

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1103275-8 A2



(22) Data de Depósito: 14/07/2011
(43) Data da Publicação: 16/07/2013
(RPI 2219)

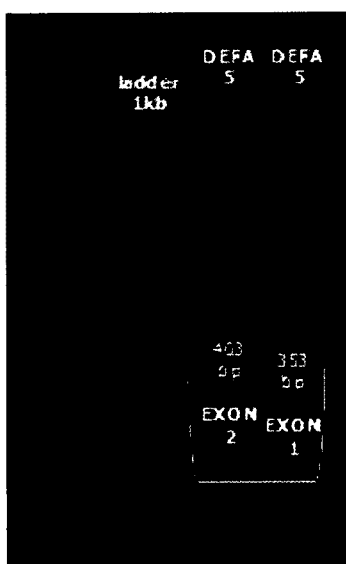
(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: METODOLOGIA PARA DISTINÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DAS ALFAS DEFENSINAS HUMANAS DEFA5, DEFA1 E DEFA3

(73) Titular(es): José Luiz de Lima Filho

(72) Inventor(es): Danyelly Bruneska Gondim Martins, Gustavo Alves do Nascimento, José Luiz de Lima Filho, Maria da Conceição Gomes Leitão

(57) Resumo: METODOLOGIA PARA DISTINÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DAS ALFAS DEFENSINAS HUMANAS DEFA5, DEFA1 E DEFA3. A presente invenção refere-se a um processo para detecção de polimorfismos genéticos dos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3 humanos, que visa o diagnóstico do câncer, a identificação da predisposição de humanos desenvolverem câncer, e também permite a detecção de infecções patogênicas.



METODOLOGIA PARA DISTINÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
DAS ALFAS DEFENSINAS HUMANAS DEFA5, DEFA1 E DEFA3

RELATÓRIO DESCRITIVO

5

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à metodologia para identificação de polimorfismos genéticos dos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3 humanos que codificam os peptídeos HD5 (Defensina humana 5), e HNP1 e HNP3 (Peptídeos de neutrófilos humanos), respectivamente.

Esses peptídeos fazem parte do sistema imunológico inato humano e contribuem para a defesa do hospedeiro contra um amplo espectro de patógenos como bactérias, fungos e vírus, além de promoverem respostas antitumorais. Mais particularmente, a presente invenção diz respeito a uma metodologia que permite a identificação de polimorfismos nas regiões exônicas e promotoras dos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3.

Antecedentes da invenção

As α -defensinas pertencem a uma família de peptídeos antimicrobianos atuantes na imunidade inata. Elas são encontradas em muitas espécies de mamíferos e contribuem para a defesa do hospedeiro contra um amplo espectro de patógenos como bactérias, fungos e vírus, além de promoverem respostas antitumorais. Dentre os tipos de α -defensinas destacam-se os Peptídeos de Neutrófilos Humanos 1 e 3 (HNP1 e HNP3), altamente homólogos, expressos em neutrófilos dentre outras células da imunidade inata, e células epiteliais; além da alfa defensina humana 5 (HD5) inicialmente descrita por sua expressão constitutiva em células Paneth do intestino delgado. Todavia, a expressão da HD5 em células epiteliais de outros tecidos, como no trato genital feminino já está bem caracterizada.

A principal propriedade das defensinas é a sua capacidade de eliminar micróbios patogênicos. Todavia, além de suas propriedades antibióticas, outras atividades biológicas destes peptídeos têm sido observadas *in vitro* ou *in vivo*. Estas atividades incluem a quimiotaxia, angiogênese, modulação de reações da imunidade adaptativa, efeitos pró-inflamatórios, entre outros. Devido a esta multifuncionalidade na defesa e regulação de processos patológicos, o interesse nesses peptídeos tem aumentado cada vez mais.

Os genes das defensinas humanas estão localizados no cromossomo 8p22-23 sendo esta uma região de alta complexidade e variabilidade gênica. O gene da α -defensina *DEFA1*, codifica o peptídeo HNP-1 e o gene *DEFA3* codifica o HNP-3, sendo o HNP-2 codificado por um ou ambos os genes. Enquanto, o gene *DEFA5* codifica a defensina HD-5. Estes genes apresentam tanto variação do número de cópias (CNVs) quanto polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), que podem estar relacionados à predisposição ou resistência a doenças.

Atualmente, os polimorfismos nos genes *DEFA1* e *DEFA3* são investigados apenas no exon três, no entanto, os genes *DEFA1-3* são compostos por três exons: o exon 1 que codifica a região 5'UTR o exon 2 que codifica a região da pré-proteína, a região promotora do gene fica adjacente ao exon 2, e o exon três (231pb) que codifica a região da proteína madura e região 3' UTR. Uma distinção de todos os exons componentes destes genes é de suma importância para análise de polimorfismos em suas regiões mais importantes, de codificação das respectivas proteínas, como também de controle de sua expressão gênica.

Atualmente, estão disponíveis inúmeras estratégias para a análise de polimorfismos genéticos. Podem ser utilizados por exemplo, RFLP (Restrição de tamanho de fragmento por polimorfismo). Resumidamente, uma sequência nucleotídica por exemplo de um gene ou de regiões de um gene, pode ser testada para a presença ou ausência de um sítio de restrição. Dessa forma, o Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que promove a substituição de uma base pode criar ou abolir o sítio de reconhecimento da enzima de restrição. O RFLP pode ser realizado na sequência nucleotídica após a amplificação desta pelo teste simples de PCR (a

sequencia que apresenta o sítio de restrição é clivada gerando dois ou mais fragmentos a que não apresenta o sítio permanece integra), ou ainda, ser usado diretamente no DNA genômico previamente a PCR, neste caso, a sequencia que apresentar o sítio de restrição é clivada e não será amplificada e a que não apresentar o sítio de restrição será amplificada.

As estratégias para análise de polimorfismos genéticos incluem ainda o seqüenciamento direto que pode ser realizado por seqüenciamento enzimático, utilizando o método de Sanger, seqüenciamento de espectrometria de massa, seqüenciamento utilizando uma tecnologia baseada em chip. Ainda, metodologias de hibridização com oligonucleotídeos alelo-específico (ASO), que são sondas sintéticas curtas, que hibridizam apenas numa seqüência específica sob condições adequadas de hibridização; PCR alelo-específico; PCR utilizando os iniciadores mutagênicos; ligase-PCR, PCR-TR (quantitativa em tempo real) ou teste de ligadura oligonucleotídeo (OLA). No entanto, ainda são poucos os estudos de polimorfismos das α -defensinas humanas.

Os peptídeos (recombinantes) das alfas defensinas humanas já são comercializados e utilizados em vários estudos de análise da ação antimicrobiana, como também, os produtos desses peptídeos como Kits com anticorpos específicos para a quantificação dos níveis de expressão das alfas defensinas humanas associado a várias patologias. Vários estudos vêm analisando o potencial de aplicação desses peptídeos na indústria farmacêutica, no entanto, essa aplicabilidade ainda se encontra restrita ao campo científico.

Os tratamentos de saúde demandam por vez uma resposta rápida para o diagnóstico de doenças e problemas relacionados a saúde. Os métodos de detecção no estado atual nem sempre conseguem viabilizar uma resposta em tempo hábil para estes tratamentos. Isto gera uma demanda pelo desenvolvimento de novas técnicas, como é o caso da presente invenção.

Existem patentes internacionais referentes a processos e produtos relacionados aos genes das alfas defensinas humanas. A patente US 6284878 intitulada "DEF1" de 15 de dezembro de 1997, descreve um processo de produção de

polinucleotídeos e polipeptídeos codificantes do gene DEFA1 por técnicas recombinantes para triagem de compostos antibacterianos. Essa invenção, no entanto, não permite a identificação de polimorfismos genéticos no gene DEFA1.

A patente US 6410688 intitulada “Deformylation of f-Met peptides in bacterial expression systems” de 13 de agosto de 1999, descreve métodos para a produção polipeptídeos do gene DEF1 por técnicas recombinantes. Também são fornecidos métodos para a utilização de polipeptídeos DEF1 para triagem de compostos antibacterianos. Porém esta patente não permite a identificação de polimorfismos genéticos no gene DEFA1.

A patente Wo/2009/074331 intitulada “ Early and differential diagnosis test for alzheimer's disease” de 11 de dezembro de 2007, descreve um método *in vitro* para o diagnóstico da doença de Alzheimer. Porém esta patente não permite a identificação de polimorfismos genéticos no gene DEFA1.

A patente US 2004/0265337 A1 intitulada “ Method of generating an immune response and compositions used for same” de 21 de agosto de 2003, descreve composições imunogênicas que contêm bactérias atenuadas (tais como *Salmonella enterica*), que são resistentes à ação antimicrobiana das defensinas humanas, particularmente defensina humana 5 (HD-5). Métodos para a utilização dessas composições para obter uma resposta sustentada e altamente imune específica são fornecidos. A invenção também fornece métodos para a preparação de vacinas, no qual um antígeno heterólogo é expresso pelas bactérias resistentes defensina. Essa invenção, no entanto, não permite a identificação de polimorfismos genéticos no gene DEFA5.

A patente US/7528107 intitulada “Methods of treating inflammation in mammalian tissues comprising administering human alpha-defensins” de 30 de novembro de 2006, descreve um método para tratar a inflamação nos tecidos de mamíferos incluindo a administração de α -defensinas (HD5 e HNP1) humanas para mamíferos em uma quantidade eficaz para inibir o processamento pós-translacionais e liberação da interleucina-1 β . Essa invenção, no entanto, não permite a identificação de

polimorfismos genéticos nos genes DEFA5 e DEFA1. Porém não se encontra contemplado em patente um processo de distinção e investigação dos polimorfismos genéticos nos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3.

A patente wo2011045414 intitulada “Method for predicting responsiveness of a patient to a chemoradiation treatment” de 15 de outubro de 2009, descreve um método *in vitro* para prever a resposta de um paciente com câncer retal ao tratamento por quimiorradiação através de investigação de SNPs em vários genes que são correlacionados com a biologia desse câncer. Porém, essa patente não contemplada um processo de distinção e investigação dos polimorfismos genéticos nos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3.

A patente WO2010128948 intitulada “Method for the determination of P blood groups” de 7 de maio de 2009, descreve um método para distinguir os alelos do grupo P1 e P2 de sangue através da utilização de pelo menos uma seqüência de nucleotídeos idêntica / homólogas de pelo menos parte da seqüência de nucleotídeos, como mostrado na SEQ ID NO nucleotídeos :1-6 ou um seqüência que mostra pelo menos 90% de identidade para qualquer uma das SEQ ID NO :1-6 e em que a diferença é uma citosina (C) ou timidina (T) na posição 129, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, onde C / C ou C / t nos dois alelos dá origem ao fenótipo P1 e T / T para o fenótipo P2. através de identificação de SNPs na sequência nucleotídica desses. Porém, essa patente não contemplada um processo de distinção e investigação dos polimorfismos genéticos nos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3.

A Patente WO/2001/018245 intitulada “Detection of alterations in a gene by long range pcr using human mobile elements” de 7 de setembro de 1999, descreve um método que identifica polimorfismos genéticos no gene C4A que faz parte da região do complexo de histocompatibilidade genética. Esta patente detecta polimorfismos no gene C4A, no entanto, essa patente não contemplada um processo de distinção e investigação dos polimorfismos genéticos nos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3.

Estas e outras patentes utilizam os vários métodos relatados acima mas nenhuma metodologia anterior empregam estes métodos para a distinção dos genes homólogos DEFA1-3 e a análise de polimorfismos genéticos nestes genes como no gene DEFA5.

5 O sistema de detecção proposto na presente patente pode ser utilizado para identificação de polimorfismos nos genes DEFA1, DEFA3 e DEFA5 de forma individualizada, permitindo desta forma, a elucidação das diferentes respostas da imunidade inata mediadas por estes genes frente a diversas patologias; ainda, promover o prognóstico de doenças relacionadas a polimorfismos genéticos desses

10 peptídeos, contribuindo também, para estudos epidemiológicos nas populações.

Descrição da invenção

A presente invenção descreve um sistema de identificação de polimorfismos dos genes DEFA1, DEFA3 e DEFA5 a partir de três processos: (1) PCR e sequenciamento

15 (gene DEFA5) e (2) PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido sequenciamento (3) PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido por PCR em tempo real (genes DEFA1 e DEFA3).

Primeiramente, o procedimento para obtenção das sequências específicas de todos os exons constituintes, incluindo as regiões a jusante e a montante das regiões codificantes destes, dos genes DEFA5 e dos genes DEFA1 e DEFA3 e de suas regiões

20 promotoras de expressão, é realizado pela análise das sequências de nucleotídeos dos referidos genes e desenho de todos os primers (oligonucleotídeos), utilizando o software CLC Main Workbench 5.7.1, mas não restrito apenas a este software. Estes primers promovem a amplificação de regiões específicas dos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3 para o estudo de polimorfismos destas regiões. Ainda, no caso dos gene DEFA1

25 e DEFA3 que são altamente homólogos os primers construídos são para a amplificação de regiões que permitem uma distinção seletiva de ambos os genes por digestão enzimática da sequência de um dos genes e, desta forma, obtenção da sequência integra e específica do outro.

Numa primeira modalidade preferida, o processo (1) de PCR e sequenciamento do gene DEFA5 (Figura1) compreende: uma primeira PCR na qual são utilizados o primers F (forward) exon1 (CCAGCAGAGCTATAAATCCA) e Primer R (reverse) exon 1 (TCACTCAAGTGAGGTAGACC) que amplificam o exon 1 do gene DEFA5; para a
5 amplificação do exon 2 o Primer F exon 2 (AGACTATCTCAGTTAGTCTGG) e Primer R exon 2 (GGAACCATACAAACCACCATA). A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não restringindo-se apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 50°C por 30seg e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72°C por 5 min. A
10 Figura 1 descreve a validação de primers para amplificação e sequenciamento do gene DEFA5 1. Exon 1 com 403pb e exon 2 com 353 bp.

Após a primeira PCR para o gene DEFA5 as sequências de nucleotídeos correspondentes aos exons 1 e 2 específicos do gene DEFA5 são purificados num volume desejado por tratamento com as enzimas ExoI 10U/μL (0.7μL) e Sap 1U/μL
15 (0.18μL) acrescido de 1.12 μL de H₂O destilada, mas que não se restringem apenas a estas condições. Em seguida, é realizada a incubação a 37° por 15min e inativação enzimática a 80 °C por 15 min, podendo-se variar também estas condições de temperatura e de tempo. Após a purificação é realizada uma eletroforese em gel agarose (figura1) ou outros métodos que viabilizem a visualização do DNA do gene de
20 interesse.

Para a realização do sequenciamento do gene DEFA5 é realizada uma segunda PCR utilizando os mesmos primers da primeira PCR. A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não restringindo-se apenas a estas condições: 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20seg; anelamento a 50 °C para o Primer F exon1 e 55°C para
25 o Primer R exon1, a 57 °C para o Primer F exon 2 e 60 °C para o Primer R exon 2 por 30seg; e extensão a 60 °C por 1 min, podendo-se variar estas condições. Após a realização da segunda PCR é realizada a purificação das sequências de nucleotídeos correspondentes aos exons 1 e 2 específicos do gene DEFA5 por adição de um volume desejado de acetato de sódio e um volume desejado do produto da segunda PCR
30 seguida de uma centrifugação para precipitação do DNA. Em seguida é adicionado um

volume desejado de etanol e centrifugado para obtenção do precipitado. O sobrenadante é descartado e adicionado novamente etanol em uma concentração desejada seguida de ciclos de centrifugação para obtenção da precipitação do DNA. O DNA é então incubado por um período desejado em tampão apropriado e posteriormente é realizado o sequenciamento do gene para identificação dos polimorfismos no gene DEFA5 (Figura 2). A Figura 2 descreve o sequenciamento das regiões do gene DEFA5 onde (a) mostra a parte da região promotor e exon1, incluindo a região 5'UTR e (b) mostra a região de codificação e a região 3'UTR do exon 2.

Numa segunda modalidade preferida, o processo (2) de PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido sequenciamento dos genes DEFA1 e DEFA3. A PCR-RFLP compreende: a construção de primers para PCR de duas regiões (primeira região exon 1 e segunda região exons 2 e 3) que permitem a posterior ação de enzimas de restrição capazes de diferenciar os genes por RFLP. Os primers utilizados na primeira PCR para amplificação dos genes DEFA1_3 (Figura 2) são: o Primer F exon 1 (ACCCAAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1 (GCAAAACCTACATGGCCGAA) para amplificação do exon 1; para amplificação dos exon 2_3 o Primer F exons2_3 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e o Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC). A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não se restringindo apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 60°C por 30seg e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72°C por 5 min. A Figura 3 descreve a validação de primers para PCR dos genes DEFA1 e DEFA3. Região do exon 1 com 1768pb e região dos exons 2 e 3 com 1000bp.

Após a primeira PCR é realizada a distinção seletiva dos genes DEFA1 e DEFA3 por enzimas de restrição como segue: os primers construídos amplificam duas regiões dos gene DEFA1-3 por PCR uma contendo o exon 1 (1003 a 1010pb) e outra contendo os exons 2 e 3 (1.760 a 1.768pb) que dentro de suas sequências nucleotídicas apresentam os sítios de clivagem enzimática específicos para cada gene; o DEFA1 possui na região do exon 1 um sítio para enzima Bstc8I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (716pb e 288pb), e dentro da região dos exons 2 e 3 um sítio de clivagem para a enzima HaeI que também cliva a região resultando em dois fragmentos

(72 pb e 846), desta forma, apenas o gene DEFA3 permanece integro. Já o gene DEFA3 possui dentro da região do exon 1 um sítio de clivagem para a enzima Eco81I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (116 pb e 880), e dentro da região dos exons 2 e 3 dois sítios de clivagem para a enzima Taal que cliva a região resultando em
5 três fragmentos (1.315pb, 289pb e 76pb), desta forma, apenas o gene DEFA1 permanece integro.

Após a primeira PCR dos genes DEFA1_3 a distinção seletiva do gene DEFA1 se dá pela digestão enzimática do gene DEFA3 da seguinte forma: um volume desejado da primeira PCR é digerido pelas enzimas Eco81I 5U/ μ L e Taal 10U/ μ L em concentrações
10 desejadas, acrescido de H₂O destilada. Incubado com a as enzimas em condições desejadas.

A distinção seletiva do gene DEF3 se dá pela digestão enzimática do gene DEFA1 da seguinte forma: um volume desejado da primeira PCR dos genes DEFA1-3 é digerido pelas enzimas HaeI 5U/ μ L e BstC8I 10U/ μ L em concentrações desejadas acrescido de
15 H₂O destilada. Incubado com a as enzimas em condições desejadas.

Após a digestão enzimática dos genes o produto desta digestão, em volume desejado, é separado por corrida eletroforética em gel de agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA do gene de interesse.

Após a separação do produto da digestão o gel é visualizado em equipamento
20 adequado apresentando três bandas sendo duas (716 pb e 288 pb) resultantes da digestão enzimática (Bstc8I) da região do exon 1 do gene DEFA1 e uma banda da região do exon 1 do gene DEFA3 com 1.003 a 1.010pb que não foi digerida. Para a região compreendendo os exon 2 e 3 são apresentadas três bandas sendo duas (72 pb e 846 pb) resultantes da digestão enzimática (HaeI) da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA1
25 e uma banda da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA3 com 1.760 a 1.764 pb que não foi digerido. Ainda, são apresentadas três bandas sendo duas (116 pb e 880) resultantes da digestão enzimática (Eco81I) da região do exon 1 do gene DEFA3 e uma banda da região do exon 1 do gene DEFA1 com 1.003 a 1.010pb que não foi digerido. Para a região compreendendo os exon 2 e 3 são apresentadas quatro bandas sendo

três (1.315 pb, 289 pb e 76 pb) resultantes da digestão enzimática (Taal) da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA3 e uma banda da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA1 com 1.760 a 1.764 pb que não foi digerido.

A extração do DNA do gene de interesse que permaneceu inteiro e agora
5 distinto é retirado do gel e purificado por metodologia desejada.

Após a obtenção dos genes DEFA1 e DEFA3 distintos é realizada uma segunda PCR agora de cada exon constituinte de cada gene (Figura 4); para o exon 1 são utilizados os mesmos primers da primeira PCR, já para os exon 2 e 3 são utilizados novos primers construídos para a presente invenção: Primer F exon 2
10 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e Primer R exon 2 (TCAATGCCCAGAGATTCTAAG) para o exon 2 e Primer F exon 3 (CCCGAGATTCTTTTCTTAC) e Primer R 3 (AGAAAATGAGGCAGGGTGAAA) para o exon 3. A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não se restringindo apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por
15 30seg e extensão a 72 °C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5 min. A Figura 4 descreve a validação de primers para PCR dos genes DEFA1 e DEFA3. O exon 1 com 1.000 pb, exon 2 com 443pb e exon 3 com 521pb.

Após a segunda PCR para os genes DEFA1 e DEFA3 as sequências de nucleotídeos correspondentes aos exons 1, 2 e 3 de cada um destes genes são
20 purificadas num volume desejado por tratamento com as enzimas ExoI 10U/μL (0.7μL) e Sap 1U/μL (0.18μL) acrescido de 1.12μL de H₂O destilada, mas que não se restringem apenas a estas condições. Em seguida, é realizada a incubação a 37° por 15min e inativação enzimática a 80 °C por 15 min, podendo-se variar também estas condições de temperatura e de tempo. Após a purificação é realizada uma eletroforese em gel
25 agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA dos genes de interesse.

O RFLP-PCR compreende: a distinção seletiva dos genes DEFA1 e DEFA3 por enzimas de restrição seguido da amplificação, separadamente, do gene DEFA1 ou DEFA3 como segue: Primeiramente uma concentração desejada do DNA genômico é

digerida previamente a PCR, neste caso, a sequencia que apresentar o sítio de restrição é clivada e não é amplificada e a que não apresentar o sítio de restrição é amplificado.

O gene DEFA3 possui dentro da região do exon 1 (1003 a 1010pb) um sítio de clivagem para a enzima Eco81I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (116 pb e 880), e dentro da região dos exons 2 e 3 (1.760 a 1.764pb) dois sítios de clivagem para a enzima Taal que cliva a região resultando em três fragmentos (1.315pb, 289pb e 76pb), desta forma, apenas o gene DEFA1 permanece integro. A digestão pelas enzimas se dá da seguinte forma: a uma concentração desejada do DNA genômico é adicionada a enzima Eco81I 5U/ μ L ou a enzima Taal 10U/ μ L em concentrações desejadas, acrescido de H₂O destilada e incubado em condições desejadas.

O gene DEFA1 possui dentro da região do exon 1 (1003 a 1010pb) um sítio de clivagem para a enzima Bstc8I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (716pb e 288pb), e dentro da região dos exons 2 e 3 (1.760 a 1.764pb) dois sítios de clivagem para a enzima Hael que cliva a região resultando em dois fragmentos (72 pb e 846), desta forma, apenas o gene DEFA3 permanece integro. A digestão pelas enzimas se dá da seguinte forma: a uma concentração desejada do DNA genômico é adicionada a enzima Bstc8I 5U/ μ L ou a enzima Hael 10U/ μ L em concentrações desejadas, acrescido de H₂O destilada e incubado em condições desejadas.

Após a digestão enzimática do DNA genômico e agora com os genes DEFA1 e DEFA3 já distintos é realizada a primeira PCR que resulta na amplificação apenas do gene que não foi digerido. Os primers utilizados na primeira PCR para amplificação dos genes DEFA1_3 são: para amplificação da região do exon 1 o Primer F exon 1(ACCCAAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1(GCAAAACCTACATGGCCGAA); para amplificação da região dos exons 2_3 o Primer F exons2_3 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e o Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC). A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não restringindo-se apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação

a 95 °C por 30seg, anelamento a 60°C por 30seg e extensão a 72 °C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5 min.

Após a primeira PCR as sequências de nucleotídeos correspondentes a região do exon 1 e região dos exons 2_3 de cada um dos genes DEFA1 e DEFA3 são purificadas num volume desejado por tratamento com as enzimas ExoI 10U/μL (0.7μL) e Sap 1U/μL (0.18μL) acrescido de 1.12μL de H₂O destilada, mas que não se restringem apenas a estas condições. Em seguida, é realizada a incubação a 37 °C por 15min e inativação enzimática a 80 °C por 15 min, podendo-se variar também estas condições de temperatura e de tempo. Após a purificação é realizada uma eletroforese em gel agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA dos genes de interesse.

Após a purificação do produto da primeira PCR é realizada uma segunda PCR agora de cada exon constituinte do genes DEFA1 e DEFA3; para o exon 1 são utilizados os mesmos primers da primeira PCR, já para os exon 2 e 3 são utilizados novos primers construídos para a presente invenção: Primer F exon 2 (TGTAATGCACACCTCTCT) e Primer R exon 2 (TCAATGCCAGAGATTCTAAG) para o exon 2 e Primer F exon 3(CCCCGAGATTCTTTTCTTAC) e Primer R 3 (AGAAAATGAGGCAGGGTGAAA) para o exon 3. A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não se restringindo apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 60°C por 30seg e extensão a 72 °C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5 min.

Após a segunda PCR para os genes DEFA1 e DEFA3 as sequências de nucleotídeos correspondentes aos exons 1, 2 e 3 de cada um destes genes são purificadas num volume desejado por tratamento com as enzimas ExoI 10U/μL (0.7μL) e Sap 1U/μL (0.18μL) acrescido de 1.12μL de H₂O destilada, mas que não se restringem apenas a estas condições. Em seguida, é realizada a incubação a 37 °C por 15min e inativação enzimática a 80 °C por 15 min, podendo-se variar também estas condições de temperatura e de tempo. Após a purificação é realizada uma eletroforese em gel

agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA dos genes de interesse.

O sequenciamento dos genes DEFA1 e DEFA3, após a PCR-RFLP ou RFLP-PCR, é realizado por uma terceira PCR utilizando os mesmos primers da segunda PCR. A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não se restringindo apenas a estas condições: 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20seg; anelamento a 50 °C para o Primer F exon1 e 55 °C para o Primer R exon1, a 60 °C para o Primer F exon 2 e 60 °C para o Primer R exon 2 e, anelamento a 60 °C para o Primer F exon3 e 60 °C para o Primer R exon3 por 30seg; a extensão a 60 °C por 1 min, podendo-se variar estas condições.

Após a realização da terceira PCR é realizada a purificação das sequências de nucleotídeos correspondentes aos exons 1, 2 e 3 específicos dos genes DEFA1 ou DEFA3 por adição de um volume desejado de acetato de sódio e um volume desejado do produto da segunda PCR seguida de uma centrifugação para precipitação do DNA. Em seguida é adicionado um volume desejado de etanol e centrifugado para obtenção do precipitado. O sobrenadante é descartado e adicionado novamente etanol em uma concentração desejada seguida de ciclos de centrifugação para obtenção da precipitação do DNA. O DNA é então incubado por um período desejado em tampão apropriado e posteriormente, é realizado o sequenciamento do gene para identificação dos polimorfismos.

Numa terceira modalidade preferida o processo de PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido por PCR em tempo real (genes DEFA1 e DEFA3). A PCR-RFLP compreende: a construção de primers para PCR de duas regiões (primeira região exon 1 e segunda região exons 2 e 3) que permitem a posterior ação de enzimas de restrição capazes de diferenciar os genes por RFLP. Os primers utilizados na primeira PCR para amplificação dos genes DEFA1_3 são: o Primer F exon 1(ACCCAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1(GCAAAACCTACATGGCCGAA) para amplificação do exon 1; para amplificação dos exon 2_3 o Primer F exons2_3 (TGTAATGCACACCTCTCT) e o Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC). A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não se restringindo apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2min a 95 °C,

seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5 min.

Após a primeira PCR é realizada a distinção seletiva dos genes DEFA1 e DEFA3 por enzimas de restrição como segue: os primers construídos amplificam duas regiões dos gene DEFA1-3 por PCR uma contendo o exon 1 (1003 a 1010pb) e outra contendo os exons 2 e 3 (1.760 a 1.764pb) que dentro de suas sequências nucleotídicas apresentam os sítios de clivagem enzimática específicos para cada gene; o DEFA1 possui na região do exon 1 um sítio para enzima Bstc8I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (716pb e 288pb), e dentro da região dos exons 2 e 3 um sítio de clivagem para a enzima HaeI que também cliva a região resultando em dois fragmentos (72 pb e 846), desta forma, apenas o gene DEFA3 permanece integro. Já o gene DEFA3 possui dentro da região do exon 1 um sítio de clivagem para a enzima Eco81I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (116 pb e 880), e dentro da região dos exons 2 e 3 dois sítios de clivagem para a enzima Taal que cliva a região resultando em três fragmentos (1.315pb, 289pb e 76pb), desta forma, apenas o gene DEFA1 permanece integro.

Após a primeira PCR dos genes DEFA1_3 a distinção seletiva do gene DEFA1 se dá pela digestão enzimática do gene DEFA3 da seguinte forma: um volume desejado da primeira PCR é digerido pelas enzimas Eco81I 5U/μL e Taal 10U/μL em concentrações desejadas, acrescido de H₂O destilada. Incubado com a as enzimas em condições desejadas.

A distinção seletiva do gene DEF3 se dá pela digestão enzimática do gene DEFA1 da seguinte forma: um volume desejado da primeira PCR dos genes DEFA1-3 é digerido pelas enzimas HaeI 5U/μL e BstC8I 10U/μL em concentrações desejadas acrescido de H₂O destilada. Incubado com a as enzimas em condições desejadas.

Após a digestão enzimática dos genes o produto desta digestão, em volume desejado, é separado por corrida eletroforética em gel de agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA do gene de interesse.

Após a separação do produto da digestão o gel é visualizado em equipamento adequado apresentando três bandas sendo duas (716 pb e 288 pb) resultantes da digestão enzimática (Bstc8I) da região do exon 1 do gene DEFA1 e uma banda da região do exon 1 do gene DEFA3 com 1.003 a 1.010pb que não foi digerida. Para a região compreendendo os exon 2 e 3 são apresentadas três bandas sendo duas (72 pb e 846 pb) resultantes da digestão enzimática (HaeI) da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA1 e uma banda da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA3 com 1.760 a 1.764 pb que não foi digerido. Ainda, são apresentadas três bandas sendo duas (116 pb e 880) resultantes da digestão enzimática (Eco81I) da região do exon 1 do gene DEFA3 e uma banda da região do exon 1 do gene DEFA1 com 1.003 a 1.010pb que não foi digerido. Para a região compreendendo os exon 2 e 3 são apresentadas quatro bandas sendo três (1.315 pb, 289 pb e 76 pb) resultantes da digestão enzimática (Taal) da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA3 e uma banda da região dos exons 2 e 3 do gene DEFA1 com 1.760 a 1.764 pb que não foi digerido.

A extração do DNA do gene de interesse que permaneceu integro e agora distinto é retirado do gel e purificado por metodologia desejada.

O RFLP-PCR compreende: a distinção seletiva dos genes DEFA1 e DEFA3 por enzimas de restrição seguido da amplificação, separadamente, do gene DEFA1 ou DEFA3 como segue: Primeiramente uma concentração desejada do DNA genômico é digerida previamente a PCR, neste caso, a sequencia que apresentar o sítio de restrição é clivada e não é amplificada e a que não apresentar o sítio de restrição é amplificado.

O gene DEFA3 possui dentro da região do exon 1 (1003 a 1010pb) um sítio de clivagem para a enzima Eco81I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (116 pb e 880), e dentro da região dos exons 2 e 3 (1.760 a 1.764pb) dois sítios de clivagem para a enzima Taal que cliva a região resultando em três fragmentos (1.315pb, 289pb e 76pb), desta forma, apenas o gene DEFA1 permanece integro. A digestão pelas enzimas se dá da seguinte forma: a uma concentração desejada do DNA genômico é adicionada a enzima Eco81I 5U/μL ou a enzima Taal 10U/μL em

concentrações desejadas, acrescido de H₂O destilada e incubado em condições desejadas.

O gene DEFA1 possui dentro da região do exon 1 (1003 a 1010pb) um sítio de clivagem para a enzima Bstc8I que cliva esta região resultando em dois fragmentos (716pb e 288pb), e dentro da região dos exons 2 e 3 (1.760 a 1.764pb) dois sítios de clivagem para a enzima HaeI que cliva a região resultando em dois fragmentos (72 pb e 846), desta forma, apenas o gene DEFA3 permanece integro. A digestão pelas enzimas se dá da seguinte forma: a uma concentração desejada do DNA genômico é adicionada a enzima Bstc8I 5U/μL ou a enzima HaeI 10U/μL em concentrações desejadas, acrescido de H₂O destilada e incubado em condições desejadas.

Após a digestão enzimática do DNA genômico e agora com os genes DEFA1 e DEFA3 já distintos é realizada a primeira PCR que resulta na amplificação apenas do gene que não foi digerido. Os primers utilizados na primeira PCR para amplificação dos genes DEFA1_3 são: para amplificação da região do exon 1 o Primer F exon 1 (ACCCAAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1 (GCAAAACCTACATGGCCGAA); para amplificação da região dos exons 2_3 o Primer F exons2_3 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e o Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC). A PCR se dá nas seguintes condições, porém, não restringindo-se apenas a estas condições: desnaturação inicial por 2min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. A etapa de extensão final realizada a 72 °C por 5 min.

Após a primeira PCR as sequências de nucleotídeos correspondentes a região do exon 1 e região dos exons 2_3 de cada um dos genes DEFA1 e DEFA3 são purificadas num volume desejado por tratamento com as enzimas ExoI 10U/μL (0.7μL) e Sap 1U/μL (0.18μL) acrescido de 1.12μL de H₂O destilada, mas que não se restringem apenas a estas condições. Em seguida, é realizada a incubação a 37° por 15min e inativação enzimática a 80 °C por 15 min, podendo-se variar também estas condições de temperatura e de tempo. Após a purificação é realizada uma eletroforese em gel

agarose ou outros métodos de eletroforese que viabilizem a visualização do DNA dos genes de interesse.

Após a purificação dos genes DEFA1 e DEFA3 já distintos é realizada a PCR em tempo real, para quantificação do número de cópias dos genes DEFA1 e DEFA3, que compreende: a amplificação dos exons 1, 2 e 3 dos genes DEFA1 e DEFA3; para o exon 1 são utilizados os mesmos primers da primeira PCR, já para os exon 2 e 3 são utilizados novos primers construídos para a presente invenção: Primer F exon 2 (TGTAATGACACCTCCTCT) e Primer R exon 2 (TCAATGCCCAGAGATTCTAAG) para o exon 2 e Primer F exon 3 (CCCGAGATTCTTTTCTTAC) e Primer R 3 (AGAAAATGAGGCAGGGTGAAA) para o exon 3. A amplificação dos genes DEFA1 ou DEFA3, já distintos pelo PCR-RFLP ou RFLP-PCR é realizada com o Termociclador e com os reagentes desejados como segue: a amplificação é realizada com uma concentração de DNA e primers desejada, e volume de reagentes desejados. Os parâmetros para a PCR em tempo real, mas que não se restringem a estes parâmetros é: um ciclo a 95 °C por 3 min e 40 ciclos a 95 °C por 30 s e 54 °C por 30 s seguido de um ciclo a 95 °C por 1 min e pelo início de uma curva de fusão a 55 °C e aumento de 0,5 °C por 80 repetições. A leitura da fluorescência e análise dos ciclos de amplificação é realizada em equipamento desejado.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo na forma de sistema para identificação de polimorfismos nos genes DEFA1, DEFA3 e DEFA5, caracterizado por permitir o prognóstico de câncer.
- 5 2. Processo na forma de utilização da PCR e seqüenciamento, caracterizado por permitir a identificação de polimorfismos no gene DEFA5.
3. Processo na forma de utilização da PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido de seqüenciamento, caracterizado por permitir identificação de polimorfismos nos genes DEFA1 e DEFA3.
- 10 4. Processo na forma de utilização da PCR-RFLP ou RFLP-PCR seguido por PCR em tempo real, caracterizado por permitir a identificação de polimorfismos na variação do número de cópias nos genes DEFA1 e DEFA3.
5. Produto na forma de primers conforme a reivindicação 1 pelo fato de promoverem a amplificação e distinção dos genes DEFA1, DEFA3 e DEFA5.
- 15 6. Produto na forma de primer F exon1 (CCAGCAGAGCTATAAATCCA) e Primer R exon 1 (TCACTCAAGTGAGGTAGACC) conforme a reivindicação 2 pelo fato de promoverem a amplificação do exon 1 pertencente ao gene DEFA5.
- 20 7. Produto na forma de Primer F exon 2 (AGACTATCTCAGTTAGTCTGG) e Primer R exon2 (GGAACCATACAAACCACCATA) conforme a reivindicação 2 pelo fato de promoverem a amplificação do exon 2 pertencente ao gene DEFA5.
- 25 8. Produto na forma de Primer F exon 1(ACCCAAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1(GCAAAACCTACATGGCCGAA) conforme a reivindicação 3 pelo fato de promoverem a amplificação da região que contem o exon 1 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .
- 30 9. Produto na forma de Primer F exons 2_3 (TGTAATATGCACACCTCCTCT) e Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC) conforme a reivindicação 3 pelo fato de promoverem a amplificação da região que contem os exons 2 e 3 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .
10. Produto na forma de Primer F exon 2 (TGTAATATGCACACCTCCTCT) e Primer R exon 2 (TCAATGCCAGAGATTCTAAG) conforme a reivindicação 3

pelo fato de promoverem a amplificação do exon 2 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .

- 5 11. Produto na forma de Primer F exon 3(CCCCGAGATTCTTTTCTTAC) e Primer R 3 (AGAAAATGAGGCAGGGTGAAA) conforme a reivindicação 3 pelo fato de promoverem a amplificação do exon 3 dos genes DEFA1 e DEFA3.
12. Produto na forma de Primer F exon 1(ACCCAAAAATGTCTGTTCCAC) e Primer R exon1(GCAAAACCTACATGGCCGAA) conforme a reivindicação 4 pelo fato de promoverem a amplificação da região que contem o exon 1 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .
- 10 13. Produto na forma de Primer F exons 2_3 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e Primer R exons 2_3 (AGGGTAACACAAGAGAGTGC) conforme a reivindicação 4 pelo fato de promoverem a amplificação da região que contem os exons 2 e 3 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .
- 15 14. Produto na forma de Primer F exon 2 (TGTAATGCACACCTCCTCT) e Primer R exon 2 (TCAATGCCCAGAGATTCTAAG) conforme a reivindicação 4 pelo fato de promoverem a amplificação do exon 2 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3 .
- 20 15. Produto na forma de Primer F exon 3 (CCCGAGATTCTTTTCTTAC) e Primer R 3 (AGAAAATGAGGCAGGGTGAAA) conforme a reivindicação 4 pelo fato de promoverem a amplificação do exon 3 pertencente aos genes DEFA1 e DEFA3.

1 / 4

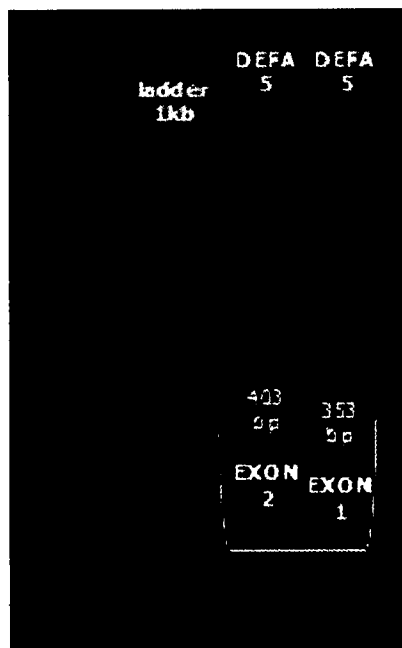
Figura 1

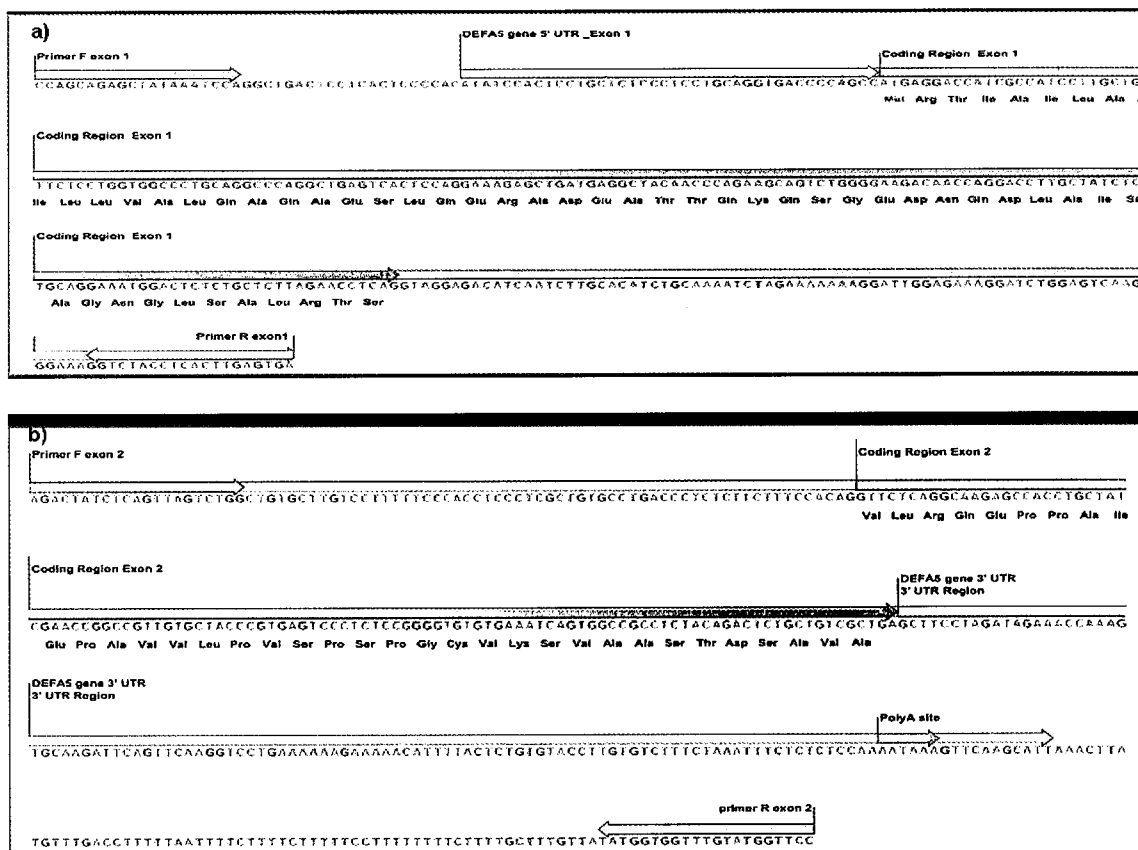
Figura 2

Figura 3

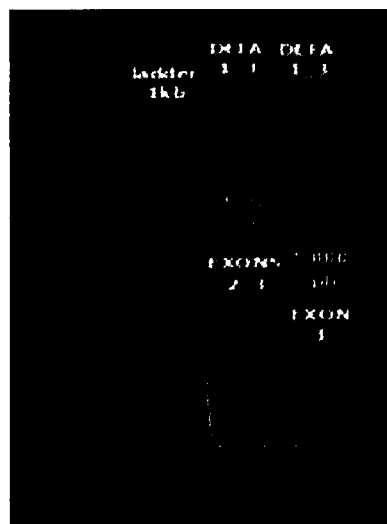
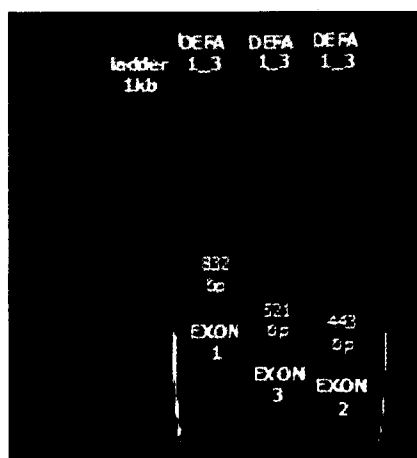


Figura 4



**METODOLOGIA PARA DISTINÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
DAS ALFAS DEFENSINAS HUMANAS DEFA5, DEFA1 E DEFA3**

RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo para detecção de polimorfismos
5 genéticos dos genes DEFA5, DEFA1 e DEFA3 humanos, que visa o diagnóstico do
câncer, a identificação da predisposição de humanos desenvolverem câncer, e também
permite a detecção de infecções patogênicas.