



AVALIAÇÃO DE SNPs NO GENE SUPRESSOR DE TUMOR p53

Autor(es): Fernando Hartwig, Helena Thurow, Ludmila Entiauspe, Virginia Yurgel, Samuel Ribeiro, Fernanda Nedel, Isabel Oliveira, Fabiana Seixas, Tiago Collares

Apresentador: Fernando Pires Hartwig

Orientador: Tiago Collares

Revisor 1: Marta Amaral

Revisor 2: Claudia Pinho Hartleben

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Resumo:

O gene TP53 codifica para a proteína supressora de tumores p53, a qual tem papel chave na prevenção do desenvolvimento dos tumores, agindo em muitos processos celulares (ciclo celular, reparo do DNA e apoptose). Este gene encontra-se mutado em aproximadamente 50% dos cânceres humanos, sendo um alvo na pesquisa contra tal malignidade. O presente estudo é parte inicial do projeto “Prevalência dos polimorfismos oncogênicos dos exons 4 a 8 do gene da p53 no banco de DNA da coorte de 1982, Pelotas – RS e fatores de risco” e visa avaliar a eficácia dos primers para amplificação do fragmento que inclui o SNP localizado no códon 72 (mudança do aminoácido prolina por arginina) do gene da p53. Também, está sendo avaliada a clivagem enzimática do fragmento obtido através da técnica de PCR, para a detecção dos genótipos deste SNP (Arginina/Arginina; Arginina/Prolina; Prolina/Prolina). Para a realização desta pesquisa, foram obtidas 10 amostras teste de DNA de saliva extraído com a utilização de um kit comercial. Os primers utilizados para amplificação são: Forward 5’ TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA 3’ e Reverse 5’ TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3’ produzindo um fragmento esperado de 199pb. Para a clivagem enzimática foi utilizada a enzima BstU I. A utilização desta enzima produz fragmentos de 113 e 86pb se o genótipo for Arginina/Arginina; fragmentos de 199, 113 e 86pb se o genótipo for Arginina/Prolina e não ocorre clivagem se o genótipo for Prolina/Prolina. Ao realizar o PCR com as 10 amostras de DNA humano, obtiveram-se resultados conforme esperado visualizando-se o fragmento de 199pb por eletroforese em gel de agarose 2%. Após, foi realizada a técnica de RFLP na qual as amostras foram incubadas com a enzima de restrição por 16 horas a 37°C. Porém, observou-se que as amostras apresentaram digestão parcial impossibilitando a determinação precisa dos genótipos. Assim, repetiu-se a clivagem alterando a temperatura de incubação para 60°C. Nestas condições conseguiu-se a digestão completa dos fragmentos, obtendo-se os genótipos de 6 amostras: 3 Arginina/Arginina; 2 Arginina/Prolina e 1 Prolina/Prolina. Ainda, pretende-se testar a eficácia da digestão com menor tempo de incubação. A presente continuação deste estudo espera aperfeiçoar o protocolo de amplificação e genotipagem por PCR-RFLP para realização do projeto que objetiva determinar a distribuição da frequência alélica da p53, na coorte representativa à cidade de Pelotas, associando aos fatores de risco e ao câncer.