

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA – CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Uso da Farmacogenética cardiovascular na análise e prevenção de doenças cardiovasculares e classificação em haplogrupos pelo cromossomo Y e DNA mitocondrial”

Danilo Faustino Braganholi

Araraquara
2011

DANILO FAUSTINO BRAGANHOLI

Uso da Farmacogenética cardiovascular na análise e prevenção de doenças cardiovasculares e classificação em haplogrupos pelo cromossomo Y e DNA mitocondrial

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara
2011

DANILO FAUSTINO BRAGANHOLI

Uso da Farmacogenética cardiovascular na análise e prevenção de doenças cardiovasculares e classificação em haplogrupos pelo cromossomo Y e DNA mitocondrial

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Araraquara, ___ de dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli (orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof.(a) Dr.(a)

Prof.(a) Dr.(a)

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, amiga e companheira Lis, que com amor e alegria torna minha vida e a de quem esta a seu redor mais leve e prazerosa a cada dia.

Aos meus pais Antonio e Vera, e a minha irmã Daniele, por tudo de melhor que sempre fizeram e por me proporcionarem uma base repleta dos sentimentos mais sublimes.

Ao Tite, Rute, Lílian, Cris e Fabrício, por todo apoio, atenção e por fazerem parte da minha família.

À professora Regina, pelo auxílio, confiança, amizade e a disposição de sempre ensinar.

À Raquel, Naiara e Greiciane, pela amizade, troca de informações e auxílio direto para realização deste trabalho.

A todos os amigos dos laboratórios de Paternidade e Imunologia pela amizade e companhia.

Ao Dr. José Caracciolo, pelo apoio e participação e também a todos os indivíduos que foram prestativos ao doarem suas amostras para este estudo.

A Deus, por mais esta oportunidade, onde posso desfrutar de momentos de grande aprendizado com estas pessoas tão especiais.

“Cada um de nós compõe a sua história, cada ser
em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz”.

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

Morte súbita cardíaca (MSC) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, afetando cerca de 335 mil pessoas por ano nos EUA e aproximadamente 712 pessoas por dia no Brasil, predominantemente na faixa etária mais produtiva. Principalmente em jovens, as causas são desordens cardíacas com anormalidades estruturais e arritmogênicas de origens genéticas; além disso, alguns medicamentos podem influenciar na susceptibilidade a MSC ou a doenças cardiovasculares. Como a morte pode ocorrer num período máximo de uma hora após o início dos sintomas e não ser decorrente de trauma ou violência, o diagnóstico da causa de morte pode ser dificultado. A análise genética nestes casos é muito útil para ajudar a identificá-la e informar aos parentes próximos sobre um possível fator genético de risco pré-existente.

Este trabalho propôs padronizar as reações de PCR e SNaPshot em *multiplex* para analisar 11 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) relacionados à MSC (NEWTON-CHEH et al. 2009) em grupos de familiares brasileiros com histórico de insuficiência cardíaca para uma futura utilização na Genética Forense e Médica, entretanto, o multiplex contendo 8 SNPs mostrou ser mais eficiente. Para tanto, amostras foram coletadas de indivíduos com histórico familiar de: coronariopatia, cardiomiopatia hipertrófica ou familiar próximo que sofreu ataque cardíaco e, indivíduos sem este histórico utilizados como controles.

As análises não apresentaram diferenças significativas entre o grupo de indivíduos com histórico e controle, mas, os dados são compatíveis com as frequências conhecidas dos SNPs.

Também identificou-se um provável fator hereditário para o SNP rs4725982 em uma das famílias.

Palavras-chave: Morte súbita cardíaca. SNP. SNaPshot. Autópsia molecular

ABSTRACT

Sudden cardiac death (SCD) is a major public health problems worldwide, affeting about 335,000 people per year in the U.S. and approximately 712 people per day in Brazil, predominantly in the most productive age group.

Especially in young people, the causes are structural abnormalities of cardiac disorders and genetic origins of arrhythmogenic, in addition, some medications may influence susceptibility to SCD or cardiovascular disease. As death can occur whitin a maximum of one hour after onset of symptoms and not be due to trauma or violence, the diagnosis of the cause of the death can be difficult. Genetic analysis in these cases is very useful to help identify them and inform close relatives about a possible genetic risk factor pre-existing.

This work proposed to standardize the PCR and SNaPshot multiplex to analyze 11 SNPs (single nucleotide polymorphisms) related to the SCD (NEWTON-CHEH et al. 2009) in Brazilian familial groups with a history of heart failure for future use in Forensic Genetics and Medical. For this, samples were collected from individuals with a family history of heart disease, hypertrophic cardiomyophathy or close relative who suffered a heart attack, and individuals without this history used as controls.

The analysis showed no siginificant differences between the group of the individuals with a history and control, but the data are compatible with the frequencies of known SNPs.

It also identified a probable hereditary factor for the SNP rs4725982 in one of the studied families.

Keywords: Sudden cardiac death. SNP. SnaPshot. Molecular autopsy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema mostrando os efeitos gerados por variações no intervalo QT causadas por uma repolarização ventricular anormal. 18
- Figura 2: Genoma do DNA mitocondrial com as regiões codificadora e não codificadora. 23
- Figura 3: Esquema identificando a utilização dos SNPs autossômicos relacionados à MSC. 26
- Figura 4: Heredograma da família 1. Os indivíduos marcados em vermelho são os que estão sendo analisados neste estudo. 27
- Figura 5: Relação dos pares de iniciadores gerados pelo programa PerlPrimer versão 1.1.19 em ordem decrescente de qualidade. 43
- Figura 6: Dados gerados pelo programa PerlPrimer versão 1.1.19 do par de iniciadores selecionado para a reação de amplificação do fragmento do gene KCNH2 que compreende o SNP rs2968864. 44
- Figura 7: Análise de formação de dímeros de todos os pares de iniciadores da reação de PCR em conjunto no programa Autodimer versão 1. 45
- Figura 8: Análise dos iniciadores da reação de PCR do fragmento do gene KCNE1 que compreende o SNP rs1805128 na ferramenta *online* PCR *in-silico*. 46
- Figura 9: Análise em conjunto dos 11 iniciadores utilizados na reação de SNaPshot em *multiplex*. 47

| | |
|---|----|
| Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata dos produtos de PCR realizados com os pares de iniciadores separadamente. | 48 |
| Figura 11: Eletroferograma da reação de SNaPshot para o SNP rs16857031. | 49 |
| Figura 12: Eletroferograma da reação de SNaPshot buscando a análise dos 11 SNPs em sistema <i>multiplex</i> . | 50 |
| Figura 13: Eletroferograma da reação de SNaPshot onde foram analisados 8 SNPs em sistema <i>multiplex</i> . | 51 |
| Figura 14: Eletroferograma da reação de SNaPshot usada como controle negativo. | 51 |
| Figura 15: Ocorrência dos 8 SNPs (independente se em homo ou heterozigose) nas amostras de indivíduos das famílias com histórico e controles. | 54 |
| Figura 16: Eletroferograma da reação de SNPshot realizada com amostra MPV. | 55 |
| Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% de reações de PCR. | 57 |
| Figura 18: Alinhamento das sequências obtidas por sequenciamento das regiões HV1 e HV2 do DNA mt. | 58 |
| Figura 19: Árvore filogenética do cromossomo Y. | 59 |
| Figura 20: Eletroferograma da reação de SNaPshot com 9 SNPs do <i>multiplex</i> I. | 61 |
| Figura 21: Eletroferograma da reação de SNaPshot para os 5 SNPs do <i>multiplex</i> II. | 61 |

Figura 22: Freqüência dos haplogrupos pelo cromossomo Y nas famílias analisadas. 63

Figura 23: Heredograma da família 8. Em vermelho, indivíduos analisados neste projeto com seus respectivos alelos para o SNP rs4725982. 64

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Causas mais freqüentes de MSC em adultos. | 17 |
| Tabela 2: Localização nos cromossomos e respectivos genes dos 11 SNPs relacionadas com intervalo QT selecionados para este projeto. | 29 |
| Tabela 3: Pares de iniciadores utilizados na reação de PCR com volumes e concentrações para os respectivos polimorfismos. | 31 |
| Tabela 4: Pares de iniciadores utilizados na reação de SNaPshot com volumes e concentrações para os respectivos polimorfismos. | 32 |
| Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de PCR do DNA mt. | 35 |
| Tabela 6: Sequência dos iniciadores para PCR do <i>Multiplex I</i> . | 38 |
| Tabela 7: Sequência dos iniciadores para PCR do <i>Multiplex II</i> . | 39 |
| Tabela 8: Sequência e concentração dos <i>primers</i> para SNaPshot do <i>Multiplex I</i> . | 41 |
| Tabela 9: Sequência e concentração dos <i>primers</i> para SNaPshot do <i>Multiplex II</i> . | 41 |
| Tabela 10: Alelos ancestrais e derivados de cada polimorfismo respectivo. | 52 |
| Tabela 11: Ocorrência dos SNPs e seus respectivos alelos nos grupos com histórico e controle. | 53 |
| Tabela 12: Classificação dos indivíduos das famílias em haplogrupos pelo cromossomo Y. | 62 |

Tabela 13: Freqüência dos alelos do SNP rs4725982 em europeus, asiáticos e africanos (sub-saarianos). 64

Tabela 14: Freqüência dos SNPs rs1805128, rs2074238, rs2074518 e rs29968864 em europeus, asiáticos, africanos e afro-americanos. 65

Tabela 15: Freqüência dos SNPs rs12053903, rs12576239, e rs16857031 em europeus, asiáticos, africanos e afro-americanos. 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| MSC | Morte súbita cardíaca |
| ECG | Eletrocardiograma |
| MSI | Morte súbita inexplicável |
| SMSI | Síndrome da morte súbita infantil |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| Mt | Mitochondrial |
| YCC | Y-Chromosome Consortium |
| SAP | Shrimp Alkaline Phosphatase |
| EC | eletroforese capilar |
| TA | temperatura ambiente |
| RPM | rotações por minuto |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| q.s.p. | quantidade suficiente para |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 16 |
| 1.1. Morte súbita cardíaca | 16 |
| 1.2. Análise genética pós-morte (autópsia molecular) | 19 |
| 1.3. Farmacogenética e SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>) | 20 |
| 1.4. DNA mitocondrial | 21 |
| 1.5. Cromossomo Y | 24 |
| 2. Justificativa do projeto | 25 |
| 3. Objetivos | 27 |
| 4. Metodologia | 27 |
| 4.1. Coleta das amostras biológicas | 27 |
| 4.2. Extrações de DNA | 28 |
| 4.2.1. Amostras de sangue | 28 |
| 4.2.2. Amostras de ossos e dente | 28 |
| 4.3. Análises dos SNPs relacionados à MSC | 29 |
| 4.3.1. Seleção dos SNPs e desenho dos iniciadores (<i>primers</i>) | 29 |
| 4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 30 |
| 4.3.3. Purificação do produto de PCR | 31 |
| 4.3.4. Reação de SNaPshot | 32 |
| 4.3.5. Purificação do produto da reação de SNaPshot | 33 |
| 4.3.6. Eletroforese Capilar | 33 |
| 4.3.7. Análise das reações de SNaPshot | 34 |
| 4.4. Classificação das amostras de ossos e dente em haplogrupos pelo DNA mitocondrial | 34 |
| 4.4.1. Reação de PCR | 34 |
| 4.4.2. Purificação da reação de PCR | 35 |
| 4.4.3. Reação de sequenciamento | 35 |
| 4.4.4. Purificação da reação de sequenciamento | 36 |
| 4.4.5. Eletroforese Capilar | 36 |
| 4.4.6. Análise das sequências e classificação em haplogrupos | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.5. Classificação das amostras de sangue em haplogrupos pelo cromossomo Y | 37 |
| 4.5.1. Reação de PCR | 37 |
| 4.5.2. Purificação do produto da reação de PCR | 39 |
| 4.5.3. Reação de SNaPshot | 39 |
| 4.5.4. Purificação do produto da reação de SNaPshot | 41 |
| 4.5.5. Eletroforese Capilar | 42 |
| 4.5.6. Análise das reações de SNaPshot | 42 |
| 5. Resultados e Discussão | 42 |
| 5.1. Análise dos SNPs relacionados à MSC | 42 |
| 5.1.1. Desenho dos iniciadores das reações de PCR e SNaPshot | 42 |
| 5.1.2. Padronização das reações de PCR e SNaPshot <i>in vitro</i> | 48 |
| 5.1.3. Análise das amostras de sangue e comparação entre as famílias com histórico e o grupo controle | 51 |
| 5.1.4. Análise das amostras de ossos e dente | 55 |
| 5.2. Classificação das amostras de ossos e dente em haplogrupos pelo DNA mitocondrial | 56 |
| 5.3. Classificação de todas as amostras de sangue masculinas utilizadas neste estudo em haplogrupos pelo cromossomo Y | 59 |
| 5.3.1. Análise das amostras | 60 |
| 5.4. Correlação entre os haplogrupos do cromossomo Y dos indivíduos das famílias estudadas e controles e a identificação dos SNPs relacionados à MSC | 63 |
| 5.5. Correlação entre os haplogrupos do DNA mitocondrial das amostras de ossos e dente e a identificação dos SNPs relacionados à MSC | 67 |
| 6. Conclusões | 67 |
| Referências | 68 |

1. Introdução

1.1. Morte Súbita Cardíaca

Morte súbita cardíaca (MSC) é uma das causas de morte mais comuns em diversos países sendo considerada um importante problema de saúde. Estudos indicam que esta seja a causa de aproximadamente 335 mil mortes por ano nos Estados Unidos da América (RODRÍGUEZ-CALVO et al., 2008), chegando a representar 10% do total de mortes anuais na Espanha (LUNA et al., 1997) e responsável por cerca de 60.000 mortes por ano no Reino Unido, sendo a doença cardíaca isquêmica indicada como a causa predominante (NUNN & LAMBIASE, 2011).

MSC é causada pela perda da função cardíaca conceituada como a morte que ocorre em no máximo uma hora após o início dos sintomas, geralmente em poucos minutos, não decorrente de trauma ou violência podendo acometer desde recém-nascidos até adultos (SAAD, acesso em 10 de nov. de 2011).

Mutações nos genes codificadores dos canais iônicos cardíacos (KCNQ1, KCNH2 e KCNE1 do canal de potássio e SCN5A do canal de sódio) podem perturbar o delicado equilíbrio de correntes iônicas que regulam a ação potencial e causar arritmias com risco de vida sem defeitos na estrutura cardíaca. As doenças causadas por anormalidades genéticas que interrompem o componente elétrico da função cardíaca são chamadas de “canalopatias” (CERRONE & PRIORI, 2011).

GRANDMAISON (2006) descreve as patologias cardíacas mais citadas na literatura como causas de morte súbita em adultos (tabela 1):

Tabela 01: Causas mais freqüentes de MSC em adultos.

| Doenças Cardiovasculares |
|------------------------------------|
| Coronariopatia |
| Cardiomiopatia Hipertrófica |
| Cardiomiopatia ventricular direita |
| Cardiomiopatia dilatada |
| Miocardite Linfocítica |
| Prolapso de Valva Mitral |
| Estenose de Valva Aórtica |
| Anormalidade cardíaca congênita |
| Síndrome do QT longo |
| Síndrome de Brugada |
| Síndrome do QT curto |
| Taquicardia Ventricular |

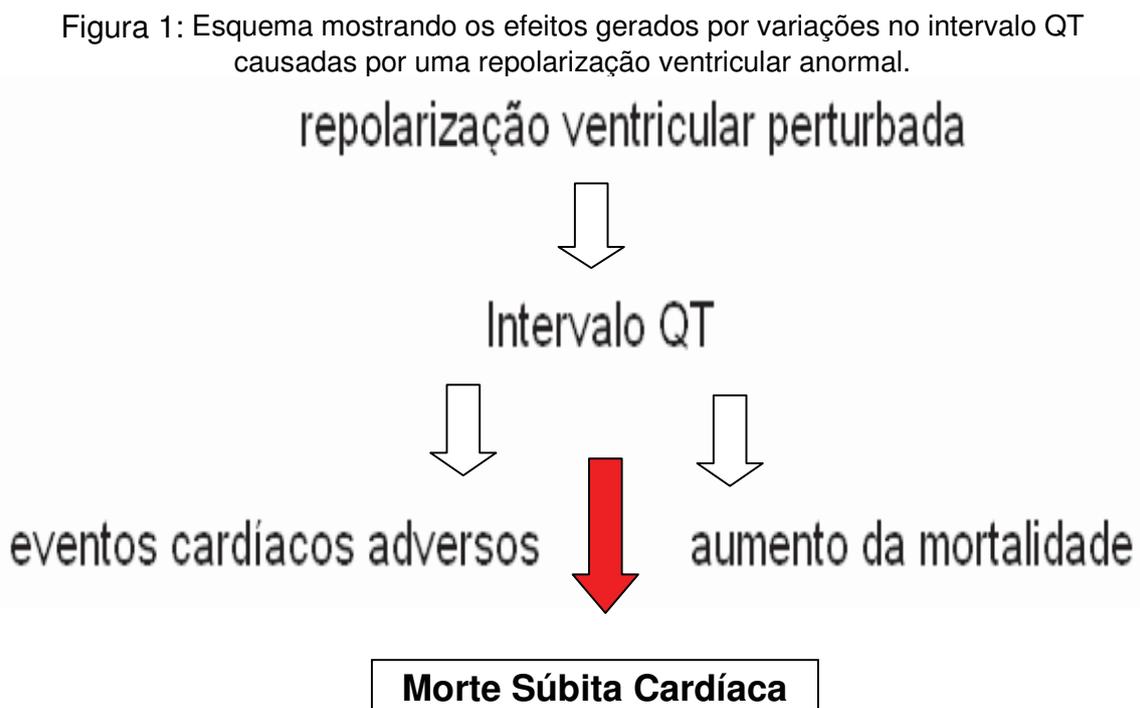
“Canalopatias” cardíacas como Síndrome do QT Longo e Síndrome de Brugada e Cardiomiopatias como Cardiomiopatia Hipertrófica e Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito são diagnosticadas em até metade das famílias afetadas por MSC (WERF et al., 2010).

Estudos de base populacional mostram que um número significativo de mortes súbitas estão associadas à canalopatias hereditárias (TESTER & ACKERMAN, 2006). É reconhecido que defeitos nos genes dos canais iônicos causam distúrbios no ritmo do miócito, anormalidades no eletrocardiograma (ECG) e um risco de morte súbita como a manifestação clínica mais severa, mas nenhuma anormalidade morfológica no coração (MARBAN, 2002).

Há uma lista crescente de arritmias hereditárias e doenças congênitas causadas por mutações em genes que codificam proteínas de canais iônicos com defeito, como as que regem o trânsito na membrana celular dos íons sódio e

potássio. Estes distúrbios em canais iônicos incluem síndrome do QT longo, síndrome do QT curto, síndrome de Brugada e Taquicardia ventricular. Síndrome da morte súbita noturna inexplicada em jovens do Sudeste da Ásia e a síndrome de Brugada são baseados em quadro clínico e perfis genéticos semelhantes. Uma pequena proporção (5-10%) de mortes súbitas infantis também podem estar ligadas a canalopatias (TESTER & ACKERMAN, 2005).

O processo de repolarização ventricular é extremamente importante e bem definido; evidências epidemiológicas mostram que um processo perturbado de repolarização medido como prolongamento do intervalo QT está associado a eventos cardíacos adversos e um aumento da mortalidade (VRTOVEC et al., 2003), conforme esquema a seguir:



Esta repolarização anormal ocorre geralmente sem consequências, mas em situações inesperadas ou de esforço físico como prática de esportes, forte emoção ou estímulos auditivos como o causado por um sinal de despertador que pode gerar uma corrente elétrica cardíaca fora do controle e conseqüentemente, uma potencial disritmia, colocando a vida em risco (TESTER & ACKERMAN, 2009).

1.2. Análise genética pós-morte (autópsia molecular)

Em muitos destes casos a causa de morte pode ser estabelecida devido a anormalidades cardíacas evidentes na autópsia (CHUGH et al., 2000). Porém, a MSC não necessariamente causa anormalidades estruturais no coração e portanto, um número significativo, particularmente em pessoas jovens, a morte permanece inexplicada após uma investigação médico-legal abrangente incluindo autópsia e análises laboratoriais. Talvez, o principal desafio na prática da patologia forense seja identificar a causa de morte, principalmente em pessoas saudáveis e jovens que morrem de forma rápida e inesperada (RODRÍGUEZ-CALVO et al., 2008).

Na rotina de patologia forense, 50% das mortes são consideradas naturais, 5 a 10% são consideradas inexplicáveis após a autópsia geral e 1 a 5% são negativas após a autópsia completa e análises laboratoriais (COHLE & SAMPSON, 2001). O trabalho de PURANIK e colaboradores (2005) cita que grande parte de mortes súbitas envolvendo crianças e jovens adultos não apresentam anormalidades morfológicas identificáveis na autópsia, sendo a MSC rotulada como morte súbita inexplicável (MSI).

Canalopatias potencialmente letais não deixam nenhuma evidência para serem encontradas mesmo em autópsia médico-legal abrangente, onde os patologistas forenses acreditam que uma arritmia fatal pode ser responsável pela MSI (CHUGH et al., 2000; WEVER, 2004). No entanto, uma análise genética pós-morte ou autópsia molecular como também é conhecida atualmente, pode potencialmente substanciar a base patogênica para a MSI.

As causas da MSC diferem conforme a idade. Na população adulta a causa de maior frequência é a Coronariopatia (VIRMANI et al., 2001), em indivíduos com idade inferior a 35 anos, muitas etiologias têm sido mostradas por contribuírem com este problema sendo a maioria de natureza não isquêmica (BASSO et al., 2001). Em crianças com até 1 ano de idade, a principal causa é a síndrome da morte súbita infantil (SMSI), onde a causa da morte permanece sem explicação após análise minuciosa pós-morte. Em crianças com mais de 1 ano e

adolescentes, cardiomiopatia hipertrófica e anomalias congênitas da coronária são causas freqüentes de arritmias letais (RODRÍGUEZ-CALVO et al., 2008).

Causas não isquêmicas de MSC são de grande importância porque muitas vezes incluem doenças genéticas (INGLÊS & SEMSARIAN, 2007); muitos casos, especialmente em jovens, são causados por doenças cardíacas genéticas

É importante ressaltar que estas MSCs apresentam um desafio diagnóstico para os patologistas, pois podem deparar-se com achados mínimos ou até mesmo com um coração morfologicamente normal. O diagnóstico de cardiomiopatias pode ser difícil em virtude da sua variação na expressão fenotípica e no caso de anormalidades arritmogênicas, não há descobertas estruturais para ajudar no diagnóstico (TESTER & ACKERMAN, 2006).

Alguns estudos em grandes populações demonstraram que um histórico de MSC familiar é um fator de risco significativo, portanto, pode haver ou não uma predisposição conforme o fator genético (CERRONE & PRIORI, 2011).

O diagnóstico das causas genéticas de morte súbita é importante também, pois parentes próximos podem estar em risco potencial de apresentarem uma doença cardíaca fatal. Uma investigação pós-morte é vital para determinar a causa da morte e oferece a oportunidade de avaliar o risco potencial para a família e aconselhamento genético adequado. A avaliação efetiva dos parentes por testes genéticos, pode, portanto, evitar novas mortes deste tipo na família (RODRÍGUEZ-CALVO et al., 2008).

1.3. Farmacogenética e SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)

As variações genéticas são chamadas de polimorfismos quando presentes em uma freqüência maior que 1% na população. O tipo mais comum responsável por aproximadamente 90% da variabilidade entre os indivíduos, é o SNP (*single nucleotide polymorphism*). Um SNP acontece quando, por exemplo, verifica-se uma substituição de uma base “A” (adenina) por “T” (timina) num determinado nucleotídeo do genoma do indivíduo.

Um exemplo de SNP clinicamente relevante é o T-786C, que ocorre na região promotora do gene da enzima sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), o

qual tem sido associado com o risco aumentado de doença coronariana (HINGORANI et al., 1999). Foi demonstrado que o variante C acarreta 50% de redução na eficiência do promotor comparado ao variante T (NAKAYAMA et al., 1999). Desta maneira, estas variações genéticas podem alterar funções importantes em várias vias biológicas acarretando maior ou menor susceptibilidade no desenvolvimento de doenças, além de modularem o mecanismo de ação de drogas.

Devido a isto, determinados indivíduos podem reagir diferentemente ao mesmo tipo de medicamento, dependendo de sua etnia ou outras variações genéticas. O estudo da ação de drogas específicas em relação à variabilidade genética dos indivíduos é denominado Farmacogenética.

Indivíduos portadores destas mutações podem apresentar intervalos QT prolongados, aumentando em muito a sua susceptibilidade a arritmias cardíacas, especialmente quando estes indivíduos passam a usar drogas que o prolongam ainda mais (SPLAWSKI et al., 2002). Atualmente, existem exemplos bem documentados, tais como o caso citado por INGELMAN-SUNDBERG (2004), de indivíduos que apresentam mutações nestes genes e que, até o contato com algum medicamento não manifestam clinicamente o prolongamento do intervalo QT, o que dificulta a prescrição médica adequada. Portanto, a genotipagem para estas mutações poderia evitar que indivíduos com susceptibilidade genética a apresentarem anormalidades cardíacas tomassem drogas que prolonguem este intervalo, levando a arritmias potencialmente fatais (SPLAWSKI et al., 2002; SANDRIM et al., 2006) ou ao surgimento de cardiopatias ainda não observadas.

1.4. DNA mitocondrial

O perfil genético de um indivíduo, utilizado para identificação humana, pode ser definido como o conjunto de características hereditárias ou padrões fenotípicos que este possui, para um determinado número de marcadores genéticos, detectável em qualquer amostra biológica que lhe pertença (PINHEIRO, 2004).

O interesse pelo DNA mt surgiu por vários motivos, primeiro, esse DNA também contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; segundo,

os descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, o que permite traçar a linhagem materna do indivíduo; e, terceiro, esse DNA é mais resistente à degradação que o DNA nuclear (BUTLER & LEVIN, 1998), além de estar presente em várias cópias por célula (ROBIN & WONG, 1988). Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de avião, etc.), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o DNA mt.

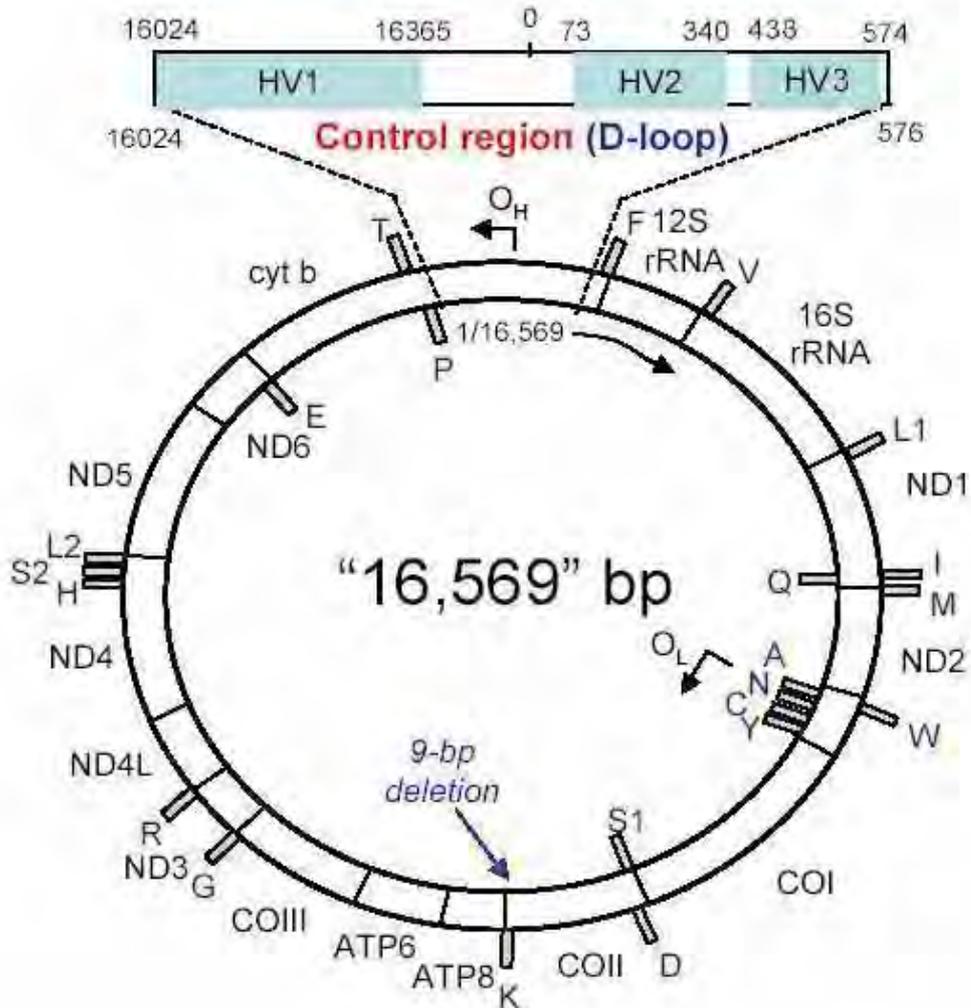
A sequência completa do genoma mitocondrial humano foi determinada em 1981 por Anderson e colaboradores. Essa sequência foi reanalisada e revisada por Andrews e colaboradores em 1999, sendo modificada e denominada *Cambridge Reference Sequence* (CRS).

O genoma mt é composto por 16.569 nucleotídeos e apresenta-se como uma dupla fita circular (figura 2). Contêm 37 genes, todos envolvidos na produção de energia e no estoque de ATP na célula. A maior parte do genoma mt é formada por genes. Entretanto, uma região não codificadora de aproximadamente 1.200 nucleotídeos flanqueia a posição “0” do genoma e é conhecida como região controle, D-loop ou região hipervariável. A denominação de região controle refere-se ao fato desta região conter o sinal que controla a síntese de RNA e DNA. D-loop refere-se à fase inicial de replicação, quando a nova fita recém sintetizada se desprende da fita molde formando uma “bolha” ou “loop”. A sequência da região controle é chamada hipervariável porque acumula mutações pontuais aproximadamente dez vezes mais comuns do que o DNA nuclear (BUDOWLE et al., 2003). Isso se deve à baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial (um erro a cada 440.000 nucleotídeos) e à perda do mecanismo de reparo no DNA mt (LEE & JOHNSON, 2006).

A região hipervariável do DNA mt é de interesse para a identificação humana devido ao alto grau de polimorfismo na sequência de nucleotídeos, que compreende três segmentos da região controle: HV1 (da posição 16024 a 16365), HV2 (da posição 73 a 340) e HV3 (da posição 438 a 574) (LUTZ et al., 2000). As duas primeiras regiões são utilizadas na rotina forense; a terceira região, entretanto, vem sendo explorada nos últimos anos (PANETO, 2010), além de ser

importante para correta classificação de algumas amostras em seus respectivos haplogrupos evolutivos.

Figura 2: Genoma do DNA mitocondrial com as regiões codificadora e não codificadora.



Fonte: BUTLER, J. M. Forensic DNA Typing. London: Elsevier Academic Press, 2005.

A classificação em haplogrupos do DNA mt pelo estudo de polimorfismos de uma base (SNPs) da região codificadora também é útil na área forense. Haplogrupos são definidos por motivos, constituídos de nucleotídeos particulares presentes nas regiões não-codificadora e codificadora do DNA mt. Assim, a classificação filogenética dá suporte ao banco de dados permitindo a detecção de incoerências nos resultados (BANDELT et al., 2006).

Além disso, essa classificação permite o estudo da composição genética matrilinea da população em estudo (ALVES-SILVA et al., 2000).

1.5. Cromossomo Y

As pesquisas e as aplicações dos marcadores do cromossomo Y têm tido um grande crescimento nos últimos anos. Estes marcadores possuem várias aplicações em testes de identificação humana.

O cromossomo Y possui muitas características que são únicas no genoma: ele não é essencial para a vida em mulheres, uma vez que sua ausência não é fatal, metade consiste de DNA satélites repetidos consecutivamente e a outra metade possui alguns genes, sendo a maioria não recombinante. No entanto, é por causa dessas características que o cromossomo Y é uma ferramenta excelente para a investigação da evolução humana e apresenta funções especializadas na genética médica e forense (JOBBLING & TYLER-SMITH, 2000).

Embora relatada como uma seqüência finalizada, SKALETISKY e colaboradores (2003) relataram somente 23 Mb dos aproximados 50 Mb presentes no cromossomo Y humano. A porção de aproximadamente 30 Mb ainda não relatada e não seqüenciada é uma região da heterocromatina localizada no braço longo do cromossomo Y que não é transcrita, sendo composta de seqüências altamente repetitivas. Já a região eucromática é composta de quatro classes de seqüências: blocos de seqüências que são homólogas ao cromossomo X, incluindo o material no final do braço curto do cromossomo Y; seqüências repetitivas ao redor do centrômero; famílias de seqüências repetitivas e seqüências de cópia única Y-específicas (HAMMER & ZEGURA, 1996).

A porção não-recombinante do cromossomo Y é a única parte do cromossomo Y que exhibe herança paterna clássica e possui os marcadores de interesse no estudo de patrilinearidade.

Duas categorias principais dos marcadores de DNA têm sido utilizadas no cromossomo Y: *loci* bialélico, o qual exhibe dois possíveis alelos, e *loci* multialélico. Resultados da tipagem de marcadores bialélicos de baixa resolução são

classificados em haplogrupos enquanto resultados multialélicos são caracterizados como haplótipos (DE KNIJFF, 2000).

Com o grande aumento de estudos com o cromossomo Y, em 2002, o Y-Chromosome Consortium (YCC) publicou um artigo no qual foi descrita uma árvore parcimoniosa de 153 haplogrupos, relacionando 245 polimorfismos binários entre si, e correlacionando sete nomenclaturas diferentes na definição dos haplogrupos. Neste processo, um novo método de classificação da nomenclatura do haplogrupo do cromossomo Y foi sugerido. A criação de uma nomenclatura comum e unificada foi um grande apoio à comunidade pesquisadora.

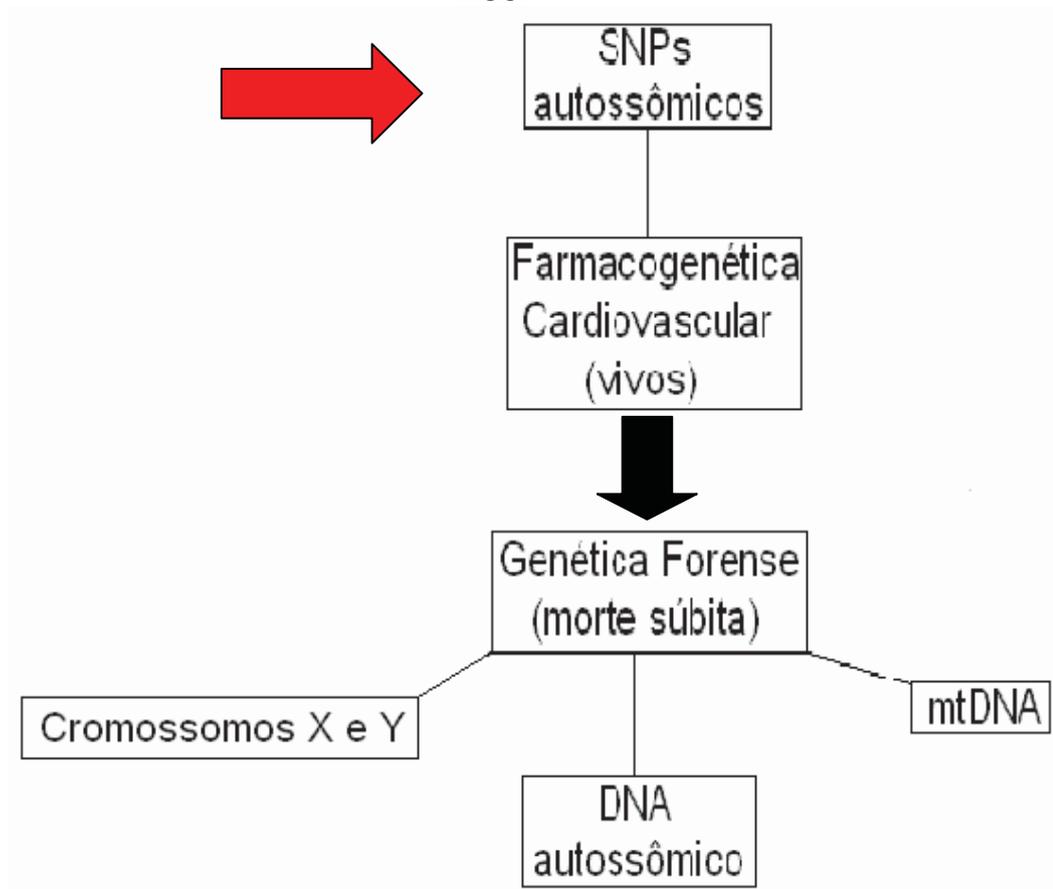
2. Justificativa do projeto

O perfil genético de um indivíduo, comumente utilizado na identificação humana, é baseado na combinação de diversos marcadores que são herdados de seus progenitores. Esses marcadores são geralmente diferenças nas seqüências de DNA autossômico, dos cromossomos sexuais X e Y e do DNAmT entre os indivíduos (polimorfismos).

É reconhecida também a correlação de alguns polimorfismos em genes específicos, principalmente, os de canais iônicos cardíacos à MSC, o que possibilitou que a análise dos mesmos fosse realizada por grupos de pesquisa em trabalhos acadêmicos e em casos reais na prática forense (MICHAUDA et al., 2009).

Em 2009, duas equipes de investigação internacional classificaram alguns SNPs como os mais associados a síndromes do intervalo QT (NEWTON-CHEH et al., 2009), uma das principais causas da MSC. Esta classificação é de grande importância pois, direciona as pesquisas neste campo gerando maior segurança na análise em casos práticos. O esquema, a seguir, ilustra a utilização destes polimorfismos em estudos de farmacogenética cardiovascular com indivíduos vivos visando sua aplicação na Genética Forense em casos de morte sem causas exteriores aparentes, uma vez que, as análises do DNA autossômico, mitocondrial e dos cromossomos X e Y já são utilizadas para identificação humana.

Figura 3: Esquema identificando a utilização dos SNPs autossômicos relacionados à MSC.



Neste contexto, com o objetivo de agregar praticidade e agilidade à análise de alguns destes polimorfismos, desenvolvemos uma reação de SNaPshot em *multiplex*, para sua possível utilização na Genética Médica e Forense, assim como, em novos estudos tendo em vista que os dados da população brasileira para estes polimorfismos são ainda incipientes.

Como complementação de informações, esses indivíduos foram classificados em haplogrupos evolutivos pelas análises do DNA mitocondrial ou cromossomo Y para verificar se há correlação de frequência entre os polimorfismos e os haplogrupos. Essa mesma metodologia foi aplicada em vestígios na tentativa de validar o uso em cadáveres.

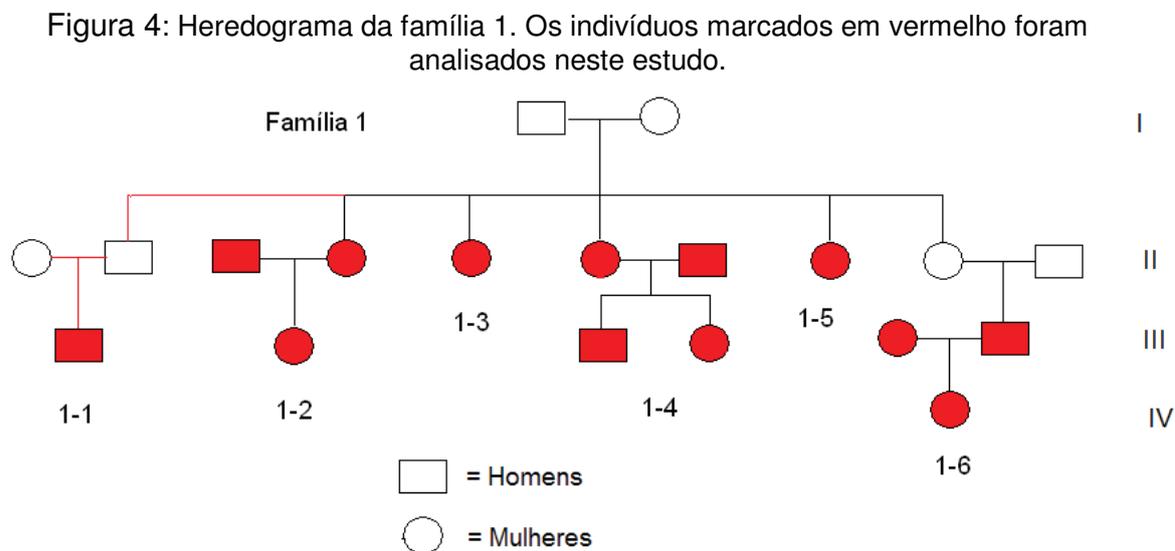
3. Objetivos

Os objetivos deste projeto foram padronizar as reações de PCR e SNaPshot em sistema *multiplex* para analisar alguns dos SNPs citados por NEWTON-CHEH e colaboradores (2009) em indivíduos e/ou vestígios provenientes de famílias brasileiras que apresentam histórico de insuficiência cardíaca e indivíduos que não apresentavam este histórico (controles). Além disso, classificá-los em haplogrupos por SNPs presentes no DNA mitocondrial ou cromossomo Y utilizando as técnicas de SNaPshot e sequenciamento.

4. Metodologia

4.1. Coleta das amostras biológicas

Foram realizadas coletas de sangue de indivíduos de famílias que possuem histórico de algum dos problemas cardíacos a seguir: Coronariopatia, Cardiomiopatia Hipertrófica ou de familiar que já sofreu ataque cardíaco. Participaram 5 famílias (n = 28), cada família foi identificada com os números 1 a 5, sendo que a família denominada 1 foi dividida em 6 sub-famílias (figura 4)



Os indivíduos de cada família foram identificados com o número correspondente e as letras do alfabeto.

Estas famílias foram selecionadas pelo médico cardiologista Dr. José Antonio Caracciolo da clínica CEDCOR Araraquara. Também foram realizadas coletas de indivíduos que não possuem um histórico familiar direto de problemas cardíacos para serem utilizados como controles (n = 10).

O material foi coletado e armazenado em papel de filtro FTA – Whatman, permanecendo estocado longe de umidade até o momento da extração de DNA.

Além de amostras de sangue, realizou-se também análise em ossos e dentes provenientes de 5 esqueletos familiares exumados, dos quais 3 apresentaram como causa de morte problemas cardiovasculares. As amostras de ossos foram identificadas como MLV, HV, CLV e OVB, e a amostra de dente como MPV, para a identificação foram utilizadas as primeiras letras dos nomes e sobrenomes gerando as siglas supramencionadas.

As exumações foram realizadas com a prévia autorização do Ministério Público do Estado de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara pelo protocolo nº: 24/2009.

4.2. Extrações de DNA

4.2.1. Amostras de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada com a resina *Chelex* (Biorad) (SINGER-SAM et al., 1989).

4.2.2. Amostras de ossos e dentes

Para extração de DNA destas amostras foi utilizado o protocolo descrito por LOREILLE et al. (2007) com a adaptação do filtro AMICON ULTRA (Millipore), após a desmineralização total do material, e realizou-se a purificação com o Kit *DNA IQ* (Promega), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

4.3. Análise dos SNPs relacionados à MSC

4.3.1. Seleção dos SNPs e desenho dos iniciadores (*primers*)

NEWTON-CHEH e colaboradores (2009) citaram um total de 14 SNPs como os mais associados a variações no intervalo QT. Para este projeto selecionamos 11 destes (tabela 2), levando em consideração o prévio conhecimento na literatura da correlação dos genes onde estes polimorfismos ocorrem com a MSC também em outras populações, tendo em vista que o Brasil apresenta uma grande miscigenação.

Tabela 2: Localização nos cromossomos e respectivos genes dos 11 SNPs relacionadas com intervalo QT selecionados para este projeto.

| SNP | Cromossomo | Gene |
|------------|------------|-------------------------|
| rs12143842 | 1q | Upstream <i>NOS1AP</i> |
| rs16857031 | 1q | Intron <i>NOS1AP</i> |
| rs2074238 | 11p | Intron <i>KCNQ1</i> |
| rs11756438 | 6q | Intron <i>c6orf204</i> |
| rs12576239 | 11p | Intron <i>KCNQ1</i> |
| rs4725982 | 7q | Downstream <i>KCNH2</i> |
| rs8049607 | 16p | Upstream <i>LITAF</i> |
| rs1805128 | 21q | Missense <i>KCNE1</i> |
| rs12053903 | 3p | Intron <i>SCN5A</i> |
| rs2074518 | 17q | Intron <i>LIG3</i> |
| rs2968864 | 7q | Downstream <i>KCNH2</i> |

Fonte: NEWTON-CHEH e colaboradores (2009).

Os iniciadores para a reação de PCR dos fragmentos autossômicos que compreendem os SNPs foram desenhados e analisados utilizando o programa computacional PerlPrimer versão 1.1.19 (MARSHALL, 2004).

Os 11 pares de iniciadores selecionados para as reações de PCR foram também analisados no programa computacional AutoDimer versão 1 (VALLONE; BUTLER, 2004) em conjunto, uma vez que a reação é realizada em *multiplex*, descartando-se a formação de dímeros e *hairpins*.

Após a seleção dos iniciadores para a reação de PCR, os mesmos foram novamente analisados individualmente quanto à especificidade do fragmento a ser amplificado através da ferramenta *online PCR in silico*, no site <http://genome.ucsc.edu/>.

Os 11 iniciadores utilizados na reação de SNaPshot foram desenhados individualmente para se anelarem a um nucleotídeo posicionado imediatamente antes da posição do SNP que se desejava genotipar. Uma cauda nucleotídica com diferentes números de bases foi adicionada a região 5' de cada iniciador. Esta cauda, que não se anela ao produto de PCR previamente amplificado, foi adicionada para permitir a separação dos fragmentos por tamanho em eletroforese capilar. A temperatura de anelamento de cada um dos iniciadores foi checada no programa PerlPrimer versão 1.1.19 e estes foram analisados em conjunto no programa Autodimer versão 1 verificando-se a formação de dímeros.

4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de 0,2 ml utilizando-se:

- 0,4 µl de *Platinum Taq DNA polymerase* (5U/µl) (Invitrogen by Life Technologies)
- 1 µl de *Goldstar 10X Buffer* (Promega)
- 1,775 µl do *mix* de iniciadores (tabela 3)
- 100 pg de DNA
- água ultrapura (Milli-Q) autoclavada q.s.p. 11µl

OBS. A cada amplificação foi realizada uma reação como controle negativo utilizando 1 µl da solução resultante da extração de DNA de papel FTA (Whatman) sem amostra.

Tabela 3: Pares de iniciadores utilizados na reação de PCR com volumes e concentrações para os respectivos polimorfismos.

| SNPs | Concentração (estoque) | Volume na reação | Concentração na reação |
|------------|------------------------|------------------|------------------------|
| rs1805128 | 12,5 pMOL/ μ l | 0,16 μ l | 2 pMOL/ μ l |
| rs2074238 | 25 pMOL/ μ l | 0,375 μ l | 9,375 pMOL/ μ l |
| rs2074518 | 12,5 pMOL/ μ l | 0,16 μ l | 2 pMOL/ μ l |
| rs2968864 | 10 pMOL/ μ l | 0,24 μ l | 2,4 pMOL/ μ l |
| rs4725982 | 12,5 pMOL/ μ l | 0,16 μ l | 2 pMOL/ μ l |
| rs12053903 | 6,25 pMOL/ μ l | 0,24 μ l | 1,5 pMOL/ μ l |
| rs12576239 | 12,5 pMOL/ μ L | 0,24 μ L | 3 pMOL/ μ l |
| rs16857031 | 12,5 pMOL/ μ l | 0,24 μ l | 3 pMOL/ μ l |

As sequências dos iniciadores não são mostradas, devido a processo de pedido de patente para a metodologia

Em seguida, foi utilizada a ciclagem a seguir em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies):

95°C – 10 minutos
 95°C – 30 segundos
 *51°C – 45 segundos
 72°C – 30 segundos
 4°C - ∞

} 35 ciclos

*Aumento de 0,3°C por ciclo a partir do quarto ciclo.

4.3.3. Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado previamente à realização da reação de SNaPshot para retirada dos nucleotídeos não incorporados e do excesso de iniciadores pela adição de 1 μ l de EXO-SAP IT (GE Healthcare) e a ciclagem em

termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies) esta apresentada a seguir:

37°C – 95 minutos

78°C – 15 minutos

4°C – ∞

4.3.4. Reação de SNaPshot

A reação de SNaPshot foi realizada utilizando-se o *ABI PRISM SNaPshot multiplex kit* (Applied Biosystems by Life Technologies) conforme segue:

- 0,25 µl de 10X *PCR Buffer II* (Applied Biosystems by Life Technologies)
- 1,25 µl de SNaPshot *mix*
- 2,45 µl do *mix* de iniciadores (tabela 4)
- 1 µl do produto de PCR purificado
- água ultrapura (Milli-Q) autoclavada q.s.p. 6,5 µl

Tabela 4: Pares de iniciadores utilizados na reação de SNaPshot com volumes e concentrações para os respectivos polimorfismos.

| SNPs | Concentração (estoque) | Volume na reação | Orientação |
|------------|------------------------|------------------|----------------|
| rs1805128 | 2 pMOL/µl | 0,3 µl | <i>forward</i> |
| rs2074238 | 2 pMOL/µl | 0,45 µl | <i>forward</i> |
| rs2074518 | 2 pMOL/µl | 0,525 µl | <i>reverse</i> |
| rs2968864 | 2 pMOL/µl | 0,3 µl | <i>forward</i> |
| rs4725982 | 2 pMOL/µl µl | 0,1 µl | <i>reverse</i> |
| rs12053903 | 1,25pMOL/µl | 0,375 µl | <i>reverse</i> |
| rs12576239 | 1,25pMOL/µl | 0,3 µl | <i>reverse</i> |
| rs16857031 | 2 pMOL/µl | 0,3 µl | <i>forward</i> |

Em seguida, foi utilizada a ciclagem a seguir em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies):

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 96°C – 03 minutos | } | 30 ciclos |
| 55°C – 05 segundos | | |
| 60°C – 30 segundos | | |
| 4°C – ∞ | | |

4.3.5. Purificação do produto da reação de SNaPshot

O produto da reação de SNaPshot foi purificado para retirada dos nucleotídeos não incorporados e do excesso de iniciadores pela adição de 1µl de SAP (GE Healthcare) e a seguinte ciclagem em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies):

37°C – 95 minutos
78°C – 15 minutos
4°C – ∞

4.3.6. Eletroforese Capilar

As amostras foram preparadas em placas de 96 poços da seguinte forma:

- 1 µl do produto da reação de SNaPshot purificado
- 10 µl do mix formamida HI-DI e LIZ 120 (12,5 µl de LIZ 120 para 1000 µl de formamida HI-DI)

Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 3 minutos e rapidamente inseridas no gelo onde permaneceram também por 3 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese capilar (EC) no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.3.7. Análise das reações de SNaPshot

A análise das reações de SNaPshot foi realizada no software GeneMapper – IDX versão 1.2 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.4. Classificação das amostras de ossos e dente em haplogrupos pelo DNA mitocondrial

4.4.1. Reação de PCR

O DNA extraído das amostras de ossos e dentes foi utilizado numa reação de PCR para amplificar separadamente as regiões HV1 e HV2 localizadas na região não codificadora do DNA mt como segue:

- 2,5 µl de *Goldstar 10X Buffer* (Pomega)
- 0,2 µl (1 U) de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen by Life Technologies)
- 0,2 µM dos iniciadores (tabela 5)
- 4 ng de DNA
- água ultrapura (Milli-Q) autoclavada q.s.p. 25 µl

Os fragmentos foram amplificados em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) conforme ciclagem abaixo:

95°C – 11 minutos
96°C – 1 minuto
94°C – 30 segundos
54°C – 30 segundos
72°C – 1:30 minutos
60°C – 11 minutos
4°C – ∞

} 40 ciclos

Tabela 5: Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento do DNA mt.

| | Primer | Orientação | Sequência |
|-----|--------|----------------|------------------------------|
| HV1 | L15997 | <i>forward</i> | 5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3' |
| | H16401 | <i>reverse</i> | 5'-TGATTTACGGAGGATGGTG-3' |
| HV2 | L29 | <i>forward</i> | 5'-GGTCTATCACCTATTAACCAC-3' |
| | H408 | <i>reverse</i> | 5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3' |

Após a amplificação, a avaliação dos produtos foi realizada visualmente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Cuba Horizon 58, Model 200 – Gibco) por 15 minutos a 100 volts, utilizando-se 5 µl do produto de PCR. O gel foi visualizado e fotografado em aparelho Alpha Imager EP (Alpha Innotech).

4.4.2. Purificação do produto da reação de PCR

As amostras passaram pelo processo de purificação com o auxílio das colunas *GFX PCR DNA and band gel purification kit* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante.

4.4.3. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada em tubos de 0,2 ml conforme protocolo abaixo:

- 1 µl de Big Dye Terminator v 1.0 (Applied Biosystems by Life Technologies)
- 1 µl do iniciador *forward* ou *reverse* (1,6 picomolar) (tabela 5)
- 1,75 µl de tampão para *Big Dye*
- produto de PCR purificado suficiente para a reação
- água ultrapura (Milli-Q) autoclavada qsp. 10 µl

Em seguida, foi utilizado o termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer), conforme ciclagem abaixo:

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 96°C – 10 seg | } | 25 ciclos |
| 55°C – 5 seg | | |
| 60°C – 30 seg | | |
| 4°C - ∞ | | |

4.4.4. Purificação do produto da reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi purificado para retirada de nucleotídeos não incorporados e excesso de iniciadores através da técnica de precipitação por álcool conforme o protocolo abaixo:

- Adicionou-se 80 µl de isopropanol 75% ao produto da reação de sequenciamento (no mesmo tubo onde a reação foi realizada), o volume foi homogeneizado e transferido para novo tubo de 1,5 ml;
- A mistura foi deixada à temperatura ambiente (TA) por 15 minutos no escuro, centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm (Eppendorf Centrifugal 5417R) e TA;
- O sobrenadante foi então cuidadosamente descartado, invertendo-se o tubo sobre papel absorvente e adicionando-se 1 ml de etanol 70%;
- Procedeu-se nova centrifugação por 5 minutos, 14.000 rpm à TA, e o sobrenadante foi vertido cuidadosamente sobre papel absorvente;
- O precipitado foi seco a vácuo por 15 minutos em aparelho DNA Speed Vac (Savant) e guardado em freezer a -20°C até a EC.

4.4.5. Eletroforese capilar

As amostras foram eluídas em formamida HI-DI e desnaturadas por 3 minutos a 95°C em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) e rapidamente inseridas no gelo onde permaneceram por 3 minutos. A EC foi

realizada no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.4.6. Análise das sequências e classificação em haplogrupos

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas no programa *BioEdit Sequence Alignment* (HALL, 1999).

Após a identificação dos SNPs, o site mtDNAmanager (LEE et al., 2008) foi utilizado para classificar as amostras em haplogrupos conforme a mudança de bases e localização de cada polimorfismo.

4.5. Classificação das amostras de sangue em haplogrupos pelo cromossomo Y

As análises para classificação em haplogrupos pelo cromossomo Y foram realizadas em colaboração com a mestrandia Raquel F. Figueiredo, no Laboratório de Investigação de Paternidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

4.5.1. Reação de PCR

Todas amostras de sangue masculinas foram genotipadas por 14 marcadores bialélicos (Y-SNPs) em sistema *multiplex*: 92R7, M70, M22, Tat, P25, SRY1532, M173, M213, M9, que caracterizam o *multiplex* I (MI) (tabela 6) e M26, M62, M170, M172, M201, que caracterizam o *multiplex* II (MII) (tabela 7) (BRION et al. 2005). Os iniciadores foram gentilmente cedidos pela Dra. Leonor Gusmão do IPATIMUP, Porto, Portugal, colaboradora do projeto.

Nas reações de amplificação, o *Multiplex PCR kit* (Qiagen) foi utilizado como segue:

- 5 µl de *master mix*
- 1 µl do *mix* de iniciadores (tabelas 6 e 7)
- 100 pg de DNA
- água ultrapura (MILLI-Q) autoclavada q.s.p. 10 µl

A reação foi realizada em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer), conforme ciclagem abaixo:

95°C – 15 minutos
 94°C – 30 segundos
 60°C – 90 segundos
 72°C – 60 segundos
 72°C – 10 minutos
 4°C – ∞

} 35 ciclos

Tabela 6: Sequência dos iniciadores para PCR do *Multiplex I* (Brion et al., 2005).

| SNP | Orientação | Sequência (5' - 3') |
|------------|-------------------|----------------------------|
| 92R7 | <i>Forward</i> | TGCATGAACACAAAAGACGTA |
| | <i>Reverse</i> | GCATTGTTAAATATGACCAGC |
| M70 | <i>Forward</i> | TCATAGCCCCTATACTTTGGAC |
| | <i>Reverse</i> | CTGAGGGCTGGACTATAGGG |
| M22 | <i>Forward</i> | GCTGATAGTCCTGGTTTCCCTA |
| | <i>Reverse</i> | TGAGCATGCCTACAGCAGAC |
| Tat | <i>Forward</i> | GACTCTGAGTGTAGACTTGTGA |
| | <i>Reverse</i> | GAAGGTGCCGTAAAAGTGTGAA |
| P25 | <i>Forward</i> | GGACCATCACCTGGGTAAAGT |
| | <i>Reverse</i> | AGTGCTTGTCCAAGGCAGTA |
| SRY10831 | <i>Forward</i> | TCCTTAGCAACCATTAATCTGG |
| | <i>Reverse</i> | AAATAGCAAAAAGTACACAAGGC |
| M173 | <i>Forward</i> | GCACAGTACTCACTTTAGGTTTGC |
| | <i>Reverse</i> | GCAGTTTTCCAGATCCTGA |
| M213 | <i>Forward</i> | GGCCATATAAAAACGCAGCA |
| | <i>Reverse</i> | TGAATGGCAAATTGATTCCA |
| M9 | <i>Forward</i> | GCAGCATATAAAAAGTTCAGG |
| | <i>Reverse</i> | AAAACCTAACTTTGCTCAAGC |

Tabela 7: Sequência dos iniciadores para PCR do *Multiplex II* (Brion et al., 2005).

| SNP | Orientação | Sequência (5' - 3') |
|------|----------------|-----------------------------|
| M201 | <i>Forward</i> | TCAAATTGTGACACTGCAATAGTT |
| | <i>Reverse</i> | CATCCAACACTAAGTACCTATTACGAA |
| M26 | <i>Forward</i> | AGCAGAAGAGACCAAGACAGC |
| | <i>Reverse</i> | GACGAAATCTGCAGCAAAAA |
| M170 | <i>Forward</i> | TGCAGCTCTTATTAAGTTATGTTTTCA |
| | <i>Reverse</i> | CCAATTACTTTCAACATTTAAGACC |
| M172 | <i>Forward</i> | TCCTCATTACCTGCCTCTC |
| | <i>Reverse</i> | TCCATGTTGGTTTGGAAACAG |
| M62 | <i>Forward</i> | ACTAAAACACCATTAGAAACAAAGG |
| | <i>Reverse</i> | CTGAGCAACATAGTGACCCC |

4.5.2. Purificação do produto da reação de PCR

Foi realizada a digestão do excesso de iniciadores e nucleotídeos através da adição de 0,5 µl de EXOSAP-IT (GE Healthcare) e incubação como segue:

37°C – 15 minutos

85°C – 15 minutos.

4.5.3. Reação de SNaPshot

A reação de SNaPshot foi realizada utilizando-se o *ABI PRISM SNaPshot multiplex kit* (Applied Biosystems by Life Technologies) Os iniciadores foram selecionados segundo Brion et al. (2005) conforme o protocolo a seguir descrito por Gomes et al. (2010):

Reação de SNaPshot *multiplex* I (MI):

- 1 μ l do SNaPshot *mix*
- 1,5 μ l do produto de PCR purificado
- 1 μ l do *mix* de iniciadores (tabela 8)
- água ultrapura (MILLI-Q) autoclavada q.s.p. 5 μ l

Reação de SNaPshot *multiplex* II (MII):

- 1 μ l do SNaPshot *mix*
- 1,5 μ l do produto de PCR purificado
- 1,5 μ l do *mix* de iniciadores (tabela 9)
- água ultrapura (MILLI-Q) autoclavada q.s.p. 5 μ l

A ciclagem abaixo ocorreu no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer):

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 96°C – 10 segundos | } | 25 ciclos |
| 50°C – 5 segundos | | |
| 60°C – 30 segundos | | |
| 4°C – ∞ | | |

Tabela 8: Sequência e concentração dos *primers* para SNaPshot do *Multiplex I* (Brion et al., 2005).

| SNP | Orientação | Sequência (5' – 3') | Conc. (µM) |
|--------------|----------------|--|------------|
| 92R7 | <i>Reverse</i> | CCCCGCATGAACACAAAAGACGTAGAAG | 0,20 |
| M70 | <i>Reverse</i> | CCCCCCCCTAGGGATTCTGTTGTGGTAGTCTTAG | 0,15 |
| M22 | <i>Forward</i> | CCGCCATTCTGGTGGCTCT | 0,10 |
| Tat | <i>Reverse</i> | CCCCCCCCCCCCCCCCCTCTGAAATATTAATTTAA ACAAC | 0,20 |
| P25 | <i>Forward</i> | CCCCCCTCTGCCTGAAACCTGCCTG | 0,15 |
| SRY108 31 | <i>Forward</i> | CCCCCCTTGTATCTGACTTTTTTCACACAGT | 0,20 |
| M173 | <i>Forward</i> | CCCCCCCCCCTTACAATTCAAGGGCATTTAGAAC | 0,20 |
| M213 | <i>Reverse</i> | CCCCCCCCCCCCCCCCCCTCAGAACTTAAACA TCTCGTTAC | 0,25 |
| M9 | <i>Forward</i> | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGAAACGGCCT AAGATGGTTGAAT | 0,20 |

Tabela 9: Sequência e concentração dos *primers* para SNaPshot do *Multiplex II* (Brion et al., 2005).

| SNP | Orientação | Sequência (5' – 3') | Conc. (µM) |
|------|----------------|--|------------|
| M201 | <i>Forward</i> | CCCCCCCCCCCCCGATCTAATAATCCAGTATCAA CTGAGG | 0,05 |
| M26 | <i>Reverse</i> | CCCCCCCCCCCCCATAGGCCATTGAGTGTCTCT G | 0,25 |
| M170 | <i>Reverse</i> | ACACAACCCACACTGAAAAAAA | 0,45 |
| M172 | <i>Forward</i> | CCCCCCCCCCCCCAAACCCATTTTGTGCTT | 0,10 |
| M62 | <i>Reverse</i> | CCCCCCCCAATGTTTGTGGCCATGGA | 0,50 |

4.5.4. Purificação do produto da reação de SNaPshot

O produto da reação de SNaPshot foi submetido à digestão dos iniciadores e nucleotídeos fluorescentes não incorporados pela adição de 1 µl (1 U) de SAP (GE Healthcare) ao produto final da reação em ciclagem a seguir no mesmo termociclador:

37°C – 1 hora

85°C – 15 minutos

4.5.5. Eletroforese capilar

As amostras foram preparadas em placas de 96 poços da seguinte forma:

- 0,5 µl do produto da reação de SNaPshot purificado
- 0,5 µl do padrão de corrida LIZ 120
- 9 µl de HI-DI formamida

Em seguida, as amostras foram desnaturadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies) a 95 °C por 3 minutos e rapidamente inseridas no gelo onde permaneceram também por 3 minutos.

A EC foi realizada no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.5.6. Análise das reações de SNaPshot

A análise das reações de SNaPshot foi realizada no software GeneMapper – IDX versão 1.2 (Applied Biosystems by Life Technologies).

5. Resultados e Discussão

5.1. Análise dos SNPs relacionados à MSC

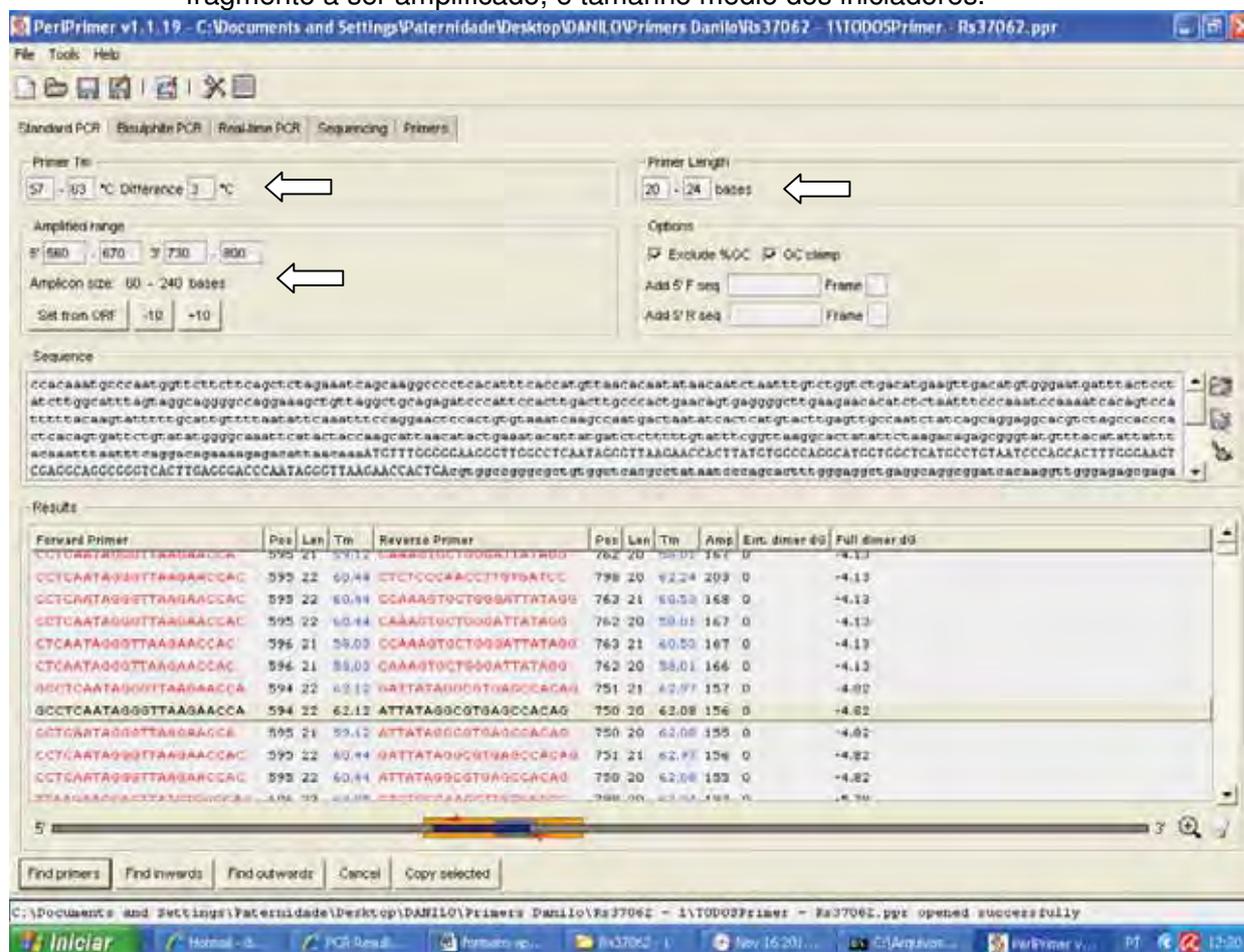
5.1.1. Desenho dos iniciadores das reações de PCR e SNaPshot

Os iniciadores para reação de PCR dos fragmentos autossômicos que compreendem os 11 SNPs foram desenhados e analisados utilizando o programa computacional PerlPrimer versão 1.1.19.

Este programa gera todas as possibilidades de iniciadores a partir da seqüência de interesse e dos parâmetros definidos, tais como, o tamanho médio

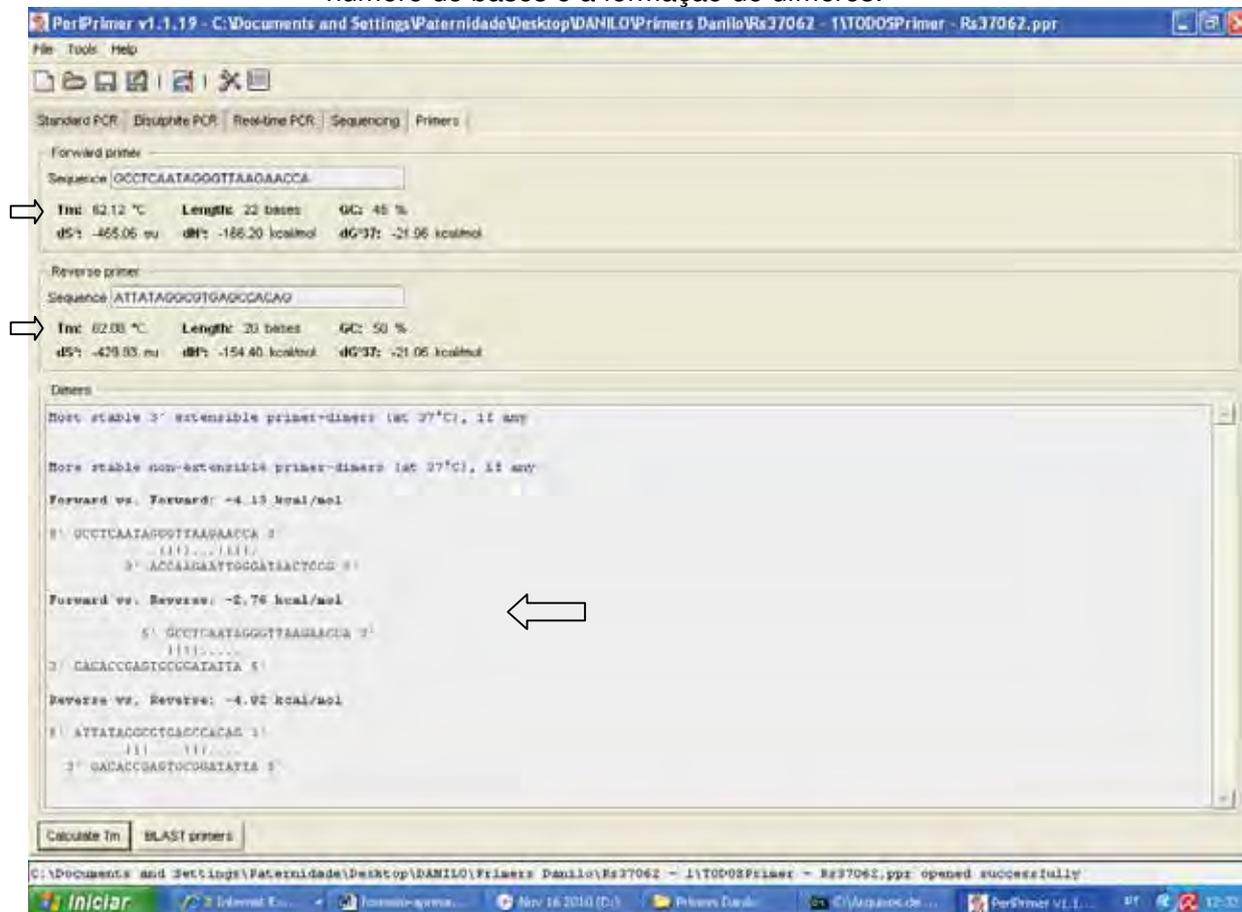
do fragmento a ser amplificado, 200 pares de bases neste caso, e o tamanho médio de cada iniciador, de 20 pares de bases. As possibilidades geradas estão mostradas na figura 5, em ordem decrescente de qualidade dos pares de iniciadores que é definida pela formação de dímeros.

Figura 5: Relação dos pares de iniciadores gerados pelo programa PerIPrimer versão 1.1.19 em ordem decrescente de qualidade, a partir da seqüência do gene KCNH2 (a título de exemplo) que compreende o SNP rs2968864 e dos parâmetros definidos (indicados pelas setas) como temperatura média de anelamento, tamanho e posição do fragmento a ser amplificado, e tamanho médio dos iniciadores.



Selecionando o par de iniciadores de interesse dentre todos os gerados, foi possível analisar os tamanhos, as temperaturas de anelamento, e a formação de dímeros entre os iniciadores *forward* e *reverse* (figura 6).

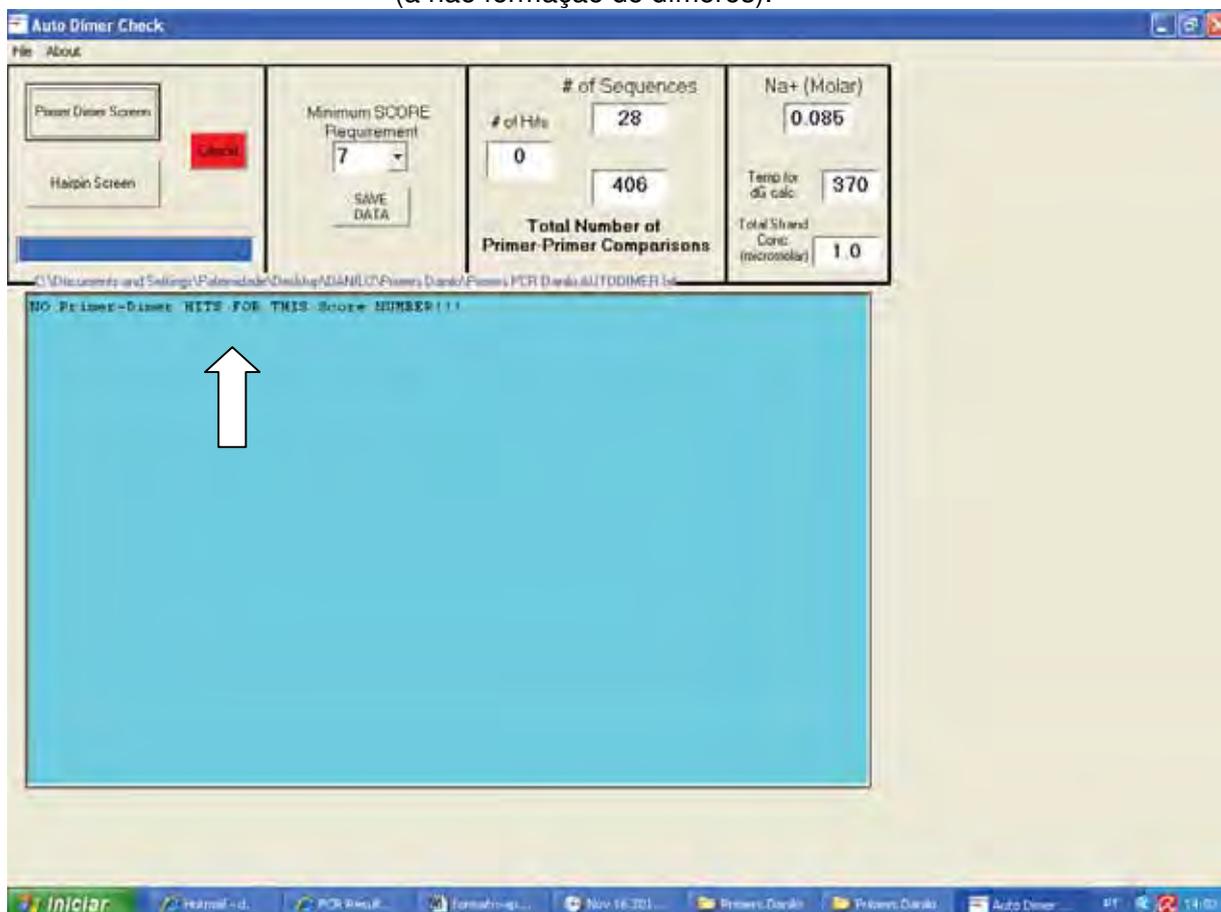
Figura 6: Dados gerados pelo programa PerIPrimer versão 1.1.19 do par de iniciadores selecionado para a reação de amplificação do fragmento do gene KCNH2 que compreende o SNP rs2968864. As setas indicam as temperaturas de anelamento, o número de bases e a formação de dímeros.



Este programa também oferece a ferramenta de comparação das seqüências dos iniciadores selecionados com o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), com a finalidade de verificar a especificidade dos mesmos em relação ao fragmento de interesse, a qual foi utilizada para todos os iniciadores selecionados.

Os 11 pares de iniciadores selecionados para as reações de PCR foram também analisados no programa computacional AutoDimer versão 1, em conjunto, uma vez que a reação foi realizada em *multiplex*, verificando a formação de dímeros e *hairpins* para que a reação *in vitro* ocorresse adequadamente (figura 7).

Figura 7: Análise de formação de dímeros de todos os pares de iniciadores da reação de PCR em conjunto no programa Autodimer versão 1. A seta indica o resultado da análise (a não formação de dímeros).



Após a seleção dos melhores pares de iniciadores para a reação de PCR, os mesmos foram novamente analisados individualmente quanto à especificidade do fragmento a ser amplificado através da ferramenta online PCR *in silico*, no site <http://genome.ucsc.edu/> (figura 8).

Figura 8: Análise dos iniciadores da reação de PCR do fragmento do gene KCNE1 que compreende o SNP rs1805128 na ferramenta *online* PCR *in-silico*. A posição do fragmento no genoma, gene de localização, e tamanho médio a ser amplificado estão indicados pelas setas.

The screenshot displays the UCSC Genome Browser interface for the KCNE1 gene on chromosome 21. The search bar at the top shows the coordinates 'chr21:34,743,472-34,743,648' and a size of 177 bp. The main track shows the gene sequence with 11 primers highlighted in blue. A red arrow points to the search bar, and a white arrow points to the primer tracks.

Os 11 iniciadores utilizados na reação de SNaPshot foram desenhados individualmente. A temperatura de anelamento de cada um foi verificada no programa PerlPrimer versão 1.1.19 e estes foram analisados em conjunto no programa Autodimer versão 1 verificando a formação de dímeros (figura 9).

Figura 9: Análise em conjunto dos 11 iniciadores utilizados na reação de SnaPshot em *multiplex*. A seta indica a formação de dímeros do iniciador 9 – *forward* utilizado na análise do SNP rs11756438 na temperatura de 92,4°C.

C:\Documents and Settings\Paternidade\Desktop\DANILO\Primers Danilo\Primers SnapShot AUTODIMER TODOS 5'3'.txt

```

9-F ACGATATAAAGATATTAATAAATAAGATACTTGAAT versus 9-F
ACGATATAAAGATATTAATAAATAAGATACTTGAAT
Matches = 20
Score = 7
ATNNAANNATNTTANTNANTAANATNNTTNNAT
est. tm = 92,4 oC
DeltaG 370 degrees = greater than zero

          3'-TAAGTTCATAGAATAAATAATTATAGAAATATAGCA-5'
          ||xx||xx||x||x|x|x||x||xx||xx||
          5'-ACGATATAAAGATATTAATAAATAAGATACTTGAAT-3'
    
```

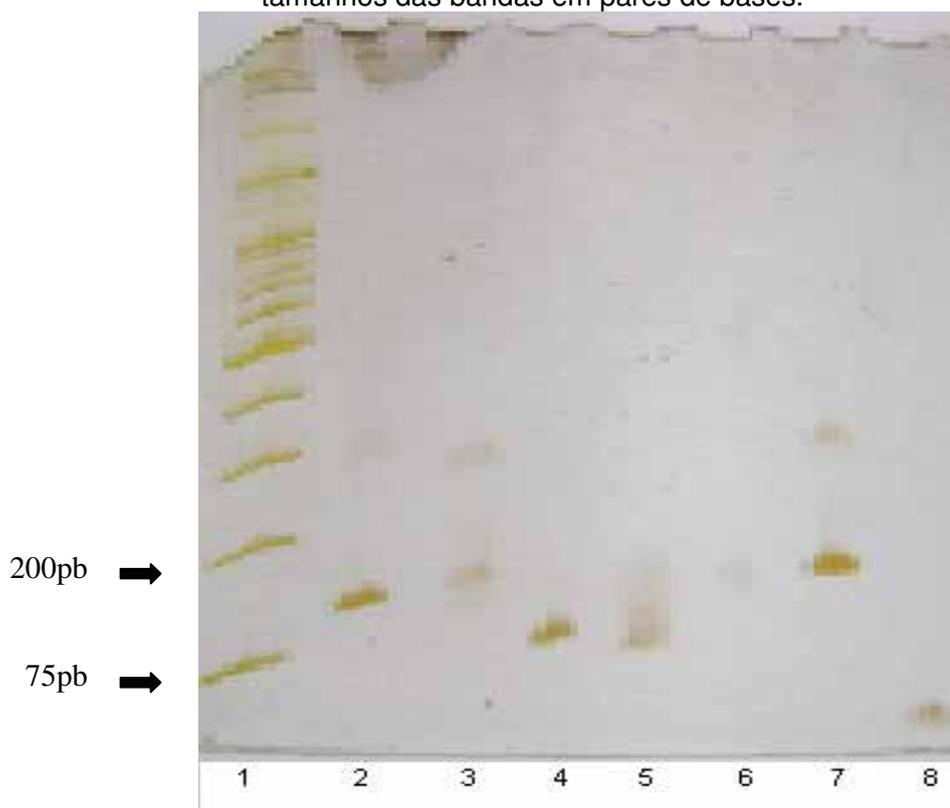
As análises realizadas em todos os softwares supramencionados sugeriram sucesso nas reações de PCR e SNaPshot em *multiplex*, uma vez que, as análises *in silico* demonstraram que todos os iniciadores selecionados foram específicos e não formaram dímeros nas temperaturas de anelamento tendo em vista que o dímero formado do iniciador 9 (correspondente ao SNP rs11756438) na figura 5 ocorre na temperatura de 92,4 °C que não é próxima da de anelamento.

5.1.2. Padronização das reações de PCR e SNaPshot *in vitro*

Para que as reações *in vitro* que avaliam os SNPs relacionados à MSC fossem eficientes na análise dos mesmos em *multiplex* todos os iniciadores desenhados para as reações de PCR e SNaPshot foram testados individualmente para confirmação da eficiência e especificidade.

Foram realizadas reações de PCR com os pares de iniciadores separados e a visualização da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata (figura 10).

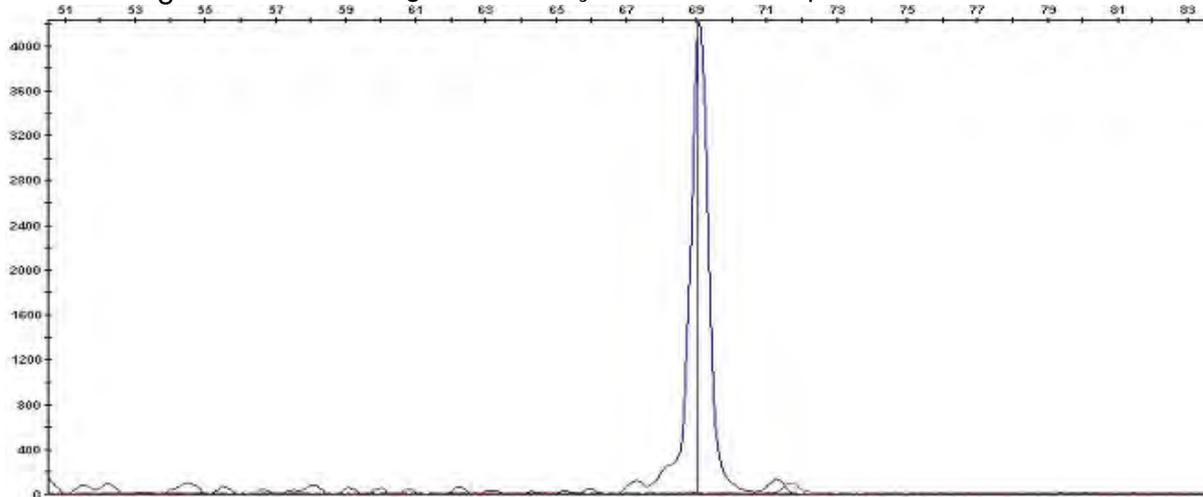
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por nitrato de prata, dos produtos de PCR realizados com os pares de iniciadores separadamente. 1, Generuler 1Kb *DNA ladder plus* (Fermentas); 2. rs1805128; 3. rs2074238; 4. rs2074518; 5. rs2968864; 6. controle negativo; 7. rs4725982 e 8. rs12053903. As setas apresentam os tamanhos das bandas em pares de bases.



Após estas reações serem ajustadas para amplificarem os fragmentos esperados de maneira reprodutível foi realizado o mesmo processo com os

iniciadores da reação de SNaPshot, onde foi possível avaliar cada um separadamente. A figura 11 exemplifica um dos resultados.

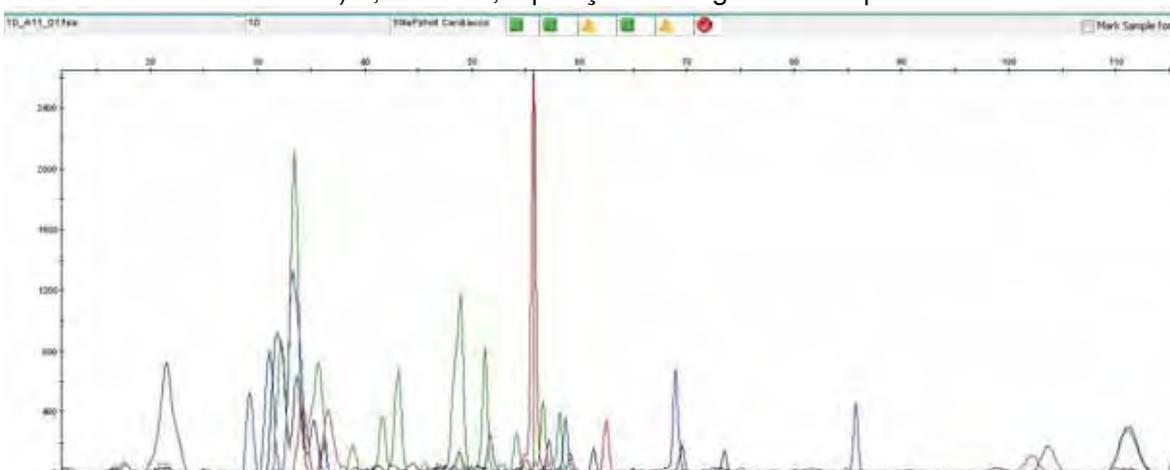
Figura 11: Eletroferograma da reação de SNaPshot para o SNP rs16857031.



A partir do momento em que as reações de PCR e SNaPshot permitiram a análise de cada polimorfismo separadamente, iniciou-se a padronização da reação em *multiplex*, onde a concentração dos iniciadores das reações de PCR e SNaPshot foram alteradas individualmente buscando um perfil que possibilitasse a análise de todos os polimorfismos.

Devido à característica dos iniciadores, quando todos os 11 foram utilizados em conjunto na mesma reação, houve uma grande formação de dímeros, causando sobreposição de picos no eletroferograma (figura 12), o que dificultou a análise de alguns polimorfismos.

Figura 12: Eletroferograma da reação de SNaPshot buscando a análise dos 11 SNPs em sistema *multiplex*. O eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.



Para a resolução deste efeito, foram retirados deste sistema 3 iniciadores para a análise dos polimorfismos rs12143842, rs11756438 e rs8049607, que não apresentavam seus respectivos picos no eletroferograma. Isto reduziu a formação de dímeros e permitiu a análise dos 8 principais SNPs de interesse. Nas figuras 13 e 14 são apresentados os eletroferogramas da reação de SNaPshot em *multiplex* para análise dos 8 polimorfismos e do controle negativo, onde se pode observar que a formação de dímeros apresentou perfil idêntico a do eletroferograma de análise das amostras, facilitando a distinção entre os picos de interesse, os artefatos e dímeros da reação.

Figura 13: Eletroferograma da reação de SNaPshot onde foram analisados 8 SNPs em sistema *multiplex*. Os picos coloridos correspondem às bases de interesse. O eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.

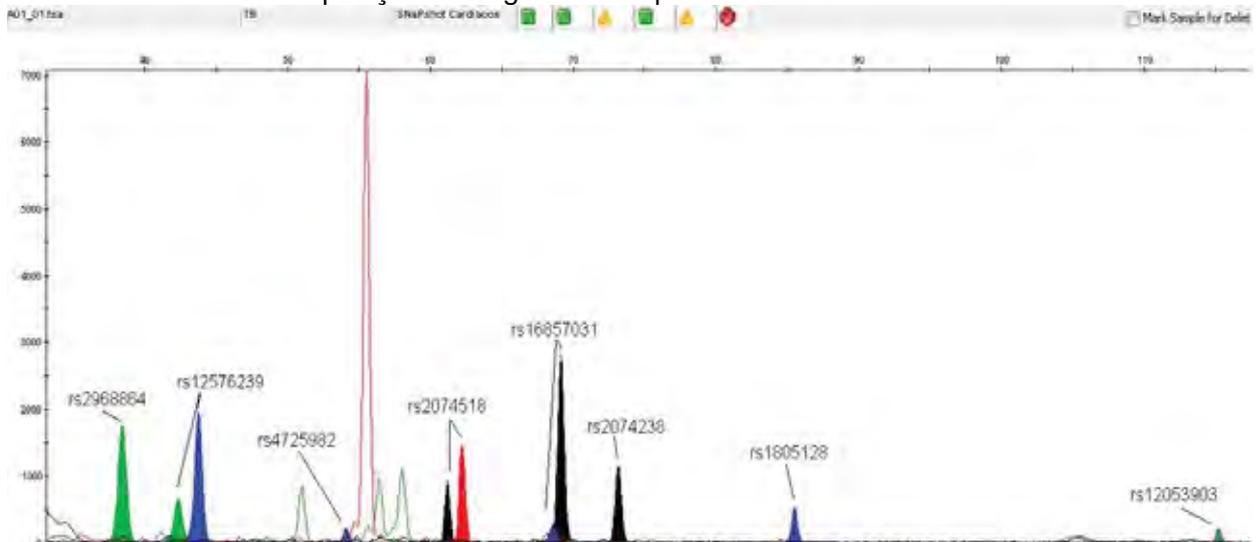
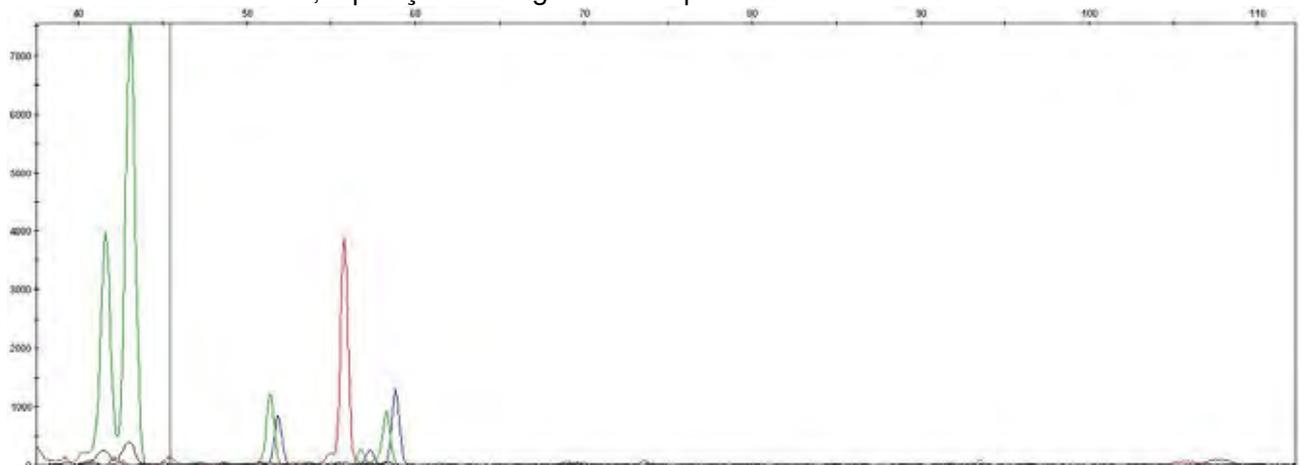


Figura 14: Eletroferograma da reação de SNaPshot usada como controle negativo. O eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.



5.1.3. Análise das amostras de sangue e comparação entre as famílias com histórico de cardiopatias e o grupo controle

Todas as amostras de sangue pertencentes às famílias com histórico de insuficiência cardíaca e as utilizadas como controles foram analisadas para os 8

polimorfismos. Na tabela 10 são mostrados os alelos ancestrais e os derivados que configuram os SNPs, sendo estes dados retirados do banco de dados dbSNP – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Tabela 10: Alelos ancestrais e alelos derivados de cada polimorfismo respectivo.

| SNP | alelo ancestral | alelo derivado |
|------------|------------------------|-----------------------|
| rs1805128 | G | A |
| rs2074238 | C | T |
| rs2074518 | G | A |
| rs2968864 | A | G |
| rs4725982 | C | T |
| rs12053903 | C | T |
| rs12576239 | C | T |
| rs16857031 | C | G |

Identificou-se a presença dos alelos “T/T” para o SNP rs12053903 em todas as amostras analisadas do grupo com histórico de cardiopatia e do grupo controle de maneira homozigótica.

Para o SNP rs12576239, 20 amostras apresentaram os alelos “C/T” e 8, os alelos “T/T” do grupo com histórico familiar. Já no grupo controle, identificou-se 6 amostras com os alelos “T/T” e 4 com “C/T”.

25 amostras do grupo com histórico familiar apresentaram o SNP rs16857031 em heterozigosidade, ou seja, a base ancestral ou original (C) e a base derivada que configura o SNP (G), 1 amostra apresentou homozigose com os alelos “G/G” e 2 amostras, os alelos “C/C”. No grupo controle, o perfil “G/C” foi encontrado em 4 amostras e 6 amostras não apresentaram troca de bases apresentando os alelos “C/C”.

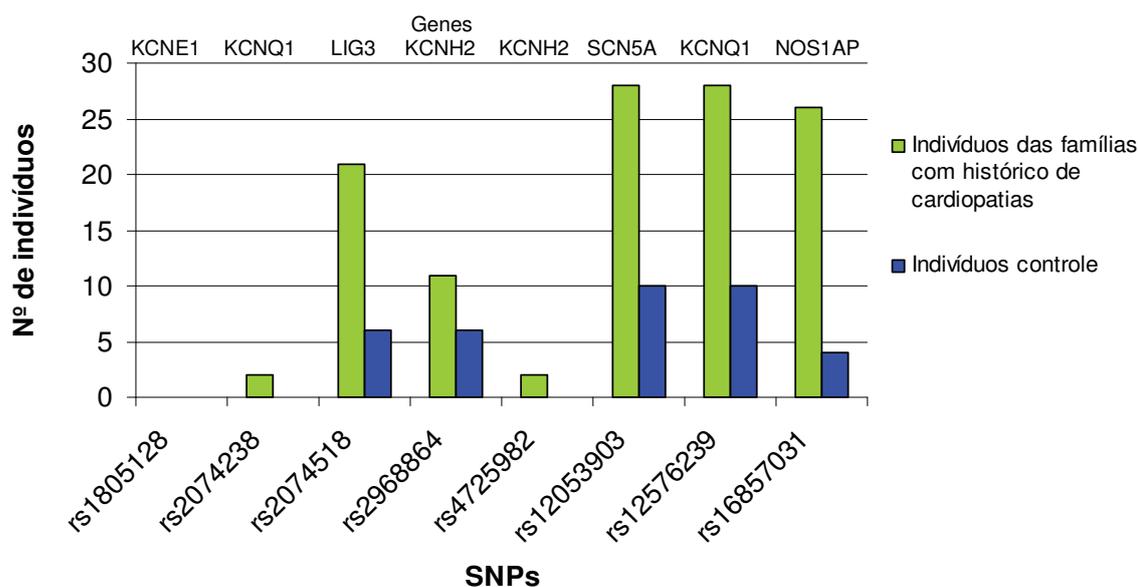
A tabela 11 a seguir mostra a ocorrência de cada SNP nos grupos com histórico de cardiopatias e controle e seus respectivos alelos.

Tabela 11: Ocorrência dos SNPs e seus respectivos alelos nos grupos com histórico e controle. ND = não detectado.

| | rs1805128 | rs2074238 | rs2074518 | | | rs2968864 | | | rs4725982 | | rs12053903 | rs12576239 | | rs16857031 | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----------|-----|-----|-----------|-----|------------|------------|-----|------------|-----|-----|
| Alelos | G/G | C/C | C/T | G/G | G/A | A/A | A/A | G/A | C/C | C/T | T/T | C/T | T/T | C/C | G/C | G/G |
| Grupo com histórico (n) | 28 | 26 | 2 | 7 | 19 | 2 | 19 | 9 | 26 | 2 | 28 | 20 | 8 | 2 | 25 | 1 |
| Grupo controle (n) | 10 | 10 | ND | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 | ND | 10 | 4 | 6 | 6 | 4 | ND |

Na figura 15, a seguir, pode ser visto quais os SNPs apresentaram os alelos derivados em homo ou heterozigose.

Figura 15: Ocorrência dos 8 SNPs com respectiva freqüência em que apresentaram os alelos derivados (independente se em homo ou heterozigose) nas amostras de indivíduos das famílias com histórico e controles.



Os SNPs rs12053903, rs12576239 e rs16857031 foram os mais identificados no grupo de indivíduos com histórico familiar de cardiopatias.

No SNP rs1805128 não foi identificado nenhum alelo derivado tanto nas amostras do grupo com histórico como nas do controle, apresentando somente a base ancestral "G/G".

Nos SNPs rs2074238 e rs4725982 foram encontrados alelos derivados em somente duas amostras do grupo com históricos de cardiopatias.

De maneira geral, não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos das famílias e os controles sadios; entretanto, o SNP rs16857031, foi identificado em percentagem superior nos indivíduos das famílias com histórico de cardiopatias em comparação com os controles, conforme era esperado; mas, o rs2968864 foi identificado em maior percentagem no grupo controle ao contrário

do esperado. Este fato pode ser explicado pela frequência deste polimorfismo na população e será discutido posteriormente.

Estes resultados são aceitáveis tendo em vista que o número de amostras analisadas foi relativamente pequeno e que os indivíduos utilizados como controle foram selecionados de modo aleatório em relação ao conhecimento médico sobre o histórico familiar para possíveis irregularidades cardíacas.

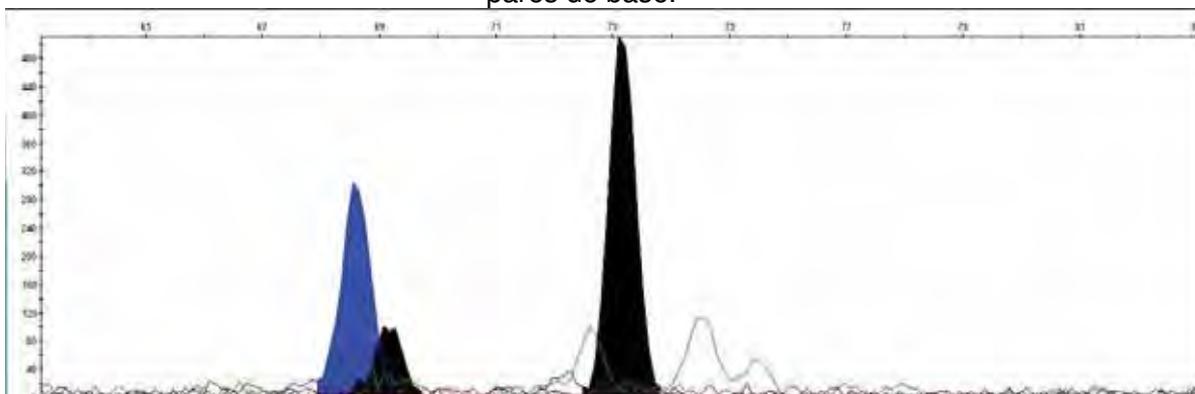
Como este é o primeiro estudo dessa natureza na população brasileira as conclusões tornam-se complexas. Entretanto, essa amostragem permitiu verificar que pode ser interessante incluir esse sistema *multiplex* na abordagem de autópsia molecular, pois alguns SNPs mostraram-se discriminativos, tais como, rs16857031, rs2074518, rs12576239 e rs 12053903.

Entretanto, não se pode descartar a possível herança genética desses SNPs ligada ao gênero (masculino ou feminino).

5.1.4. Análises das amostras de ossos e dente

Nas reações realizadas com estas amostras não foi possível analisar os 8 SNPs. Os eletroferogramas das reações de SNaPshot para as amostras OVB, MLV, CLV e HV possibilitaram somente a análise do SNP rs16857031 e dos SNPs rs16857031 e rs2074238 para a amostra MPV (figura 16).

Figura 16: Eletroferograma da reação de SNaPshot realizada com a amostra MPV. Os picos coloridas indicam as bases de interesse. O eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.



Nas amostras OVB, CLV, HV e MLV o SNP rs16857031 foi identificado em homozigose “G/G” e na amostra MPV em heterozigose “G/C”. O SNP rs2074238 foi identificado na amostra MPV com o perfil “C/C”.

A dificuldade na obtenção de um perfil de eletroferograma que possibilitasse a análise de todos os SNPs para estas amostras talvez se deva a baixa qualidade do DNA autossômico, uma vez que estes vestígios estavam sepultados desde os anos: 1906 (MPV), 1930 (HV), 1972 (MLV), 1977 (OVB) e 1979 (CLV).

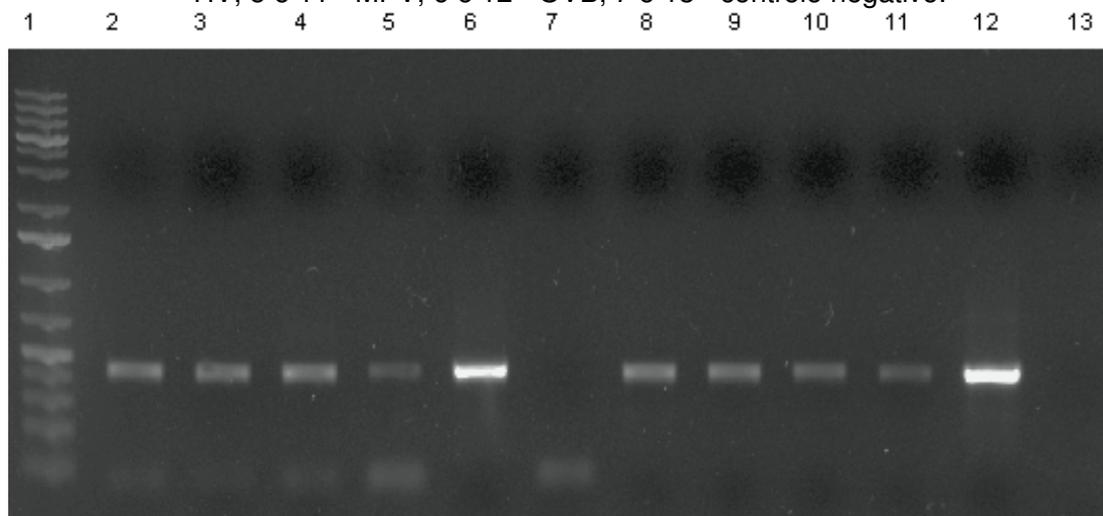
Possivelmente, em casos desta natureza uma alternativa será utilizar os sistemas *monoplex*, para melhorar a qualidade dos resultados.

5.2. Classificação das amostras de ossos e dente em haplogrupos pelo DNA mitocondrial

Este tipo de amostra (ossos) apresenta um certo grau de dificuldade para extração de DNA, pois possui menor quantidade de DNA em comparação com outros tipos de amostras biológicas, sofre degradação devido à ação do meio ambiente e geralmente apresenta alta taxa de inibidores (LOREILLE et al., 2007). Como a reação de PCR amplifica com mais reprodutibilidade fragmentos menores de DNA em amostras degradadas, as PCRs foram realizadas separadamente para as regiões não codificadoras HV1 e HV2.

A qualidade dos produtos das PCRs foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 17).

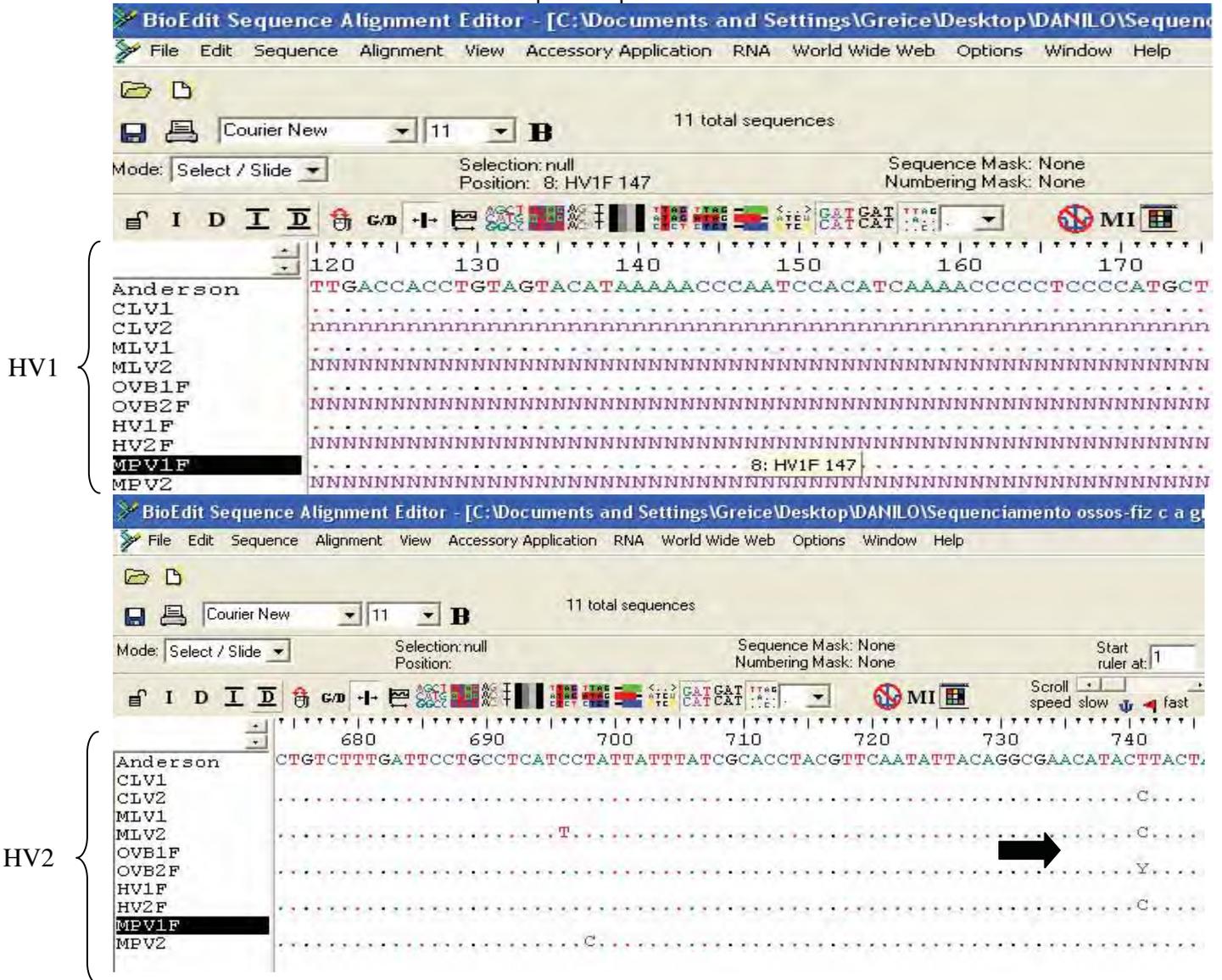
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% de reações de PCR das regiões HV1 e HV2, respectivamente: 1-ladder 100pb *plus* (Fermentas), 2 e 8 - MLV, 3 e 9 - CLV, 4 e 10 - HV, 5 e 11 - MPV, 6 e 12 - OVB, 7 e 13 - controle negativo.



Somente a partir da confirmação da amplificação na PCR foram realizados os demais passos para o sequenciamento.

Todas as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com a sequência consenso referência (CRS) no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (figura 18) e a identificação dos polimorfismos realizada manualmente. Para classificação das amostras foi utilizado o site mtDNAManager.

Figura 18: Alinhamento das sequências obtidas por sequenciamento das regiões HV1 e HV2 das amostras CLV, MLV, OVB, HV e MPV com a seqüência padrão do DNA mt chamada de “Anderson” no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. A seta indica um polimorfismo na posição 327 da região HV2. Os pontos indicam as bases iguais as da seqüência padrão.



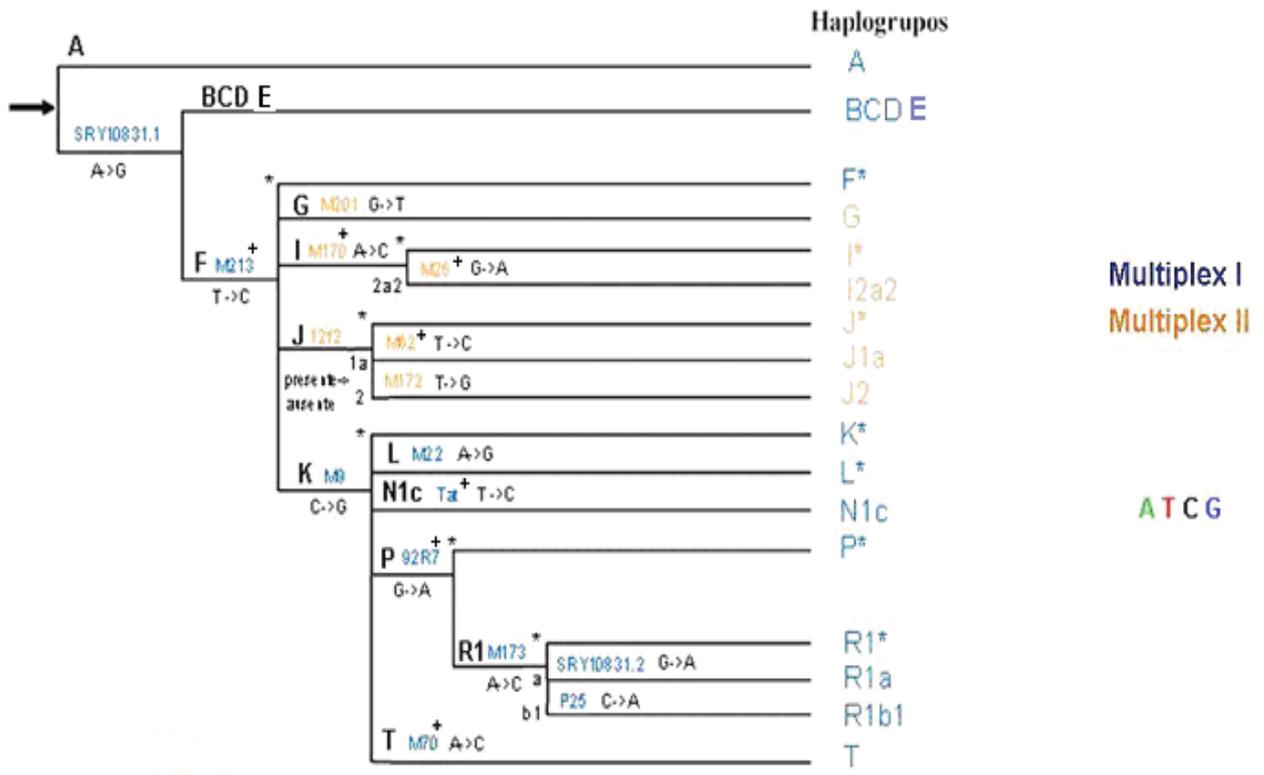
As amostras, OVB, CLV, MLV e HV foram classificadas no haplogrupo “H” e a amostra MPV classificada no haplogrupo “T2d”, conforme os polimorfismos encontrados nas regiões hipervariáveis 1 e 2 do DNA mt. Esta classificação foi correspondente ao esperado, pois, apesar dos dois haplogrupos serem freqüentes em europeus (ACHILLI et al. 2004; BABALINI et al. 2005) as amostras MLV, HV,

CLV e OVB provêm de indivíduos que descendem de mesma origem materna, diferente da amostra MPV.

5.3. Classificação de todas as amostras de sangue masculinas utilizadas neste estudo em haplogrupos pelo cromossomo Y

Foram analisados 14 SNPs em dois sistemas *multiplex* I e II, os quais permitem a distinção de 17 haplogrupos (figura 19).

Figura 19: Árvore filogenética do cromossomo Y. Adiante SNPs estão as possíveis bases apresentadas pelo marcador. O sinal (+) indica a utilização do iniciador reverso na reação de SNaPshot e, assim, deve-se ler a base complementar nessas posições.



Para classificação de uma amostra no respectivo haplogrupo a partir da árvore filogenética (figura 19), inicia-se a análise pelo SNP SRY10831.1 e segue-se, baseando-se no alelo de cada SNP até o haplogrupo correspondente. Primeiramente, as amostras foram analisadas quanto aos SNPs do *multiplex* I, e

quando apresentaram o alelo ancestral do SNP M9, ou seja, a base citosina, foi realizado o *multiplex* II para a classificação da amostra nos clados G, I ou J pertencentes a este segundo sistema.

5.3.1. Análise das amostras

Das 14 amostras analisadas pertencentes a 8 famílias, 9 foram classificadas ao respectivo haplogrupo utilizando apenas o *multiplex* I e em 5 houve a necessidade de se analisar também o *multiplex* II. Para as duas amostras controle masculinas foi utilizado apenas o *multiplex* I.

Os eletroferogramas dos *multiplexes* I e II obtidos na EC estão apresentados nas figuras 20 e 21, respectivamente. O *multiplex* I é uma combinação de 9 SNPs, no entanto, nos resultados do SNaPshot, mais de 9 picos podem ser encontrados, pois dois destes SNPs apresentam sequências parálogas variantes, P25 e 92R7 (SANCHEZ et al., 2004). Estas são definidas como mudanças genéticas que não ocorrem devido ao polimorfismo, mas a variações de sequências parálogas duplicadas no genoma (BECKMANN et al., 2007). Sequências parálogas são sequências que divergiram após a duplicação de um gene, podendo ser bem grandes (>150Kb) e exibir um grande grau de similaridade de sequência (>98%) (HORVATH et al., 2000).

O SNP P25 apresenta a base citosina em seu estado ancestral e as bases citosina e adenina em seu estado derivado. Já o SNP 92R7, apresenta as bases guanina e adenina em seu estado ancestral e somente a base adenina em seu estado derivado (figura 20).

Figura 20: Eletroferograma da reação de SNaPshot para os 9 SNPs do *multiplex I*. O eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.

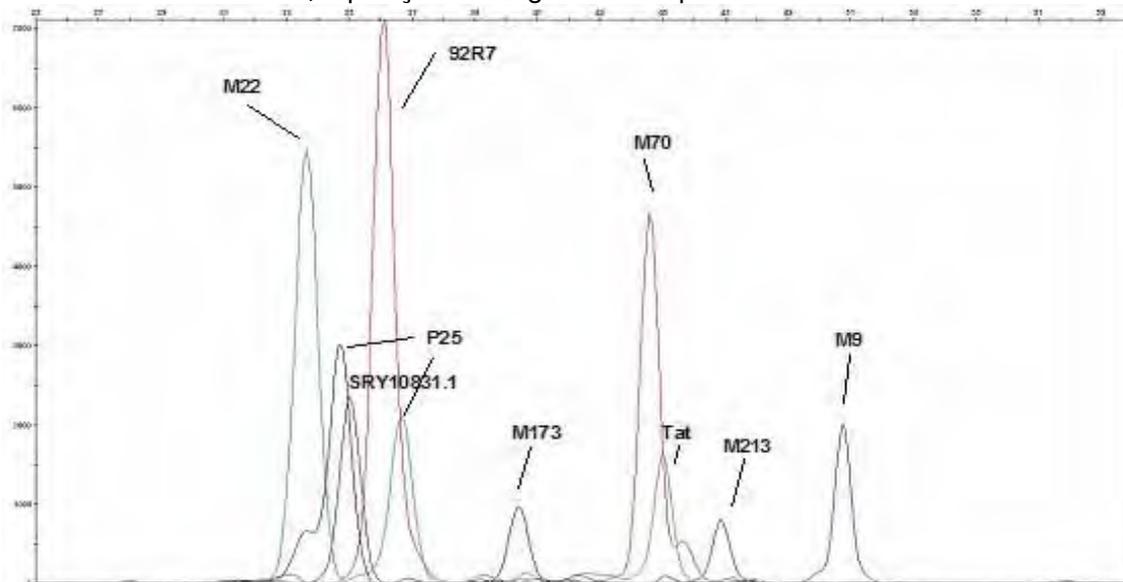
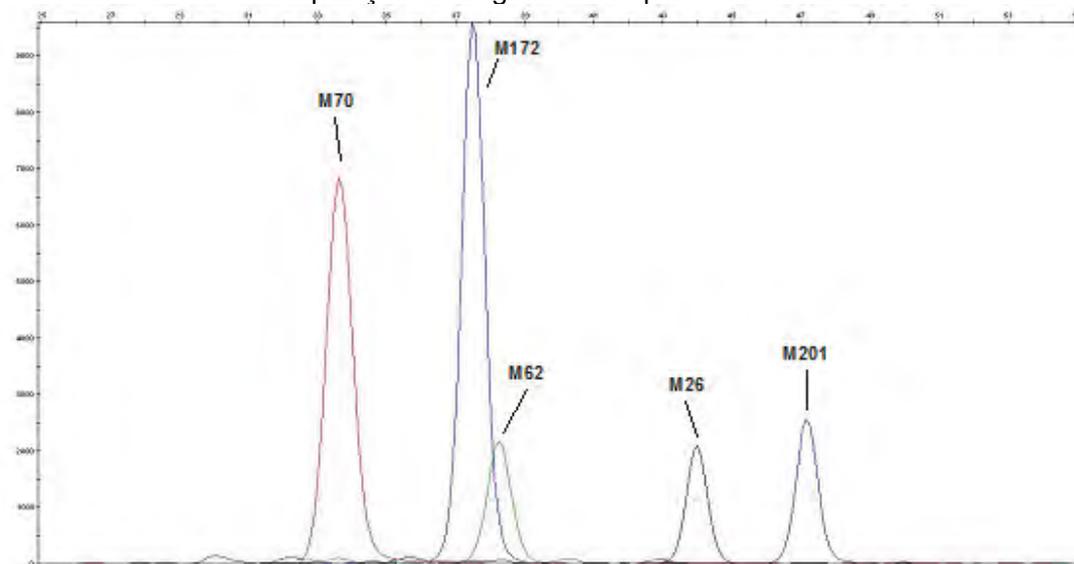


Figura 21: Eletroferograma da reação de SNaPshot para os 5 SNPs do *multiplex II*. Eixo Y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo X, a posição do fragmento em pares de base.



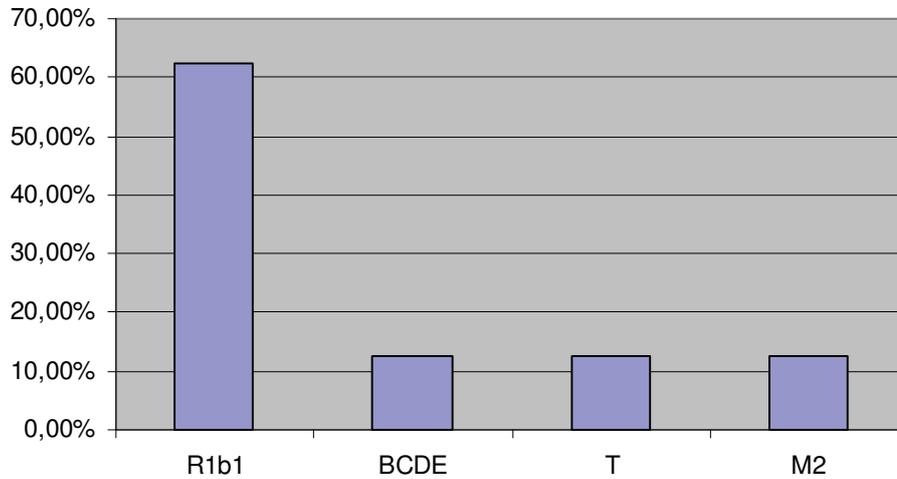
As amostras analisadas de indivíduos pertencentes a famílias que apresentam histórico de cardiopatias ($n = 14$) foram classificadas nos seguintes haplogrupos (tabela 12):

Tabela 12: Classificação dos indivíduos das famílias em haplogrupos pelo cromossomo Y.

| Família | Nº de indivíduos | Haplogrupo |
|---------|------------------|------------|
| 1-1 | 1 | R1b1 |
| 1-3 | 2 | R1b1 |
| 1-5 | 1 | R1b1 |
| 1-6 | 1 | R1b1 |
| 6 | 1 | R1b1 |
| 7 | 3 | BCDE |
| 8 | 3 | T |
| 9 | 2 | J2 |

É possível observar que o haplogrupo R1b1 foi o que ocorreu na maioria das famílias (figura 22). Este haplogrupo aparece com alta frequência na Europa, sendo encontrado em países como Portugal (59,9 %) (BELEZA et al., 2006) e Espanha (55,48 %) (BRION et al., 2004), países que possuem influência direta na formação da população brasileira.

Figura 22: Frequência dos haplogrupos do cromossomo Y nas famílias analisadas.



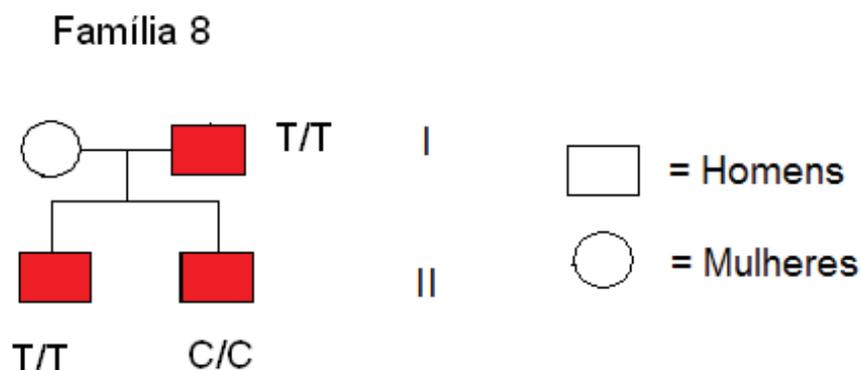
Das amostras utilizadas como controles, 2 denominadas de C2 e C7, foram do sexo masculino e foram classificadas nos haplogrupos R1b1 e R1a respectivamente. As outras pertenciam ao sexo feminino.

5.4. Correlação entre os haplogrupos do cromossomo Y dos indivíduos das famílias estudadas e controles e a identificação dos SNPs relacionados à MSC

EIJGELSHEIM e colaboradores (2009) citam que as características genéticas que interferem no intervalo QT são herdadas em aproximadamente 35% da população geral.

Esta informação pode ser exemplificada com a análise do SNP rs4725982 em dois indivíduos da família 8 (pai e filho) (figura 23) que foram os únicos a apresentar a base polimórfica para este SNP de todas as amostras estudadas.

Figura 23: Heredograma da família 8. Em vermelho, os indivíduos analisados neste projeto com seus respectivos alelos para o SNP rs4725982.



Estes indivíduos foram classificados no haplogrupo T pelas análises no cromossomo Y, que é raro no mundo, sendo encontrado em baixas frequências em toda Europa e partes do Oriente Médio, Norte e Oeste da África (UNDERHILL et al., 2001; KING et al., 2007).

A frequência do SNP rs4725982 para estas populações está apresentada na tabela 13, a seguir:

Tabela 13: Frequência dos alelos do SNP rs4725982 em europeus, asiáticos e africanos (sub-saarianos).

| População | rs4725982 | | |
|---------------------------|-----------|-------|-------|
| | C/C | C/T | T/T |
| Europeus | 64,6% | 31% | 4,4% |
| Asiáticos | 11,6% | 41,9% | 46,5% |
| Africanos (sub-saarianos) | 53,1% | 41,6% | 5,3% |

Fonte: dbSNP – NCBI (*National center for Biotechnology Information*).

A frequência dos alelos “T/T” em europeus e africanos é relativamente baixa o que pode reforçar sua correlação a cardiopatias ou MSC. Mas, não pode-se afirmar que haja uma maior ocorrência destes alelos no haplogrupo T do cromossomo Y especificamente, pois, para isto, seria necessária a análise e comparação com um número relativamente grande de amostras não aparentadas.

Nota-se também que o perfil “C/C” nesse polimorfismo encontrado nas amostras das outras famílias tem uma alta frequência em europeus e africanos; isto pode explicar a predominância destes alelos nas amostras analisadas uma vez que praticamente todos os indivíduos foram classificados em haplogrupos de origem européia, pois, o haplogrupo J2 teve frequência identificada na Espanha e Alemanha e ausência na China e Japão (BRION et al., 2005b), o R1b1 é altamente frequente na Europa, o B é quase inteiramente restrito a África Sub-Saariana (KARAFET et al., 2008), o C é bastante encontrado na Ásia (HAMMER et al., 2001; UNDERHILL et al., 2001), como o haplogrupo D, não sendo encontrado em lugar algum fora da Ásia (KARAFET et al., 2001; HAMMER et al., 2006) e o haplogrupo E é encontrado em alta frequência na África e com frequências moderadas na Europa (UNDERHILL et al., 2001; JOBLING & TYLER-SMITH, 2003).

Nas tabelas 14 e 15 são apresentadas as frequências dos demais SNPs em algumas populações.

Tabela 14: Frequência dos SNPs rs1805128, rs2074238, rs2074518 e rs29968864 em europeus, asiáticos, africanos e afro-americanos. ND = não detectado.

| População | rs1805128 | | rs2074238 | | | rs2074518 | | | rs2968864 | | |
|---------------------------|-----------|-------|-----------|------|------|-----------|-------|-------|-----------|-------|------|
| | A/G | G/G | C/C | C/T | T/T | A/A | A/G | G/G | A/A | A/G | G/G |
| Europeus | 5% | 95% | 93% | 5,3% | 1,8% | 23% | 55,8% | 21,2% | 55,8% | 38,1% | 6,2% |
| Asiáticos | 2,3% | 97,7% | 97,8% | 2,2% | - | 2,3% | 37,2% | 60,5% | 95,3% | 4,7% | - |
| Africanos (sub-saarianos) | - | 100% | 100% | - | - | 0,9% | 17,7% | 81,4% | 100% | - | - |
| Afro-americanos | 4,3% | 95,7% | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fonte: dbSNP – NCBI (*National center for Biotechnology Information*).

Tabela 15: Frequência dos SNPs rs12053903, rs12576239, e rs16857031 em europeus, asiáticos, africanos e afro-americanos.

| População | rs12053903 | | | rs12576239 | | | rs16857031 | | |
|-------------------------|------------|-------|-------|------------|-------|------|------------|-------|-------|
| | C/C | C/T | T/T | C/C | C/T | T/T | C/C | C/G | G/G |
| Europeus | 9,7% | 40,7% | 49,6% | 72,6% | 27,4% | - | 78% | 13,6% | 8,5% |
| Asiáticos | 62,2% | 34,3% | 3,5% | 49,7% | 42% | 8,4% | 75,6% | 20% | 4,4% |
| Africanos (sub-saharan) | 83,2% | 16,8% | - | 63,7% | 33,6% | 2,7% | 46,7% | 46,7% | 6,7% |
| Afro-americanos | - | - | - | - | - | - | 52,2% | 30,4% | 17,4% |

Fonte: dbSNP – NCBI (*National center for Biotechnology Information*).

O fato de o SNP rs1805128 não ter sido identificado com o alelo derivado “A” em nenhuma das amostras e o rs2074238 com o alelo derivado “T” em apenas duas amostras pode ser explicado pela alta frequência dos alelos “G/G” e “C/C” respectivamente, em europeus, assim como, a presença do SNP rs12053903 com os alelos “A/A” em todas as amostras.

Ao contrário, o SNP rs12576239 com o alelo derivado “T”, foi identificado em todas as amostras e apresenta uma frequência mediana para o perfil “C/T” e praticamente nula para o perfil “T/T” em europeus. O rs16857031 que também foi identificado em todas as amostras com o alelo derivado “G” possui frequência mediana e baixa para os perfis “C/G” e “G/G”, respectivamente. Isto pode ser um indício de que, neste caso, estes alelos não estejam relacionados à população, mas sim a um histórico familiar compatível com irregularidades cardíacas”.

A frequência dos perfis “A/A” e “A/G” do SNP rs2968864 é alta em europeus o que pode justificar a identificação destes em todas amostras e o fato de que o grupo controle apresentou em maior percentagem os alelos “A/G” uma vez que os indivíduos analisados deste grupo também foram classificados em haplogrupos europeus.

O SNP rs2074518 que foi encontrado em uma frequência um pouco maior no grupo com histórico familiar com o alelo derivado “A” tem alta ocorrência do perfil “A/G” e mediana para “A/A” e “G/G”, em europeus.

Os polimorfismos que foram identificados em maior frequência no grupo com histórico de cardiopatias estão localizados nos genes SCN5A, KCNQ1 e KCNH2 que são os genes de canais iônicos e como já citado, são descritos na literatura como os mais relacionados a cardiopatias e MSC, e NOS1AP que também é muito relacionado a irregularidades cardíacas.

5.5. Correlação entre os haplogrupos do DNA mitocondrial das amostras de ossos e dente e a identificação dos SNPs relacionados à MSC

O SNP rs16857031 com o perfil “G/G” possui baixa frequência em europeus e foi identificado nas amostras OVB, CLV, HV e MLV. Os alelos “C/G” possuem frequência mediana e foram identificados na amostra MPV. Como mencionado anteriormente, este pode ser mais um indício de que, estes alelos não estejam relacionados à população de origem, mas sim, a um histórico familiar compatível com irregularidades cardíacas uma vez que estas amostras também foram classificadas em haplogrupos de origem europeia pelo DNAmT.

O SNP rs2074238 com o alelo derivado “T” não foi identificado na amostra MPV, que apresentou o perfil “C/C”, sendo este perfil muito comum em europeus.

6. Conclusões

As reações de PCR e SNaPshot em *multiplex* foram padronizadas permitindo à análise dos SNPs relacionados à MSC em *multiplex* de 8 SNPs;

Os dados obtidos demonstraram ser compatíveis com as frequências conhecidas dos SNPs; entretanto as análises não apresentaram diferenças significativas entre o grupo de indivíduos com histórico familiar de cardiopatias e controle;

Alguns SNPs apresentaram correlação com haplogrupos do cromossomo Y;
Para amostras de vestígios antigos (ossos e/ou dentes exumados) recomenda-se o uso de *monoplex* para análise desses SNPs;

Um fator hereditário foi identificado para o SNP rs4725982 em uma das famílias estudadas.

Referências

- ACHILLI, A. et al. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the franco-cantabrian glacial refuge was a major source for the european gene pool. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 75, p. 910-918, 2004.
- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 67, p. 44-61, 2000.
- ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.
- ANDREWS, R. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nat. Genet.**, v. 23, p.147, 1999.
- BABALINI, C. et al. The population history of the Croatian linguistic minority of Molise (southern Italy): a maternal view. **Europ. J. of Human Gen.**, v. 13, p. 902-912, 2005.
- BANDELT, H-J.; MacCAULAY, V.; RICHARDS, M. **Human mitochondrial DNA and the evolution of *Homo sapiens***. 2nd ed. Leipzig: Springer-Verlag. 2006. p. 153.
- BASSO, C. et al. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. **Cardiovasc. Res.**, v. 50, p. 290-300, 2001.
- BECKMANN, J. S.; ESTIVILL, X.; ANTONARAKIS, S. E. Copu number variants and genetic traits to the resolution of phenotypic to genotypic variability. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, p. 639-646, 2007.
- BELEZA, S. et al. Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. **Ann. Hum. Genet.**, v. 70, p. 181-194, 2006.
- BRIÓN, M. et al. Micro-geographical differentiation in northern Iberia revealed by Y-chromosomal DNA analysis. **Gene**, v. 329, p. 17-25, 2004.
- BRIÓN, M. et al. Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. **Int. J. Legal Med.**, v. 119, p. 10-15, 2005a.
- BRIÓN, M. et al. Introduction of an single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. **Electrophoresis**, v. 26, p. 4411-4420, 2005b.
- BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. **Annu. Rev. Genom. Human. Genet.**, v. 4, p. 119-141, 2003.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing**. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 243.

BUTLER, J. M.; LEVIN, B. C. Forensic applications of mitochondrial DNA. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 158-162, 1998.

CERRONE, M.; PRIORI, S. G. Genetics of sudden death: focus on inherited Channelopathies. **Europ. Heart J.** 2011. In press.

CHUGH, S. S.; KELLY, K. L.; TITUS, J. L. Sudden cardiac death with apparently normal heart. **Circulation**, v. 102, p. 649-654. 2000.

COHLE, S. D.; SAMPSON, B. A. The negative autopsy: sudden cardiac death or other? **Cardiovasc. Pathol.**, v. 10, p. 219-222, 2001.

DE KNIJFF, P. Messages through bottlenecks: on the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 67, p. 1055-1061, 2000.

EIJGELSHEIM, M. et al. Identification of a common variant at the *NOS1AP* locus strongly associated to QT-interval duration. **Hum. Mol. Genet.**; v. 18, n.2, p. 347-357, 2009.

GOMES, V. et al. Digging deeper into East African human Y chromosome lineages. **Hum. Genet.**, v. 127, p. 603-613, 2010.

GRANDMAISON, G. L. Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults? **F. Science Int.**, v. 156. p. 138-144, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nuc. Acids Symp. Ser.**, v. 41. p. 95-98, 1999.

HAMMER, M. F.; ZEGURA, S. L. The role of the Y chromosome in human evolutionary studies. **Evol. Anthropol.**, v.5, p.116-134, 1996.

HAMMER, M. F. et al. Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes. **J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 47-58, 2006.

HAMMER, M. F. et al. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. **Mol. Biol. Evol.**, v.18, p.1189-1203, 2001.

HINGORANI, A. D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**, v. 100, p. 1515-20, 1999.

- INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 25, p. 193-200, 2004.
- INGLES, J.; SEMSARIAN, C. Sudden cardiac death in the young. **Int. Med. J.**, v. 37, p. 32-37, 2007.
- JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. New uses for new haplotypes: the human Y chromosome, disease, and selection. **Trends Genet.**, v. 16, p. 356-362, 2000.
- KARAFET, T. et al. Paternal population history of East Asia: sources, patterns, and microevolutionary processes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 69, p. 615-628, 2001.
- KARAFET, T. et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. **Genome Res.**, v. 18, p. 830-838, 2008.
- KING, T. E. et al. Thomas Jefferson's Y chromosome belongs to a rare European lineage. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 132, p. 583-589, 2007.
- LEE, H. R.; JOHNSON, K. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 47, p. 281, 2006.
- LEE, H. Y. et al. mtDNA manager: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 483, 2008.
- LOREILLE, O. M. et al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Sci. International**, v. 1, p. 191-195, 2007.
- LUNA, A. B.; BAYNEÉS-GENIS, A.; GUINDO, J. Soldevila muerte súbita cardiaca. In: CONGRESO VIRTUAL DE CARDIOLOGIA, 1., 1997, Barcelona. **Resumen**...Barcelona, 1997. Disponível em: <<http://www.fac.org.ar/cvirtual/cvirtesp/cientesp/chesp/chc5703c/cbayes.htm>>. Acesso em: 20 set. 2011.
- LUTZ, S. et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? **Forensic Sci. Int.**, v. 113, p. 97-101, 2000.
- MARBAN, E. Cardiac channelopathies. **Nature**, v. 415, p. 213-218, 2002.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2471-2472, 2004.

MICHAUDA, K. et al. Molecular autopsy in sudden cardiac death and its implication for families: discussion of the practical, legal and ethical /aspects of the multidisciplinary collaboration. **Swissmedwky**, v. 13, p. 712-718, 2009.

NAKAYAMA, M. et al. T- 786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation**, v. 99, p. 2864-2870, 1999.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **dbSNP**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em: 21 set. 2011.

NEWTON-CHEH, C. et al. Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 399-406, 2009.

NUNN, L. M.; LAMBIASE, P. D. Genetics and cardiovascular diseasedcauses and prevention of unexpected sudden adult death: the role of the SADS clinic. **Heart**, v. 97, p. 1122-1127, 2011.

PANETO, G. G. **Análise de polimorfismo do DNA mitocondrial em indivíduos residentes na grande São Paulo para aplicação na identificação humana**. 2010. 92 f Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicados à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PINHEIRO, M. F. Genética e biologia forense, e criminalística. In: NOÇÕES GERAIS SOBRE OUTRAS CIÊNCIAS FORENSES MEDICINA LEGAL. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2004. 57 p.

PURANIK, R. et al. Sudden death in the young. **Heart Rhythm**, v. 2, p. 1277-1282, 2005.

ROBIN, E. D.; WONG, R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 136, p. 507-513, 1988.

RODRIGUEZ-CALVO, M. S. et al. Molecular genetics of sudden cardiac death. **Forens. Sci. Int.**, v. 182, p. 1-12, 2008.

SAAD, E. B. **Arritmia cardíaca**. Disponível em: <http://www.ritmiacardiaca.com.br/p_entendendo13.php>. Acesso em: 10 nov. 2011.

SALAS, A.; LAREU, M. V.; CARRACEDO, A. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. **Int. J. Legal Med.**, v. 114, p. 186-190, 2001.

SANDRIM, V. C.; REZENDE, V. B.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética. **Farmacog. Card.**, v. 39, p. 535-542, 2006.

SINGER-SAM, J.; TANGUAY, R.; RIGGS, A. D. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. **Amplifications: A Forum for PCR Users**, v. 3, p. 11, 1989.

SKALETISKY, H. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, p. 825-837, 2003.

SPLAWSKI, I. et al. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. **Science**, v. 297, p. 1333-1336, 2002.

TESTER, D. J.; ACKERMAN, J. Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? **Cardiovasc. Res.**, v. 67, p. 388-396, 2005.

TESTER, D. J.; ACKERMAN, J. The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 21, p. 166-172, 2006.

TESTER, D. J.; ACKERMAN, M. J. Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in Infants and children. **Annu. Rev. Med.**, v. 60, p. 69-84, 2009.

UNDERHILL, P. A. et al. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. **Ann. Hum. Genet.**, v. 65, p. 43-62, 2001.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ. Genome Bioinformatics Group. **In-Silico PCR**. Disponível em: <<http://genome.ucsc.edu/>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VIRMANI, R.; BURKE, A. P.; FARB, A. Sudden cardiac death. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 10, p. 275-282. 2001.

WERF, C. V. D. Diagnostic yield in sudden unexplained death and aborted cardiac arrest in the young: the experience of a tertiary referral center in the Netherlands. **Heart Rhythm**, v. 7, p. 1383, 2010.

WEVER, E. F.; DE MEDINA, E. O. R. Sudden death in patients without structural heart disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 43, n. 7, p. 1137-1144, 2004.

