

POLIMORFISMO NO CÓDON 72 DA p53 EM COORTE PSI EQUINA

LEON, Priscila Marques Moura de*, THUROW, Helena Strelow, HARTWIG, Fernando Pires, NEDEL, Fernanda, CAMPOS, Vinícius Farias, SEIXAS, Fabiana, UFPel

COLLARES, Tiago
UFPel

Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec),
Universidade Federal de Pelotas *primleon@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A p53 é uma proteína citoplasmática que apresenta um papel fundamental na estabilidade genômica, estando envolvida na progressão do ciclo celular, no reparo do DNA lesado e na apoptose. Conhecido como o gene supressor tumoral em mamíferos, localizado no cromossomo 17, recebe esse nome porque codifica uma proteína nuclear de 53 kDa (Soussi & May, 1996). Sua organização genômica é conservada entre diferentes espécies, no entanto ainda não foi completamente elucidada no genoma equino (Wade *et al.*, 2009).

As anormalidades ou a inativação do gene TP53 têm sido apontadas como os defeitos genéticos mais comuns no câncer humano (Moll *et al.*, 2001). Desde a década de 90, sabe-se que essa proteína apresenta uma região crítica para sinalização de apoptose no éxon 4 (Thomas *et al.*, 1999). Dentro deste domínio, no códon 72, encontra-se uma região de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), podendo apresentar um resíduo prolina (CCC) ou arginina (CGC), estas duas variantes polimórficas tem demonstrado possuir além das diferenças estruturais, propriedades bioquímicas e biológicas diferentes (Thomas *et al.*, 1999; Naldi *et al.*, 2010).

Foi sugerido que a via da p53 desempenha um importante papel na fertilidade humana (Hu *et al.*, 2007). O alelo prolina foi indicado como maior risco para falhas na implantação embrionária (Kang *et al.*, 2009) e perda gestacional recorrente (Firouzabadi *et al.*, 2009). A identificação do risco de fracasso gestacional associado ao polimorfismo oferece aos pacientes prognóstico de sucesso da fertilização *in vitro* (Goodman *et al.* 2009).

Este trabalho teve como objetivo identificar SNP no códon 72 da p53 na DNAteca de uma coorte de eqüinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI). O banco de dados genotípicos gerados neste estudo permitirá a busca de correlações entre características reprodutivas em estudos retrospectivos.

2 METODOLOGIA

Foram coletados amostras de sangue 187 equinos da raça Puro Sangue Inglês para extração de DNA genômico conforme instruções do DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen®), e criação de uma DNAteca correspondente a coorte epidemiológica equina.

A região alvo foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes *primers*: *forward* 5' TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA 3'

e *reverse* 5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3'. A reação de PCR foi padronizado nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 1min, TM de 60°C por 1 min e 72°C por 1min, finalizando com extensão final de 72°C por 5 min. O produto esperado era um fragmento de 199pb.

Para identificação do polimorfismo, foi utilizado a clivagem enzimática com enzima BstUI, que possui sítio de restrição em CG/CG. Foi incubado 12ul do produto de PCR com 2 unidades de BstUI durante 2 horas e 30 minutos a 60°C. A restrição enzimática produz fragmentos de 113pb e 86pb se o genótipo for referente a Arginina/Arginina, fragmentos de 199pb, 113pb e 86pb no Arginina/Prolina, e não ocorre clivagem no Prolina/Prolina. A visualização dos genótipos é realizada em eletroforese gel de agarose 2,5% com produto corado com GelRed™ (Biotium Inc., CA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram identificados três genótipos possíveis da p53 na espécie eqüina, confirmando a existência do polimorfismo de nucleotídeo único, conforme ilustrado na figura 1.

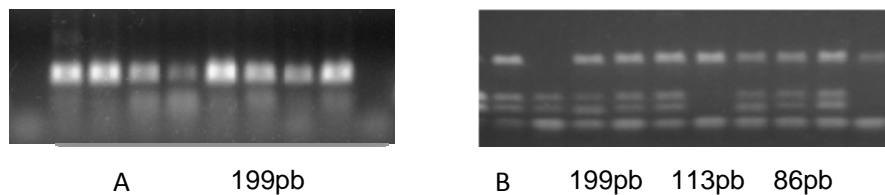


Figura 1. A. amplificação da região do códon 72 do TP53 equino, produto amplificado de 199pb. B. Produtos da restrição enzimática demonstrando os três genótipos referentes a Prolina/Argina (199pb, 113pb e 86pb), Arginina/Arginina (113pb e 86pb) e Prolina/Prolina (199pb).

Em equinos, foi observada a prevalência do genótipo heterozigoto P/A, enquanto que os dois homozigotos não diferiram entre sua distribuição populacional. A freqüência dos genótipos obtida está representada na figura 2.

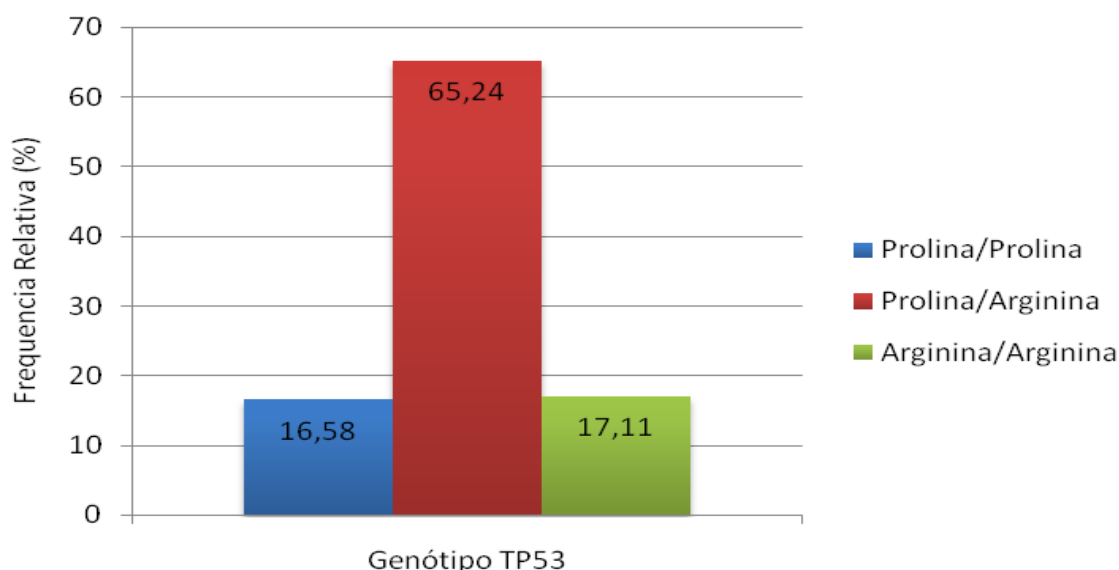


Figura 2. Frequência observada dos genótipos do TP53 em eqüinos.

Thomas *et al.*, (1999) publicou o primeiro estudo que demonstrou duas isoformas diferentes codificadas pelo códon 72 do gene da p53 no homem. Sendo constatado que o amino ácido arginina mostra um potencial apoptótico maior que o prolina, principalmente pela localização mitocondrial da arginina e conseqüente liberação do citocromo C no citosol (JEONGE *et al.*, 2009). Em função disto, vários estudos tem demonstrado que o SNP do códon 72 da p53 pode alterar a capacidade de apoptose, mostrando correlação com diversas patologias no homem (Grochola *et al.*, 2010). Em equinos este foi o primeiro trabalho a demonstrar estes genótipos.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi identificado o polimorfismo no códon 72 do éxon 4 do gene TP53 na espécie eqüina, sendo observado três possíveis genótipos, da mesma forma como ocorre na espécie humana. Foi construído um banco de dados de uma coorte de eqüinos PSI para estudos de correlações de patologias e parâmetros reprodutivos com os genótipos. A região de polimorfismo está sendo seqüenciada para depósito de seqüência no GenBank.

5 REFERÊNCIAS

FIROUZABADI, R.D.; GHASEMI, N.; ROZBAHANI, M.A.; TABIBNEJAD, N. Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 49, p. 216–219, 2009.

GOODMAN, C.; JEYENDRAN, R.S.; COULAM, C.B. P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 494-498, 2009.

GROCHOLA, L.F.; ZERON-MEDINA, J.; MÉRIAUX, S. *et al.* Single-nucleotide Polymorphisms in the p53 Signaling Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, p. 1-18, 2010.

HU, W.; FENG, Z.; TERESKY, A.K.; LEVINE, A.J. p53 regulates maternal reproduction through LIF. **Nature**, v. 450, p. 721–724, 2007.

KANG, H.J.; FENG, Z.; SUN, Y.; ATWAL, G.; MURPHY, M.E.; REBBECK, T.R.; ROSENWAKS, Z.; LEVINE, A.J.; HU, W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. **PNAS**, v. 106, n. 24, p. 9761–9766, 2009.

MOLL, U.M.; ERSTER, S.; ZAIKA, A. p53, p63 and p73—solos, alliances and feuds among family members. **Biochim Biophys Acta**, v. 1552, p. 47–59, 2001.

NALDI, M.; PISTOLOZZI, M.; BERTUCCI, C.; DE SIMONE, A.; ALTILIA, S.; PIERINI, M.; FRANCESCHI, C.; SALVIOLI, S.; ANDRISANO, V. Structural characterization of p53 isoforms due to the polymorphism at codon 72 by mass spectrometry and circular dichroism. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 200–206, 2010.

SOUSSI, T. & MAY, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, p. 623–637, 1996.

THOMAS, M.; KALITA, A.; LABRECQUE, S.; PIM, D.; BANKS, L.; MATLASHEWSKI, S. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 1092–1100, 1999.

WADE, C.M. *et al.* Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. **Science**, v. 326, p. 865, 2009.