

**PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM PARA UM POLIMORFISMO DE
NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA A (PPARA) rs4253778**
**NELSON LUIZ DE LIMA IAHNKE¹; DANILO GOMES RIBEIRO²; CARLOS
CASTILHO DE BARROS³**

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

²danilogr94@gmail.com

³Faculdade de Nutrição, UFPel – barroscapel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A associação da genética com a biologia do exercício estuda como variações genéticas influenciam as adaptações geradas pela aplicação de treinamento físico. Ocorre 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). Existem variações genéticas associadas ao desempenho físico e ao metabolismo energético. Mais de 200 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), definidos como, a variação de apenas um nucleotídeo na sequência, estão associados ao desempenho físico (BRAY et al., 2009; SHARP, 2008; MACARTHUR et. Al, 2005). Utilizar o fator genético pode ser interessante para o desenvolvimento de programas de treinamento de exercícios individualizados possibilitando o aumento do desempenho físico (JONES et. Al, 2017).

Esta proteína regula o metabolismo lipídico do fígado, do coração e do músculo esquelético, a homeostase da glicose, a biogênese mitocondrial, a hipertrofia cardíaca. Na ausência de glicogênio, o músculo aumenta sua dependência metabólica da oxidação de ácidos graxos livres (AGL). Essa flexibilidade metabólica indica que existe uma relação inversa entre o conteúdo de glicogênio e a utilização de lipídios no músculo esquelético, o que pode contribuir para o aumento da capacidade de oxidação de gordura no músculo esquelético após treinamento de endurance (PROIA et al., 2014; LOPEZ-LEON et. Al, 2016).

A hipótese de que o alelo do íntron 7 C SNP rs4253778 está associado ao efeito hipertrófico devido às influências na utilização do substrato do músculo esquelético e cardíaco foi apoiada pelos achados de que o alelo PPARA C foi super-representado em atletas russos orientados para a potência e associado a uma proporção aumentada fibras musculares de contração rápida no músculo vasto lateral de controles do sexo masculino (AHMETOV et al., 2006). Além disso, em um estudo com atletas lituanos, (GINEVIČIENĖ et. AL, 2010) mostraram que atletas do sexo masculino com genótipos PPARA CC e PPARA GC tinham massa muscular e força de contração muscular única significativamente maiores (medida por teste de salto vertical) do que homozigotos GG. A frequência do alelo PPARA C também foi significativamente maior em atletas lituanos com orientação de potência e atletas com atividade aeróbia / anaeróbia mista em comparação com os controles. Também foi demonstrado que os portadores do sexo masculino (meninos em idade escolar) do alelo PPARA C demonstraram os melhores resultados do teste de força de preensão manual do que os homozigotos GG (AHMETOV et. Al, 2013; BONISŁAWSKA et. Al, 2018; MACIEJEWSKA-SKRENDÓ et. Al, 2019).

O presente trabalho demonstra o processo de padronização do teste PCR (Reação em cadeia da polimerase) de um dos SNPs que compõe um teste de perfil genético para disposição atlética individual.

2. METODOLOGIA

A técnica, chamada tetra-primer ARMS-PCR, adota certos princípios do método de PCR tetra-primer (Ye et. Al, 1992) e o sistema de mutação refratária de amplificação (ARMS) (YE et. Al, 2001). Abaixo uma representação esquemática do funcionamento do tetra-primer ARMS-PCR (figura 1).

Tetra-primer ARMS-PCR

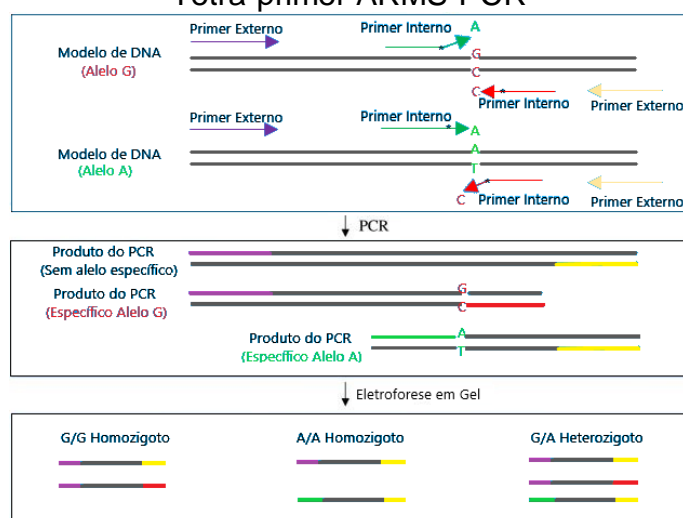


Figura 1. Apresentação esquemática do método tetra-primer ARMS-PCR. O SNP utilizado aqui como exemplo é uma substituição G → A e o método pode ser usado para outros tipos de substituições de base única. Dois amplicons específicos de alelo são gerados usando dois pares de primers, um par (indicado por setas rosa e vermelha, respectivamente) produzindo um amplicon representando o alelo G e o outro par (indicado por setas amarela e verde, respectivamente) produzindo um amplicon representando o alelo A. (Adaptado de Ye et. Al, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PPARA (rs4253778) Anel.: 60°C

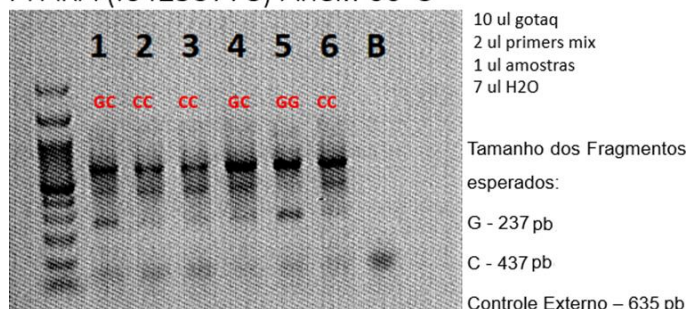


Figura 2. PCR PPARA rs4253778 temperatura de anelamento à 60°C. Foto de Gel de agarose 2% após eletroforese. Na coluna da esquerda temos o marcador de peso molecular 100 pb dna ladder (Ludwig, USA). Nas colunas de 1 a 6 estão as amostras de DNA extraído testadas e o branco (sem DNA). Nas amostras 1 e 4 foram formadas as bandas de 237 pb (alelo G), 437 pb (alelo C) e 635 pb controle externo (genótipo GC). Nas amostras 2, 3 e 6 as bandas de 437 pb (alelo C) e 635 pb foram formadas (genótipo CC). Na amostra 5 as bandas de 237 pb e de 635 pb foram formadas (genótipo GG). Os diagnósticos estão acima das colunas em caixa grande e em letra vermelha.

As condições de 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, 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 um melhor resultado para 60°C algo já esperado pelo design dos primers. Na figura 2 observamos o sucesso na padronização do teste, onde todos os genótipos podem ser verificados GG, CG ou CC e a banda controle também foi amplificada demonstrando mais confiabilidade nos resultados. A extração de DNA dos sujeitos também foi refeita a fim de confirmar a presença de DNA nas amostras finais.

4. CONCLUSÕES

A variação rs4253778 no gene PPARA 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 e o presente trabalho obteve sucesso na padronização da reação de PCR de baixo custo para genotipar essa importante variação genética influenciadora do desempenho físico individual.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMETOV I. I.; GAVRILOV D. N.; ASTRATENKOVA I. V.; DRUZHEVSKAYA A. M.; MALININ A. V.; ROMANOVA E. E.; ROGOZKIN V. A. (2013). The association of ACE, ACTN3 and PPARA gene variants with strength phenotypes in middle school-age children. **The journal of physiological sciences**. JPS. v.63; n.1; p.79-85.

BONISLAWSKA I.; PATYNA A.; WICZYNSKI J.; URBANSKI R.; ZYCHOWSKA M. (2018) Assessment of fatigue and the overtraining syndrome in female spinning instructors based on a survey and on the expression of selected genes. Baltic Journal of Health and Physical Activity. **The Journal of Gdansk University of Physical Education and Sport**. v10. n.1.

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.

LOPEZ-LEON S.; TUVBLAD C.; FORERO D. A (2016). Sports genetics: the PPARA gene and athletes' high ability in endurance sports. A systematic review and meta-analysis. **Biology of Sport**. v. 33; n.1; p. 3-6.

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

MACIEJEWSKA-SKRENDÓ A.; CIĘSZCZYK P.; CHYCKI J.; SAWCZUK M.; SMÓŁKA W. (2019) Genetic Markers Associated with Power Athlete Status. **Journal of Human Kinetics**. n.68; p.17-36.

PROIA P.; BIANCO A.; SCHIERA G.; SALADINO P.; CONTRO V.; CARAMAZZA G.; TRAINA M.; GRIMALDI K. A.; PALMA A.; PAOLI A (2014). PPAR α gene variants as predicted performance-enhancing polymorphisms in professional Italian soccer players. **Open Access Journal of Sports Medicine**. v.5; p. 273-278.

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.

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.