

PADRONIZAÇÃO DA PCR-RFLP PARA A GENOTIPAGEM DOS ALELOS CYP2E1 *1A/*5B A PARTIR DE DNA OBTIDO DA MUCOSA ORAL

MOREIRA, Carine Lais¹; WAGNER, Glauber^{1*}

¹Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Ciências Biológicas, Unoesc

O metabolismo de xenobióticos é desempenhado por enzimas da família do citocromo P450; entre elas, destaca-se a enzima CYP2E1, que é responsável pelo metabolismo de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, nitrosaminas, benzeno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros. Esse gene possui dois alelos, nos quais a presença do alelo tipo mutante (5B) demonstra maior taxa de transcrição e atividade enzimática, causando assim, um desequilíbrio de subprodutos gerados para a fase II do metabolismo. Este trabalho teve como objetivo padronizar a análise dos alelos *1A e *5B do gene CYP2E1 no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Unoesc, com o estabelecimento de um protocolo padrão para a extração de DNA em amostras de mucosa oral e análise de RFLP (Análise do polimorfismo pelo tamanho de fragmentos gerados por restrição enzimática) para a determinação do genótipo das amostras. Para tal, amostras da mucosa oral de 20 voluntários foram coletadas e a extração realizada pelo método de *salting-out*. Para a amplificação do fragmento, foram utilizados 10 pmol de cada iniciador (CYPE2F 5'-CCAGTC GAG TCT ACA TTG TCA-3' e CYPE2R 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3'), 5 U de Taq DNA Polimerase, tampão de reação da enzima (10 mM Tris HCl, pH 8,5; 50 mM KCl) e 1,5 mM de MgCl₂ e 2 mM de dNTP e aproximadamente 100 ng de DNA. As condições da PCR foram de 35 ciclos a 92 °C por um minuto, 60 °C por um minuto, e 72 °C por um minuto. Após a amplificação, 10 µl do produto da PCR foi submetido à digestão durante 12 horas a 37 °C com a enzima de restrição *Pst*I, 90 mM Tris HCl (pH7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10mM DTT, 10ug/µl de BSA e 5 unidades da enzima, seguidas da inativação a 65 °C por 15 minutos. Para a determinação do genótipo do gene CYP2E1 nos indivíduos, é realizada a partir da análise do perfil de restrição obtido, onde a ausência da sítio de restrição para a enzima *Pst*I, banda de 410 pares de base (pb), indica alelo tipo selvagem clivagem (*1A), já no caso da presença do sítio de restrição desta enzima, resultara na clivagem do amplicon em dois fragmentos, 290 pb e 120 pb, demonstrando a presença do alelo tipo mutante (*5B). Desta forma, com base nesta metodologia, podemos realizar a análise da frequência dos alelos *1A e *5B do gene CYP2E1 em trabalhadores expostos a xenobióticos, podendo ser utilizado como marcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias relacionado à cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Citocromo; PCR; Xenobiótico.