

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DA P53 E A OCORRÊNCIA DE SARCÓIDE EM EQUINOS

HAAS, Cristina^{1*}; LUCAS, Caroline Gomes²; LEON, Priscila Marques Moura de¹; COLLARES, Tiago¹; DESCHAMPS, João Carlos¹

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

²Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

* cristinasangoi@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Devido o aumento do número de casos de neoplasias, tanto humanos como em animais, os estudos de oncologia são emergentes e de grande importância para a sociedade (Cullen et al., 2002). Em animais de interesse zootécnico os dados relativos à ocorrência de tumores são escassos, principalmente pelo baixo número de centros de patologia veterinária especializada, o que gera a escassez de trabalhos científicos em oncologia nestas espécies.

Na espécie equina, a pele é o local mais comum de neoplasmas, com aproximadamente 50% de todos os tumores. Além de causar problemas econômicos, as lesões de pele são um importante problema estético nos animais de exposição morfológica. Entre os principais tipos tumorais observados estão: sarcóides, carcinoma de células escamosas, papilomas e melanomas (Scott & Miller Jr, 2003).

O sarcóide é um tumor geralmente agressivo, porém não metastático, que afeta principalmente equídeos domésticos, atingindo ambos os sexos e todas as raças de equino (Ginn et al., 2007). Com origem fibroblástica, morfológicamente é uma neoplasia predominantemente de tecido fibroso. Foi relatada uma prevalência de 20% em equinos (Radostitis, 2000). Atualmente, sua etiologia tem sido associado à infecção por papilomavírus bovino (BPV), sendo descritos os Deltapapilomavirus 1 e 2 como os principais subtipos envolvidos (Nasir & Campo, 2008). No entanto, a variedade de manifestações clínicas deverá ser resultante de interações entre o agente etiológico, o ambiente e o genoma do hospedeiro.

A p53 é uma proteína citoplasmática que regula a replicação de DNA, a proliferação e a morte celular, desempenhando um papel fundamental na estabilidade genômica, por estar 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). Análises de polimorfismos genéticos da p53 têm sido avaliados quanto a suscetibilidade a diversos tipos de câncer em humanos, dentre estes em neoplasias cutâneas (Rizzato et al., 2011). Devido a organização genômica conservada entre humanos e equinos, fato elucidado pelo sequenciamento do genoma do equino (Wade et al., 2009), estudos de correlação entre estas duas espécies são de grande valia e interesse científico.

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) entre Arginina (CGC) e Prolina (CCC) no gene da p53, correspondente ao SNP do códon 72 estudado em humanos, foi descrito recentemente por nosso grupo de pesquisa em equinos (dados em fase de publicação). Baseado nisso, o objetivo do presente trabalho foi

determinar a frequência de genótipos do polimorfismo genético Arginina/Prolina da p53 em amostras de sarcóide equino e correlacionar o genótipo a ocorrência desta neoplasia cutânea.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Obtenção dos Sarcóides

Foram analisadas 30 amostras diagnosticadas de sarcóide equino provenientes do Laboratório Regional de Diagnóstico da UFPel, no período de janeiro de 2011 a julho de 2011. Como população controle foram utilizadas 187 amostras de DNA equino provenientes de coorte de estudos reprodutivos de posse do Laboratório de Embriologia Molecular e Transgenese/CDtec da UFPel. Os animais controle foram inspecionados e diagnosticados livres da ocorrência de sarcóides.

Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras de tecido foi feito um pré-tratamento para retirada da formalina com lavagens em PBS. Foram realizados cortes de até 25mg de tecido em pequenos pedaços e colocados em tubos de microcentrifuga de 1,5mL e após, adicionado 180µL de tampão Tissue Lysis Buffer (ATL). Em seguida, foi adicionado 20µL de proteinase K, os tecidos foram submetidos ao vortex e incubados a 56° C overnight para que fossem completamente lisados. As seguintes etapas do protocolo de extração do DNA foram realizadas conforme instruções do fabricante (DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen®)). As amostras foram eluídas em 50µL e armazenadas em ultrafreezer a – 80°C até os testes moleculares.

Identificação do polimorfismo da p53

A região alvo do SNP da p53 equina foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), originando um fragmento de 199pb. As sequências de *primers* utilizada na reação de PCR foram: *forward* 5' TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA 3' e *reverse* 5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3'. Para a identificação do genótipo gerado pelo polimorfismo foi utilizada a técnica de restrição enzimática com a endonuclease *Bst*UI (New England Biolabs, USA), a qual possui sítio de restrição CG/CG. A identificação dos genótipos foi realizada através da visualização do produto em eletroforese gel de agarose 2% corado com GelRed™ (Biotium Inc., CA). O alelo resultante do SNP foi determinado de acordo com o número de bandas originadas na clivagem enzimática.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três genótipos foram identificados nas amostras provenientes dos sarcóides equinos. O genótipo referente a Prolina/Prolina não é digerido, permanecendo uma banda de 199pb; o genótipo Prolina/Arginina origina três bandas de 199pb, 113pb e 86pb; e Arginina/Arginina duas bandas, de 113pb e 86pb, devido a digestão total do produto. A figura 1 ilustra a identificação dos três genótipos da p53 nos sarcóides.

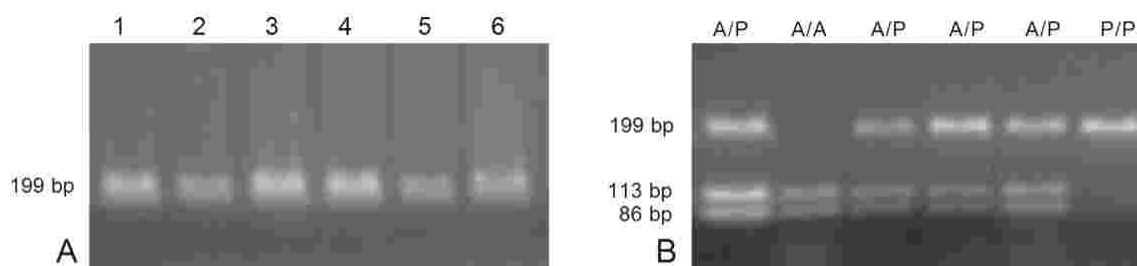


Figura 1. A. amplificação da região do polimorfismo genético da p53 equina, produto amplificado de 199pb. B. Produtos da restrição enzimática demonstrando os três genótipos referentes a: Prolina/Argina (199pb, 113pb e 86pb), Arginina/Arginina (113pb e 86pb) e Prolina/Prolina (199pb).

Foi observada a prevalência do genótipo heterozigoto Arginina/Prolina, ocorrendo em 27 de 30 amostras (90%). Os genótipos homozigotos foram observados apenas em três casos, sendo dois Arg/Arg e um Pro/Pro. A Figura 2 mostra a frequência relativa dos genótipos da p53 equina nas amostras estudadas de sarcóide e na população controle.

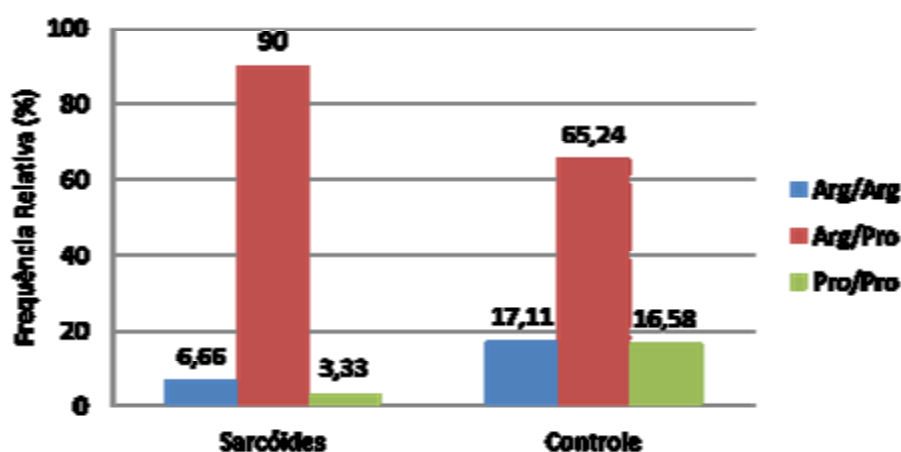


Figura 2. Frequência relativa (%) dos genótipos da p53 observados nas amostras de sarcóide equino e na população controle.

A distribuição dos genótipos em relação à ocorrência de sarcóide equino diferiu da população controle, pois o genótipo heterozigoto Arginina/Prolina foi mais frequente do que o esperado (90% vs 65,24%). Estes resultados indicam a possível correlação entre este polimorfismo e a suscetibilidade genética desta neoplasia cutânea em equinos. Estudos anteriores já haviam relatado a expressão alterada da p53 em diferentes tipos de sarcóides equinos (Bogaert et al., 2007), no entanto, polimorfismos genéticos não haviam sido estudados.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho identificou o polimorfismo de nucleotídeo único da p53 em amostras provenientes de sarcóides equinos, mostrando a prevalência do genótipo heterozigoto Arginina/Prolina. Nossos resultados indicam uma possível correlação entre o polimorfismo da p53 e a suscetibilidade a esta neoplasia cutânea frequente em equinos. O seguimento deste estudo será na associação dos fatores etiológicos do sarcóide e o SNP da p53 em maior número de equinos.

5 REFERÊNCIAS

BOGAERT, L., POUCKE, M. V., BAERE, C., DEWULF, J., PEELMAN, L., DUCATELLE, R., GASTHUYS, F., MARTENS, A. Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2155–2161, 2007.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis and Management. In: Meuten, D. J. **Tumors in Domestic Animals**; Iowa State Press, 2002. cap.1, p. 3-44.

GINN P.E.; MANSELL J.E.; RAKICH P.M. 2007. Skin and appendages, p.553-781. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5 th ed. Elsevier, Philadelphia

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.

NASIR, L. & CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Journal Compilation**, v. 9 , p . 243 - 254 , 2008 .

RADOSTITS, O.M., et al. **Clínica Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1118-1119

RIZZATO, C., SCHERER, D., RUDNAI, P., GURZAU, E., KOPPOVA, K., HEMMINKI, K., CANZIAN, F., KUMAR, R., CAMPA, D. POMC and TP53 genetic variability and risk of basal cell carcinoma of skin: Interaction between host and genetic factors. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, p. 47-54, 2011.

SCOTT D.W. & MILLER JR W.H. 2003. **Equine Dermatology**. Saunders, Saint Louis, p.287-795.

WADE, C. M. et al. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science*, v. 326, p. 865- 867, 2009.