

## PADRONIZAÇÃO DO PCR-RFLP PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO P72R DO GENE TP53 A PARTIR DE DNA OBTIDO DE AMOSTRAS DA SALIVA DE PACIENTES COM MELANOMA

BERTAN, Cleonice<sup>1</sup>; MIOLA, Vinícius Benetti<sup>2</sup>; TREVISOL, Fernanda<sup>2</sup>; MANFIO, Ariovaldo<sup>3</sup>; SARTORI, Beatriz<sup>2</sup>, WAGNER, Glauber<sup>12\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Ciências Biológicas, Unoesc

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Medicina, Unoesc

<sup>3</sup>Médico Dermatologista, Concórdia.

O melanoma é um tipo de tumor originado pela proliferação excessiva de melanócitos na camada basal da epiderme, com maior incidência em indivíduos de pele clara. Nesse tipo de tumor, a radiação ultravioleta é um importante fator de risco para o desenvolvimento dessa doença. Contudo, também se pode observar a propensão genética como fator determinante para o aparecimento dessa patologia. A proteína p53 é fundamental para o controle do ciclo celular, especialmente quando a célula está sofrendo um estresse oxidativo, uma quebra no DNA ou infecção viral. A frequência de mutações no gene TP53 em genoma de células tumorais sugere que essas células perderam a capacidade de regular o ciclo em função da perda dessa proteína, antes de iniciar a tumorigênese. Nesse sentido, alguns estudos com o gene TP53, em especial do polimorfismo do códon 72 (P72R), demonstraram a associação desse alelo com o surgimento de alguns tipos de tumores, especialmente em melanomas. No Sul e Sudeste do Brasil há uma incidência elevada de casos de melanoma quando comparados a outras regiões do Brasil, porém, pouco se sabe da frequência do alelo P72R na região. Dessa maneira, o presente estudo visou padronizar a técnica de PCR-RFLP para a avaliação do perfil genotípico para o polimorfismo P72R do gene TP53 em pacientes com histórico de melanoma. Para tal, amostras da mucosa oral de voluntários foram coletadas e a extração do DNA foi realizada utilizando o Kit comercial Gentra Puregene Buccal Cell (Quiagen), pelo método de *salting-out*. Para a amplificação do fragmento de 296 pares de bases (pb) foram utilizados 10 pmol de cada iniciador TP53-P72R-F 5' ATCTACAGTCCCCCTTGCCG 3' e TP53-P72R-R 5' GCAACTGAC CGTGCAAGTCA 3'), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), tampão de reação da enzima (10 mM Tris HCl, pH 8,5; 50 mM KCl) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dNTP e, aproximadamente, 100 ng de DNA. As condições da PCR foram de 35 ciclos a 92 °C por 1 minuto, 56 °C por 30 segundos, e 72 °C por 30 segundos. Após a amplificação, 20 µl do produto da PCR foram submetidos à digestão durante 3 horas a 60 °C com 5 unidades da enzima de restrição *Bst*UI. A determinação do genótipo foi realizada a partir da análise do perfil de restrição, na qual indivíduos homocigotos para o alelo P (Pro/Pro) apresentaram apenas uma banda de 296pb; já para alelo R (Arg/Arg), apresentaram bandas de 127 e 169 pb, e indivíduos heterocigotos (Pro/Arg) (resultados na clivagem do fragmentos de 295 pb) apresentaram três bandas, 127, 169 e 296 pb. Com esse protocolo, será possível estabelecer as frequências dos alelos P (Prolina) e R (Arginina) do gene TP53 em pacientes com diagnóstico positivo de melanoma, visando correlacionar esses alelos com essa doença na região oeste de Santa Catarina.

Palavras-chave: Melanoma. PCR-RFLP. p53.