T. O SNP rs1799722 presente no músculo esquelético foi associado a diferenças na magnitude da resposta da pressão arterial ao exercício de preensão manual. Este SNP já foi estudado em diversos experimentos que envolveram sua contribuição

para a resposta ao treinamento físico (TSIANOS et. Al, 2010; NOTAK et. Al, 2018).

2. METODOLOGIA

O tetra-primer ARMS-PCR será utilizada na padronização e é um tipo de PCR (reação em cadeia da polimerase) multiplex que consiste em vários conjuntos de primers dentro de uma única mistura que produzem amplicons (fragmentos de DNA amplificados) de tamanhos diferentes que identificam especificamente diferentes seqüências de DNA. Conjuntos de primer são projetados para que suas temperaturas de anelamento sejam otimizadas para funcionar corretamente dentro de uma única reação. Os amplicons resultantes são diferentes o suficiente em tamanho para formar bandas distintas quando visualizadas por eletroforese em gel (BLUTH & BLUTH, 2018). A análise dos SNP's será cada vez mais utilizada em estudos que serão facilitados por metodologias rápidas, simples, de baixo custo e alto rendimento para sua genotipagem (YE et. Al, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

BDKRB2 (rs1799722) Anel.: 58°C

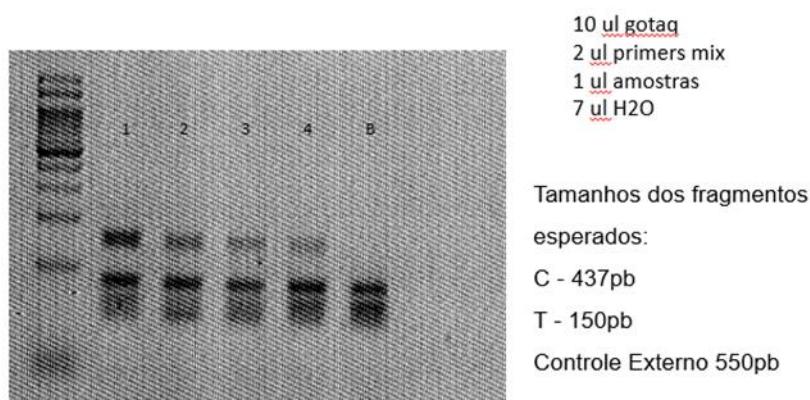


Figura 1. Genotipagem realizada em gel de agarose 2% após eletroforese, SNP (rs1799722). Apenas a banda T foi formada.

BDKRB2 (rs1799722) Anel.: 60°C

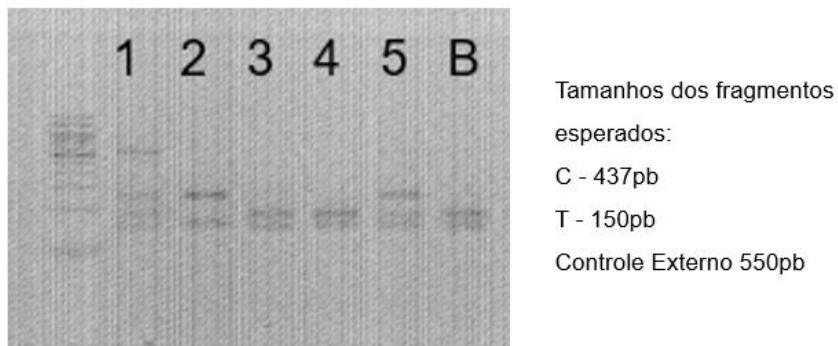


Figura 2. Genotipagem realizada em gel de agarose 2% após eletroforese, SNP (rs1799722). A banda controle aparece apenas na amostra 1.

BDKRB2 (rs1799722) Anel.: 60°C



10 ul gotaq
1,5 ul primers mix
2 ul amostras
6,5 ul H2O
R+F+Tir

Figura 3. Genotipagem realizada em gel de agarose 2% após eletroforese, SNP (rs1799722). Um dos primers foi retirado para verificar funcionamento dos outros.

As condições para a padronização para genotipagem de cada SNP escolhido serão únicas devido a composição de nucleotídeos dos primers. A quantidade de cada uma das bases A, T, C e G que compõe cada primer modifica a sua temperatura de anelamento. Desta forma, como observamos nas figuras 1 e 2, algumas das bandas esperadas podem não ser formadas na temperatura prevista ou nas condições de concentração dos reagentes. Buscamos então ajustar a reação para que possa demonstrar os resultados previstos. A temperatura de anelamento foi testada algumas vezes partindo de 58°C, 60°C e 62°C, demonstrando melhor resultado para 60°C algo já esperado pelo design dos primers. A extração de DNA dos sujeitos também teve que ser refeita a fim de confirmar a presença de DNA nas amostras finais. A concentração dos reagentes foi alterada em diversas situações como demonstrado nas figuras 1 e 2, passamos de 1uL de amostras para 2uL. Após verificarmos que a banda de 437pb não foi gerada em nenhuma das amostras, ocorreu uma tentativa de PCR apenas com os três primers R, F e Tir e a banda controle apareceu em metade das amostras. O processo de padronização envolve como demonstrado tentativas e erros e os próximos passos serão importantes para finalização do processo. Para que possamos demonstrar o sucesso da padronização do processo de genotipagem e o correto funcionamento dos primers devemos ter pelo menos três amostras de cada alelo para cada SNP e após os resultados positivos estas amostras serão encaminhadas para sequenciamento afim de confirmar os resultados.

4. CONCLUSÕES

A variação rs1799722 no gene BDKRB2 pode influenciar na resposta ao treinamento físico ou ser um marcador de potencial genético. Desta forma, a padronização da genotipagem por método simples, pouco oneroso e confiável é importante para o estudo do desempenho físico individual com enfoque na contribuição da genética ao desempenho físico. Apesar das dificuldades com os primeiros testes com as modificações na temperatura de anelamento conseguimos a formação de algumas das bandas esperadas. Nos próximos passos iremos realizar modificações na concentração dos reagentes afim de conseguir o diagnóstico do SNP com apenas uma reação de PCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUTH M. J.; BLUTH M. H. Molecular Pathology Techniques: Advances in 2018. **Molecular Pathology Techniques.** Clinics in Laboratory Medicine. v.38; n.2; 2018.

BRAY, M. S.; HAGBERG, M. J.; PERUSSE, L.; RANKINEN T.; ROTH, S. M.; WOLFARTH, B.; BOUCHARD, C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v. 41, n. 1, p.34–72, 2009.

FEITOSA M. F.; GASKILL S. E.; RICE T. Major gene effects on exercise ventilatory threshold: the HERITAGE Family Study. **Journal of Applied Physiology.** v. 93; 1985; 2002.

GRENDA A.; LEONSKA-DUNIEC A.; CIESZCZYK P.; ZMIJEWSKI P. Bdkrb2 gene -9/+9 polymorphism and swimming performance. **Biology of Sport.** v. 31; n. 2; p. 109-113; 2014.

JONES N.; KIELY J.; SURACI B.; COLLINS D. J.; de LORENZO D.; PICKERING C.; ZMIJEWSKI P.; GREND A.; LEONSKA-DUNEIK A.; AHMETOV I.; ORYSIAK J.; CIESZCZYK P. Effect of BDKRB2 Gene -9/+9 Polymorphism on Training Improvements in Competitive Swimmers. **Journal of Strength and Conditioning Research.** v. 30; n. 3; p. 665-671; 2016.

MACARTHUR D. G.; NORTH K. N. Genes and human elite athletic performance. **Human Genetics.** v.116, n.5, p.331-339, 2005.

NOTAY K.; KLINGEL S. L.; LEE J. B.; DOHERTY C. J.; SEED J. D.; SWIATCZAK M.; MUTCH D. M.; MILLAR P. J. TRPV1 and BDKRB2 receptor polymorphisms can influence the exercise pressor reflex. **The Journal of Physiology.** v.596; n.21.; p.5135-5148; 2018.

SHARP N. C. The human genome and sport, including epigenetics and athleticogenomics: a brief look at a rapidly changing field. **Journal of sports sciences.** v.26; n.11; p.1127-1133; 2008.

SKINNER J. S.; WILMORE K. M.; JASKOLSKA A.; JASKOLSKI A.; DAW E. W.; RICE T.; GAGNON J.; LEON AS.; WILMORE J. H.; RAO D. C.; BOUCHARD C. Reproducibility of maximal exercise test data in the HERITAGE family study. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** n.31; v.11; p.1623-1628; 1999.

TSIANOS G. I.; EVANGELOU E.; BOOT A.; ZILLIKENS M. C.; VAN MEURS J. B.; UITTERLINDEN A. G.; IOANNIDIS J. P. Associations of polymorphisms of eight muscle- or metabolism-related genes with performance in Mount Olympus marathon runners. **Journal of Applied Physiology.** v.108; n.3; p.567-574; 2010.

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