

CORRELAÇÃO DOS GENÓTIPOS REFERENTES AO SNP DO CÓDON 72 DA P53 COM A PELAGEM E ORIGEM DOS EQUINOS DA RAÇA PSI EM ESTUDO RETROSPECTIVO BASEADO EM DNATECA E COORTE

HAAS, Cristina Sangoi*, OLIVEIRA, Ruan; LEON, Priscila Marques Moura de, THUROW, Helena Strelow, CAMPOS, Vinícius Farias, SEIXAS, Fabiana Kömmling, COLLARES, Tiago

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

1 INTRODUÇÃO

A p53 é uma proteína citoplasmática que regula a replicação de DNA, a proliferação e morte celular, desempenhando um papel fundamental na estabilidade genômica, pois está envolvida na progressão do ciclo celular (Naldi *et al.*, 2010). Conhecido como gene supressor tumoral em mamíferos, seu papel na carcinogênese é alvo de muitos estudos (Han *et al.*, 2006; Whibley *et al.*, 2009). Devido a organização genômica conservada entre as espécies, estudos sobre correlações genéticas entre humanos e equinos são estimulados. As mutações do p53 aparecem em etapas específicas durante a transformação maligna, ou, em alguns casos a alteração da p53 coincide com a emergência de tumores biologicamente agressivos e a perda da diferenciação celular (Ribeiro Jr & Safatle-Ribeiro 2006).

Na espécie humana, uma das mutações mais estudadas no gene da p53 é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) no códon 72 do éxon 4. Em estudos prévios realizados por nosso grupo e apresentados neste evento, foi identificado o polimorfismo da mesma região do gene codificante para a p53 em equinos. Este SNP é uma variação do nucleotídeo guanina para citosina, que resulta na síntese dos aminoácidos arginina (A) ou prolina (P) respectivamente. Estas isoformas têm mostrado características químicas e biológicas diferentes no homem (Naldi *et al.*, 2010).

Uma relação do alelo prolina com a pigmentação da pele e a suscetibilidade ao câncer de pele tem sido investigada em populações (Han *et al.*, 2006). Pois, a proteína p53 tem demonstrado promover a pigmentação da pele em estímulo a luz ultra-violeta por ativação da transcrição em queratinócitos, resultando em maior melanogênese (Murase *et al.*, 2009). Mostrando um papel importante na proteção contra os danos do sol na pele, a expressão da p53 seria um marcador genético da tendência à malignização induzida pela radiação ultravioleta (Oren & Bartek, 2007).

Estimulado por esta relação investigada em humanos, o objetivo deste trabalho foi relacionar o genótipo gerado pelo SNP do códon 72 da p53 com a pelagem dos animais da coorte de equinos da raça Puro Sangue Inglês, assim como analisar a origem e linhagem destes animais frente a este polimorfismo gênico.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram analisadas 187 amostras de DNA genômico da coorte de eqüinos da raça Puro Sangue Inglês pertencente aos Laboratórios de Embriologia Molecular e Genômica Funcional do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel.

A região alvo do SNP do códon 72 da p53 equina foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), originando um fragmento de 199pb. Na identificação do polimorfismo foi utilizado a clivagem enzimática com BstUI e visualização em gel de agarose 2,5% com o produto corado com GelRed™ (Biotium Inc., CA).

De acordo com o número de bandas originadas na clivagem enzimática é realizada a genotipagem. O genótipo referente a Prolina/Prolina não é digerido pela BsTUI, permanecendo banda de 199pb; o genótipo Prolina/Arginina origina bandas de 199pb, 113pb e 86pb; e Arginina/Arginina duas bandas, de 113pb e 86pb.

No estudo da correlação entre o genótipo do gene da p53 e a pelagem e origem dos animais da coorte de eqüinos foi utilizado o software EpilInfo™ versão 3.5.1. Os dados foram confrontados na opção *Analyse Data > Statistics > Tables*, onde foi gerado as freqüências e análises por Chi-quadrado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não foi encontrada variação significativa entre o genótipo e a pelagem dos eqüinos ($p=0,39$). Embora não tenha sido identificados animais do genótipo Prolina/Prolina na pelagem tordilha, o pequeno número de animais desta pelagem ($n=4$) não permitiu estabelecer esta relação. Nos animais de pelagem alazã e castanha prevalece o mesmo padrão de distribuição genotípica. A figura 1 mostra a freqüência dos genótipos nas pelagens alazã, castanha e tordilha.

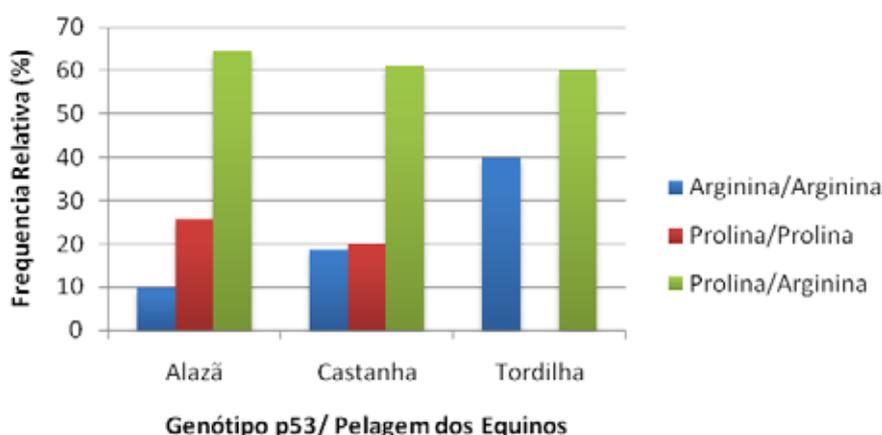


Figura 1. Frequência relativa dos genótipos da p53 em relação à pelagem dos eqüinos.

A pelagem tordilha é reconhecida por altos índices de melanomas. Este tipo neoplásico se desenvolve em 80% dos cavalos tordilhos com mais de 15 anos de idade (Patterson-Kane & Ginn, 2003). O distúrbio ocorre devido à

formação de novos melanoblastos ou aumento de sua atividade, mas a causa da alta prevalência em cavalos tordilhos não é completamente elucidada (Patterson-Kane & Ginn, 2003).

No homem, estudos encontraram uma relação positiva entre o aumento da melanogênese e o alelo prolina, conferindo uma proteção a queimaduras (Oren & Bartek, 2007). Assim como, a investigação de patologias em populações humanas específicas em função do polimorfismo da p53 (Roh *et al.*, 2010). Indicando a associação de cor de pele e origem no homem.

Quanto ao local de origem dos animais da coorte, são provenientes da Argentina, Brasil, França ou Estados Unidos. Porém, não houve associação da frequência relativa do genótipo com o local de origem dos cavalos PSI ($p=0,28$). A figura 2 ilustra estes dados.

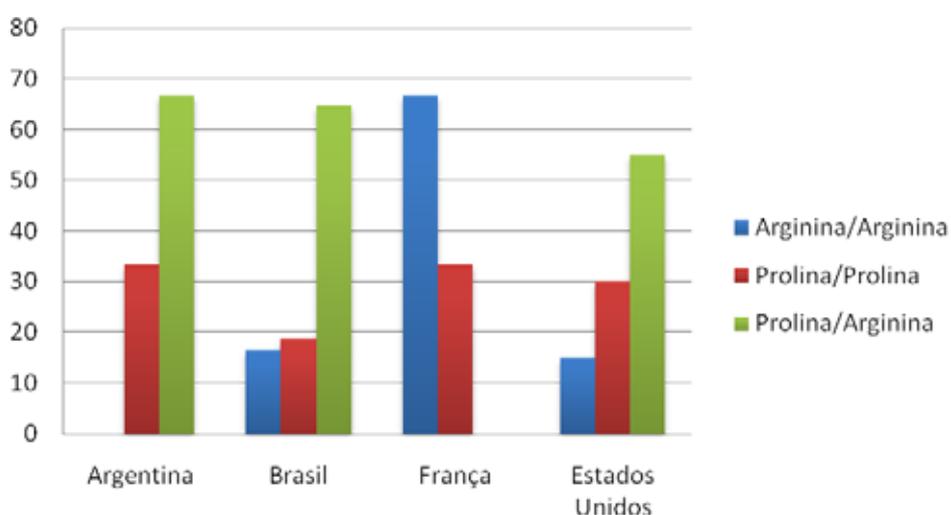


Figura 2. Frequência relativa dos genótipos da p53 em relação à origem dos eqüinos.

Pode ser observado que os animais de origem brasileira e americana apresentam o mesmo perfil de distribuição genotípica. Enquanto que, em animais provenientes da Argentina não foi detectado o genótipo Arginina/Arginina, e os da França não possuem o Prolina/Arginina, no entanto a frequência de Prolina/Prolina foi semelhante entre as origens.

4 CONCLUSÕES

Não foi estabelecida correlação dos genótipos referentes ao SNP do códon 72 da p53 com a pelagem e origem dos eqüinos da raça PSI. Porém, devido ao reduzido número de animais da pelagem tordilha disponíveis nesta coorte, maiores estudos são necessários para o entendimento específico desta pelagem, devido sua suscetibilidade a alterações neoplásicas epidermais.

5 REFERÊNCIAS

HAN, J., COX, D.G., COLDITZ, G.A. et al. The p53 codon 72 polymorphism, sunburns, and risk of skin cancer in US Caucasian women. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, p. 694–700, 2006.

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.

OREN, M., BARTEK, J. The sunny side of TP53. **Cell**, v. 128, p. 826-828, 2007.

PATTERSON-KANE, J.C.; GINN, P.E. Dermal malignant melanoma in a horse with multifocal pancytokeratin expression. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 54-56, 2003.

RIBEIRO JR., U. & SAFATLE-RIBEIRO, A.V. p53 in clinical contexts: yes or not? **Arquivos de Gastroenterologia**, v.43, p. 6-7, 2006.

ROH, J.W. KIM, B.K.; LEE, C.H.; KIM, J.; CHUNG, H.H.; KIM, J.W.; PARK, N.H.; SONG, Y.S.; PARK, S.Y.; KANG, S.B. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. **Oncology Research**, v.18, p. 453-9, 2010.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 95-107, 2009.