

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

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

**“ANÁLISE PROSPECTIVA DO PADRÃO DE METILAÇÃO NOS GENES  
ASSOCIADOS A DOENÇAS CARDÍACAS SCN5A E MTR PARA  
APLICAÇÃO NA GENÉTICA FORENSE”**

**Cristiane Garcia Paulino**

Araraquara  
2013

CRISTIANE GARCIA PAULINO

**ANÁLISE PROSPECTIVA DO PADRÃO DE METILAÇÃO NOS GENES  
ASSOCIADOS A DOENÇAS CARDÍACAS SCN5A E MTR PARA  
APLICAÇÃO NA GENÉTICA FORENSE**

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  
2013

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo de esperanças, colocando pessoas excepcionais em meu caminho e guiando meus passos até aqui.*

*A Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicareli pela oportunidade de aprender a pesquisar. Obrigada pela paciência e orientação.*

*Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior e a Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga pela atenção e por aceitarem participar da Banca de Defesa, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.*

*Aos meus amigos de pós-graduação, que sempre estiveram presentes. Obrigada por todas as novas amizades, que com senso de humor ajudaram a transformar o desespero das horas em alegrias.*

*A Claudinha, em especial, obrigada pelo tempo que dedicou as minhas perguntas, exemplo de profissional e companherismo.*

*Aos funcionários do Instituto de Química, principalmente da secretaria de Pós-Graduação (sem pedidos de socorro desta vez, apenas gratidão).*

*A CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu a realização do mestrado.*

*A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.*

*Muito Obrigada!!!*

## DEDICATÓRIA

*É impossível chegar ao final de uma caminhada e não refletir em toda a jornada vivida, do início ao fim. Se hoje escrevo esta dissertação é porque durante toda a minha trajetória pessoas imprescindíveis foram meu porto seguro. Não poderia dedicar essa minha vitória a não ser para as pessoas que mais amo, respeito e admiro. Por isso, dedico esta conquista ...*

*Aos meus filhos, Lana e João Carlos por compreender as inúmeras vezes de minha ausência, sempre me incentivando através de seus sorrisos e nunca me deixando desanimar. Agradeço ainda mais, por me ensinarem todos os dias a ser mais feliz, mais paciente, mais forte....mais Mãe.*

*Aos meus pais, José Carlos e Aparecida pelo amor, carinho, apoio e por tudo que sempre fizeram por mim em todos os momentos da minha vida*

*Ao meu irmão Leandro e minha cunhada Gedaique, pelo incentivo, paciência e dedicação na formatação deste trabalho, onde o tempo era tão curto e minha expectativa tão grande.*

## RESUMO

Alterações súbitas ou prolongadas no meio ambiente podem ter influências deletérias na composição do código da vida, o (DNA). A epigenética é a visão moderna da nossa interação com o meio em que vivemos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, “morte súbita” é aquela que acontece até 24 horas desde o início da sintomatologia. A morte súbita de causa cardíaca, definida como uma morte natural inesperada em pessoas sem antecedentes cardiovasculares pré-conhecidos (com carácter fatal) revela-se, em todos os estudos efetuados até o momento, como a principal causa de morte na atividade física, podendo acometer tanto recém-nascidos como adultos. Diversos genes foram identificados em associação a SQT (síndrome do QT longo – doenças genéticas que causam arritmias cardíacas potencialmente fatais), onde 90% dos casos estão relacionados a mutações no gene responsável pelo canal de sódio *SCN5A* (locus LQT3) e no gene *MTR*. A metilação do DNA é uma alteração epigenética que atua na regulação da expressão gênica, e pode estar relacionada com a morte súbita de origem cardíaca. Na metilação do DNA ocorre a adição de um radical metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 de citosina geralmente seguida por guanina (dinucleotídeo CpG), catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Metodologias relativamente simples permitem o conhecimento da existência de metilação no DNA. O tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio converte as citosinas (C) não metiladas em uracilas (U), mas não afeta as citosinas (C) metiladas, procedendo a seguir à amplificação por PCR específica para metilação e sequenciamento dos produtos selecionados a partir do DNA tratado com bissulfito. Este estudo teve como objetivos investigar diferenças nos padrões de metilação que pudessem estar associados ao desenvolvimento e/ou recorrência das doenças cardiovasculares. Para tanto avaliou-se o padrão de metilação na região promotora dos genes *SCN5A* e *MTR*, conduzindo a metodologia de BSP (Bissulfite - sequencing PCR) em 50 amostras de DNA obtidas de sangue periférico de 25 indivíduos com história prévia de doenças cardiovasculares e 25 indivíduos saudáveis. Os nossos resultados mostraram que: 100% das 25 amostras de indivíduos saudáveis não apresentaram metilação na região promotora, 100% das 25 amostras de indivíduos cardiopatas apresentaram metilação na região promotora, com 68% dessas amostras metiladas no gene *MTR*. No conjunto, os resultados obtidos sugerem que as alterações epigenéticas podem ser consideradas fatores de risco para doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Morte Súbita Cardíaca. Metilação do DNA. Autópsia Molecular. Homocisteína. Epigenética.

## ABSTRACT

Prolonged or sudden changes in the environment may have deleterious influences on the content of the code of life, the (DNA). Epigenetics is the modern view of our interaction with the environment in which we live. According to the World Health Organization, "sudden death" is that which happens within 24 hours from the onset of symptoms. Sudden death from cardiac causes, defined as an unexpected natural death in people without cardiovascular history foreknown (with fatal character) shows up in all studies performed to date, as the leading cause of death in physical activity can affect both newborns and adults. Several genes have been identified in association with LQTS (long QT syndrome - genetic diseases that cause potentially fatal cardiac arrhythmias), where 90% of cases are related to mutations in the gene responsible for the sodium channel SCN5A (LQT3 locus) and the MTR gene. DNA methylation is an epigenetic modification that acts in the regulation of gene expression, and may be related to sudden cardiac death. DNA methylation occurs on the addition of a methyl group (CH<sub>3</sub>) carbon-5 of cytosine generally followed by guanine (CpG dinucleotide), enzyme catalyzed DNA methyltransferases (DNMTs). Methodologies allow relatively simple knowledge of the existence of DNA methylation. The treatment of genomic DNA with sodium bisulfite converts cytosine (C) at uracil unmethylated (U), but does not affect cytosines (C) methylated by making Following amplification by methylation specific PCR and sequencing of the products selected from DNA treated with bisulfite. This study aimed to investigate differences in methylation patterns that could be associated with the development and / or recurrence of cardiovascular diseases. Therefore we assessed the pattern of methylation in the promoter region of genes SCN5A and MTR, leading to BSP methodology (Bisulfite - sequencing PCR) in 50 DNA samples obtained from peripheral blood of 25 individuals with a history of cardiovascular disease and 25 individuals healthy. Our results showed that 100% of 25 samples from healthy individuals did not show methylation in the promoter region, 25% of the 100 samples from individuals with heart disease showed methylation in the promoter region, with 68% of samples methylated gene in MTR. Overall, the results suggest that epigenetic changes can be considered risk factors for cardiovascular disease.

**Keywords:** Sudden Cardiac Death. DNA methylation. Molecular autopsy. Homocysteine, Epigenetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo da Homocisteína	22
Figura 2 -	Incorporação do grupo CH <sub>3</sub> , no carbono 5 da citosina gerando a 5-metilcitosina, sendo este processo catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs)	27
Figura 3 -	Região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). Região promotora do gene com os fatores de transcrição ligados ao mesmo (B)	29
Figura 4 -	Região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). A metilação do DNA impede a transcrição do gene (B). Região promotora do gene com os repressores específicos ligados ao mesmo (C) impedindo a ligação de fatores transcricionais	30
Figura 5 -	Resultado da análise no BLAT mostrando que a sequência apresenta 100% de identidade com uma região de 2800 pb do cromossomo 3 onde esta localizado o gene <i>SCN5A</i>	44
Figura 6 -	Resultado da análise no BLAT mostrando que a sequência apresenta 100% de identidade com uma região de 8400 pb do cromossomo 1 onde esta localizado o gene <i>MTR</i>	45
Figura 7 -	Resultado da análise obtida pelo software “Methyl Primer Express”, utilizando a técnica BSP para análise da metilação no gene <i>SCN5A</i> . As setas indicam as regiões na sequência flanqueadas pelos primers	46
Figura 8 -	Resultado da análise obtida pelo software “Methyl Primer Express”, utilizando a técnica BSP para análise da metilação no gene <i>MTR</i> . As setas indicam as regiões na sequência flanqueadas pelos primers	47
Figura 9 -	Resultado da análise do “primer Foward” do gene <i>SCN5A</i> , com Tm de 57 °C	48
Figura 10 -	Resultado da análise do “primer Reverse” do gene <i>SCN5A</i> , com Tm de 56,4 °C	48
Figura 11 -	Resultado da análise do “primer Foward” do gene <i>MTR</i> , com Tm de 53,9 °C	49
Figura 12 -	Resultado da análise do “primer Reverse” do gene <i>MTR</i> , com Tm de 52,8 °C	49
Figura 13 -	Produto obtido da reação “in sílico” do gene <i>SCN5A</i> , mostrando o tamanho do fragmento amplificado (670 pb) pelo par de primers e a localização desta sequência no cromossomo 3	50

Figura 14 -	Produto obtido da reação “in silico” do gene <i>MTR</i> , mostrando o tamanho do fragmento amplificado (891 bp) pelo par de “primers” e a localização desta sequência no cromossomo 1	50
Figura 15 -	Gel de agarose contendo os produtos amplificados do gene <i>SCN5A</i> após tratamento com bissulfito. LD (Peso Molecular), C- (Controle Negativo), amostras (1A1, 1B1, 1C1 metiladas), (1A,1B,1C,1D,1E e 1F não metiladas). Os tamanhos dos produtos estão indicados em pares de base (pb)	51
Figura 16 -	Gel de agarose contendo os produtos amplificados do gene <i>MTR</i> . LD (Peso Molecular), C- (Controle Negativo), amostras (1A, 1B, não metiladas), (2A1, 2A2 ,2A3 e 2A4 metiladas). Os tamanhos dos produtos estão indicados em pares de base (pb)	51
Figura 17 -	Comparação das sequências metilada e não metilada com a sequência original do gene <i>SCN5A</i> (Sequência de referência NCBI : NC_000003.11) analisadas no programa BioEdit	52
Figura 18 -	Eletroferogramas das sequências metilada e não metilada do gene <i>SCN5A</i> .	52
Figura 19 -	Comparação das sequências metilada e não metilada com a sequência original do gene <i>MTR</i> (Sequência de referência NCBI : NC_000001.10) analisadas no programa BioEdit	53
Figura 20 -	Eletroferogramas das sequências metilada e não metilada do gene <i>MTR</i> .	53
Figura 21 -	Resultado das amostras do grupo coletado aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis na análise dos genes <i>SCN5A</i> e <i>MTR</i>	55
Figura 22 -	Resultado das amostras do grupo coletado aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis separados pelo sexo na análise dos genes <i>SCN5A</i> e <i>MTR</i>	56
Figura 23 -	Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas na análise dos genes <i>SCN5A</i> e <i>MTR</i>	57
Figura 24 -	Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene <i>SCN5A</i>	57
Figura 25 -	Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene <i>MTR</i>	58
Figura 26 -	Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene <i>MTR</i> e <i>SCN5A</i>	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Causas mais freqüentes de MSC em adultos	16
Tabela 2 -	Etiologia da hiperhomocisteinemia genética e não genética	20
Tabela 3 -	Descrição dos primers utilizados na PCR	39
Tabela 4 -	Concentração das amostras utilizadas na reação de seqüenciamento	41
Tabela 5 -	Relação dos resultados das amostras coletadas aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis	54
Tabela 6 -	Relação dos resultados das amostras coletadas de indivíduos cardiopatas	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHMT - Betaína homocisteína metiltransferase  
BSP - Bissulfite sequencing PCR  
CH<sub>3</sub> - Metil  
CpG - Citosina, fosfato, guanina  
DCV - Doenças Cardiovasculares  
DNA - Ácido Desoxirribonucléico  
DNMT - DNA metiltransferases  
ECG - Eletrocardiograma  
HMC - Homocisteína  
hHMC - Hiperhomocisteinemia  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
MAT - Metionina adenosil transferase  
Met - Metionina  
MBP - Methyl binding proteins  
MS - Metionina sintetase  
MSC - Morte Súbita Cardíaca  
MSI - Morte Súbita Inexplicável  
MSP - Methylation specific PCR  
5-mC - 5 metil citosina  
5-MTHF - 5 metil tetra hidrofolato  
5,10 - MeTHF - 5,10 Metileno tetra hidrofolato  
PSC - Parada Súbita Cardíaca  
SAH - S adenosilhomocisteína  
SAM - S adenosilmetionina  
SMSI - Síndrome da Morte Súbita Infantil  
SHMT - Serina hidroximetiltransferase  
THF - Tetra hidrofolato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	Morte Súbita Cardíaca	14
1.1.1	Significado atual da morte cardíaca súbita na comunidade	15
1.1.2	Espectro de etiologias de morte cardíaca súbita	15
1.2	Análise genética pós-morte (autópsia molecular)	18
1.3	Prevenção das Doenças Cardíacas	19
1.4	Homocisteína	21
1.4.1	Efeitos na HMC	23
1.4.2	Fatores nutricionais	24
1.4.3	Idade	24
1.4.4	Sexo	24
1.5	Epigenética	25
1.5.1	Metilação do DNA	27
1.6	Métodos para avaliação de padrões de metilação no DNA	30
1.7	Metilação e Nutrientes	31
1.8	Seleção dos genes	32
1.8.1	<i>SCN5A</i>	32
1.8.2	<i>MTR</i>	32
1.9	Uso forense do padrão de metilação	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	34
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	35
3.1	Casuística	35
3.2	Coleta das amostras biológicas	35
3.3	Identificação das sequencias-alvo e desenho dos primers	35
3.4	Extração de DNA	36
3.4.1	Extração por Chelex	36
3.4.2	Quantificação	37
3.5	Modificação do DNA por Bissulfito	37
3.6	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	38
3.7	Gel de Agarose	40
3.8	Purificação dos produtos da PCR	40
3.9	Sequenciamento	40
3.9.1	Purificação da reação de sequenciamento	42
3.10	Análise das amostras no sequenciador ABI 310 (Applied Biosystems by Life Technologies)	42
3.10.1	Análise das sequências obtidas	43

<b>4</b>	<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Morte Súbita Cardíaca

Nos próximos anos, as doenças cardiovasculares (DCV) serão as principais causas de morte em todo mundo, tendo papel indiscutível na morbidade e mortalidade do mundo ocidental, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A cardiopatia isquêmica e o acidente vascular cerebral são e serão, de acordo com as projeções para o ano 2020, as principais causas de morte. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, que estão despreparados frente ao aumento dos fatores de risco, será de fundamental importância a prevenção primária (MANSUR *et al.*, 2001).

A partir de dados obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Sistema de Informação em Mortalidade do Ministério da Saúde (Banco de Dados do Sistema Único de Saúde – Datasus), estudando homens e mulheres com doença circulatória e idade igual ou acima de 30 anos, foi possível observar no período de 1979 a 1996, que o coeficiente médio de mortes em mulheres foi de 439,58/100 mil habitantes por ano (MANSUR *et al.*, 2001).

É fato, que a mulher na menopausa, apresenta maior risco em relação a DCV, atribuindo-se a redução gradual ou abrupta dos estrogênios. A deficiência estrogênica se associa com alterações significativas no metabolismo lipoproteico, ocorrendo aumento importante nas concentrações de colesterol sérico nos anos que se seguem à menopausa. Prevenir ou reduzir este aumento do colesterol está associado a uma redução no risco para doenças cardiovasculares (EGGER *et al.*, 2004).

Uma importante consequência nesta população de pacientes com doença arterial coronária e insuficiência cardíaca será o aumento na incidência de morte súbita. Como resultado, a morte súbita cardíaca (MSC) terá que ser confrontada como um problema mundial compartilhado e indiscriminado.

Morte súbita cardíaca (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 (KERR *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços atuais na ciência de ressuscitação, a sobrevivência à Parada Súbita Cardíaca (PSC) permanece baixa mesmo em países desenvolvidos (EGGER *et al.*, 2004).

No fim do século 20, a consciência desta importante deficiência focou um interesse considerável nos mecanismos de MSC. Apesar do novo enfoque, o atraso significativo no desenvolvimento de medidas efetivas de estratificação de risco e prevenção de MSC pode ser atribuído diretamente ao pobre entendimento dos mecanismos envolvidos na arritmogênese fatal, particularmente em nível amplo da comunidade (MANSUR *et al.*, 2001).

### **1.1.1 Significado atual da morte cardíaca súbita na comunidade**

O primeiro estágio do processo de confronto de qualquer condição de doença da comunidade é acessar a magnitude do problema. Por muitas razões, isto é difícil de cumprir no caso de MSC. Primeiro, se não testemunhada, os indivíduos devem ter sido observados vivos 24 horas antes da morte. Além disso, quando possível, é importante excluir indivíduos com probabilidade de ter uma causa não cardíaca de morte súbita, tal como pacientes que possam ter tido uma embolia pulmonar extensa que levou à parada cardíaca ou os que sofrem de doença maligna conhecida que não está em remissão. Em segundo lugar, uma estimativa acurada da incidência de MSC requer um estudo prospectivo de casos determinados. Os estudos retrospectivos que utilizaram uma metodologia baseada na certidão de óbito como identificação dos casos de MSC provavelmente superestimaram significativamente a incidência de MSC em até 200-300% (MANSUR *et al.*, 2001).

### **1.1.2 Espectro de etiologias de morte cardíaca súbita**

Mutações nos genes codificadores dos canais iônicos cardíacos podem perturbar o delicado equilíbrio de correntes iônicas que regulam a ação potencial e causar arritmias com risco de vida sem que se apresentem 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).

GIROLDO (2007) descreve as patologias cardíacas mais citadas na literatura como causas de morte súbita em adultos (Tabela 1):

**Tabela 1** - Causas mais frequentes de MSC em adultos

<b>Doenças Cardiovasculares</b>
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

O achado clínico mais comum associado com MSC é a doença arterial coronária e aproximadamente 80% dos casos de morte súbita cardíaca são atribuídos a esta condição. Outros 10-15% ocorrem em pacientes que têm miocardiopatia, tais como miocardiopatia hipertrófica, miocardiopatia dilatada, displasia arritmogênica do ventrículo direito e doenças infiltrativas do miocárdio (sarcoidose, amiloidose). Os 5-10% restantes são compostos tanto de condições relacionadas a corações com alterações estruturais congênitas (anomalias de coronárias, doenças cianóticas/ não cianóticas) como pacientes com coração estruturalmente normal, mas com anormalidades elétricas. Além das doenças genéticas relativamente raras, tais como, síndrome do QT longo, síndrome de Brugada e taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica, os pacientes com MSC autópsia-negativa (sem anormalidades genéticas identificadas) podem

compreender uma maior parte deste subgrupo do que o antecipado previamente (GIROLDO *et al.*, 2007).

A despeito do amplo espectro de condições etiológicas, a grande maioria dos casos de morte súbita cardíaca resultam de uma arritmia fatal, tanto taquicardia/fibrilação ventricular ou bradicardia severa /atividade elétrica sem pulso (OKRAINEC *et al.*, 2004).

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 (MANSUR *et al.*, 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 (OKRAINEC *et al.*, 2004).

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 pode estar ligada a canalopatias (LIEVERS *et al.*, 2003).

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 (PIMENTA DE FRANÇA, 2008).

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 (MANSUR *et al.*, 2001).

## 1.2 Análise genética pós-morte (autópsia molecular)

Em muitos dos casos a causa de morte pode ser estabelecida devido a anormalidades cardíacas evidentes na autópsia. 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 (CARRACEDO *et al.*, 2010).

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 (CARRACEDO *et al.*, 2010). O trabalho de PURANIK e colaboradores (2005) comenta que grande parte de mortes súbitas envolvendo crianças e jovens adultos não apresenta 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 (GIROLDO *et al.*, 2007). No entanto, uma análise genética pós-morte ou autópsia molecular como também é conhecida atualmente, pode potencialmente substanciar a base patogênica para a MSI (CHUGH *et al.*, 2004).

As causas da MSC diferem conforme a idade. Na população adulta a causa de maior frequência é a coronariopatia (MANSUR *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 (BEAULOYE *et al.*, 2007). 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 frequentes de arritmias letais (GIROLDO *et al.*, 2007).

Causas não isquêmicas de MSC são de grande importância porque muitas vezes incluem doenças genéticas (GIROLDO *et al.*, 2007), especialmente em jovens. 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 morfológicamente 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 (ACKERMAN *et al.*, 2001).

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 (DOLINSKY & PEREIRA, 2007).

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 (CARRACEDO *et al.*, 2010).

### **1.3 Prevenção das Doenças Cardíacas**

Entre as estratégias de prevenção primária das DCV (Doenças Cardiovasculares) destacam-se as mudanças no estilo de vida, entre elas a redução na ingestão de gordura saturada, controle do peso corporal e prática de atividade física. Estas mudanças são enfatizadas em todos os níveis de risco (baixo, médio e alto). Prevenir ou reduzir este aumento do colesterol está associado a uma redução no risco para doenças cardiovasculares (MANSUR *et al.*, 2001).

Recentemente tem-se reconhecido outro fator de risco metabólico para doença vascular, a hiperhomocisteinemia. Elevado nível de homocisteína (HMC) plasmática representa também um fator de risco, independente de outros fatores,

apresentando um efeito potencializador quando associado à hipertensão, ao tabagismo e ao *diabetes mellitus*. (STOVER & CAUDILLI, 2008).

As várias formas de hiperhomocisteinemia são causadas por defeito(s) genético(s) ou não genéticos(s), ou pela combinação de ambos os fatores (ver Tabela 2).

Os níveis plasmáticos normais de homocisteína são controlados pela conversão enzimática da homocisteína em metionina ou em cistationina. Estas reações são dependentes de sistemas enzimáticos específicos e que necessitam das vitaminas que atuam como coenzimas: vitaminas B12, B6, e ácido fólico (AYDIN *et al.*, 2009).

A suplementação com ácido fólico e vitaminas B6 e B12, reduzem os níveis de homocisteína pelo aumento da função enzimática.

**Tabela 2** – Etiologia da hiperhomocisteinemia genética e não genética

Hiperhomocisteinemia genética	Hiperhomocisteinemia não genética (nutricional)
Deficiência da atividade da enzima cistationina sintetase: mutação homozigótica e heterozigótica	Diminuição da atividade da enzima cistationina sintetase devido à diminuição sérica da concentração de piridoxina
Deficiência da atividade da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR): mutação severa heterozigótica e homozigótica e MTHFR termolábil	Diminuição da atividade da MTHFR devido à diminuição da concentração sérica de folato ou tetrahydrofolato
Deficiência da atividade da enzima metionina sintetase devido à depleção de metilcobalamina	Diminuição da atividade da enzima metionina sintetase devido à diminuição da concentração sérica de vitamina B12
	Diminuição da atividade da metiltransferase homocisteína-betaína devido à diminuição da concentração de colina
	Síntese aumentada de homocisteína devido à elevada ingestão de metionina

FONTE: CASTRO, 2006

Níveis séricos elevados de homocisteína estão associados à defeitos congênitos do tubo neural, como também, defeitos congênitos do coração, abortos, e outras complicações da gravidez (CASTRO *et al.*, 2006).

Além disso, outras observações realizadas mostram que os altos níveis de homocisteína estão associados com aterosclerose, coagulação e doença vascular no indivíduo adulto (MANSUR *et al.*, 2002).

BENNOUAR e colaboradores (2007) detectaram hiperhomocisteinemia em 42% dos pacientes com doença cerebrovascular, 28% com doença vascular periférica e 30% com doença vascular coronariana.

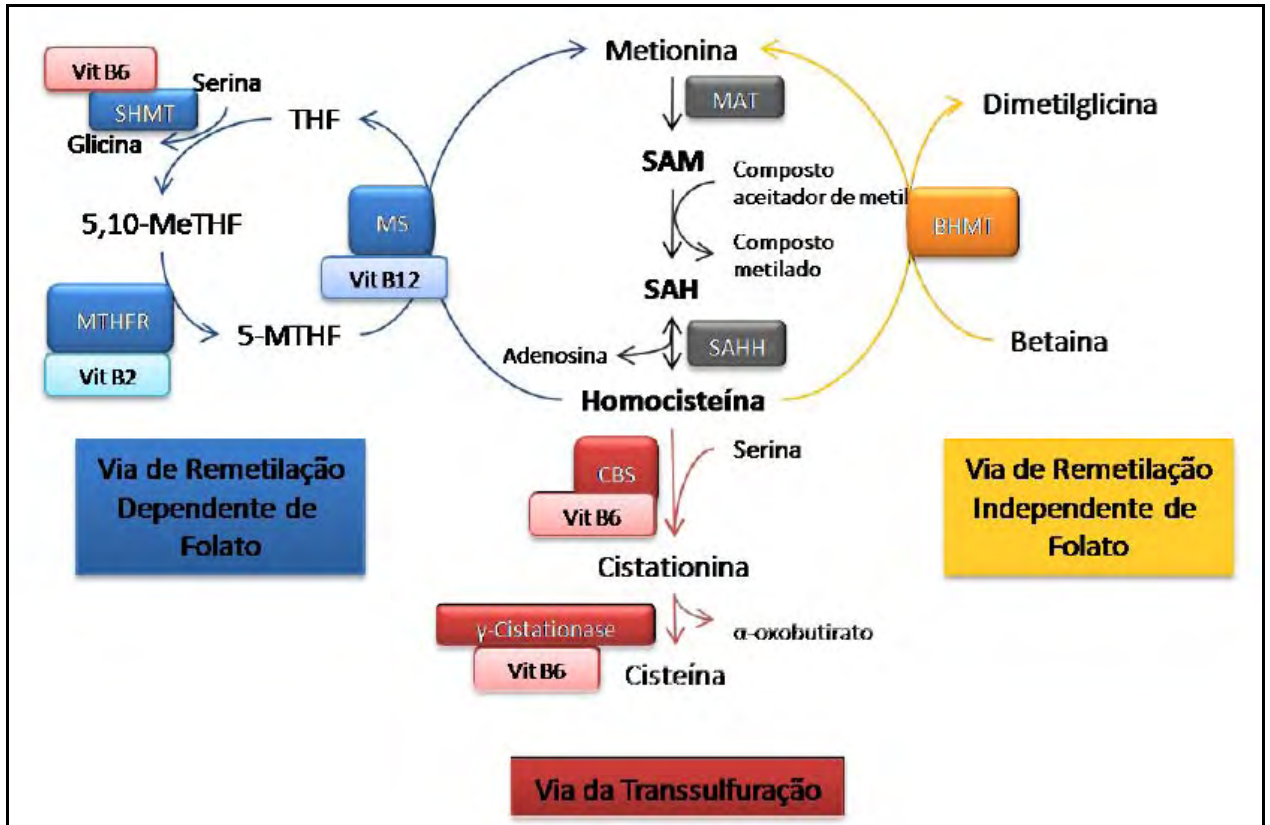
#### **1.4 Homocisteína**

A homocisteína (HMC) é um aminoácido com grupo SH (grupo sulfidrílo), formado exclusivamente a partir da metionina proveniente da dieta alimentar ou do catabolismo deste mesmo aminoácido (BEAULOYE *et al.*, 2007). Em 1960, a HMC assume relevância clínica com a descrição de uma perturbação metabólica rara no metabolismo da Metionina – a homocistinúria (níveis elevados de HMC no plasma e na urina). Contudo, foi em 1969 que McCully estabeleceu, pela primeira vez, a relação entre HMC e doença vascular ao observar, *post-mortem*, artérias com graves lesões ateroscleróticas em pacientes com índices de HMC severa. Os níveis plasmáticos de HMC considerados normais estão compreendidos entre 5 e 15  $\mu\text{M}$ ; valores superiores conduzem ao estado de hiperhomocisteinemia (hHMC). A hHMC classifica-se em moderada, intermédia ou severa dependendo dos valores acumulados de HMC se encontram entre 16 - 30, 31-100 ou  $>100 \mu\text{M}$ , respectivamente (STOVER & CAUDILLI, 2008).

A produção de HMC inicia-se através de uma reação de transmetilação, na qual o aminoácido essencial metionina é convertido num composto altamente energético, S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 1). A formação de SAM é catalisada pela enzima metionina adenosil-transferase (MAT), com gasto de uma molécula de ATP. SAM é o dador universal de grupos metil na célula, transferindo-a, por ação de metiltransferases, para inúmeros substratos (incluindo DNA e proteínas) e resultando na formação de S-adenosil-homocisteína (SAH). A SAH é então hidrolisada pela enzima SAH hidrolase, resultando na formação de adenosina e HMC (VAN DEN VEYVER, 2002).

O metabolismo da HMC compreende duas vias alternativas: a via da transsulfuração e a via da remetilação.

Figura 1 - Metabolismo da Homocisteína



Fonte: VAN DEN VEYVER, 2002

### I. Via de transsulfuração

A HMC é irreversivelmente metabolizada pela via da transsulfuração (Figura 1). Esta via ocorre essencialmente no fígado e rim e inicia-se com a condensação da HMC com uma serina, formando cistationina, numa reação catalisada pela cistationina β-sintase (CBS). A cistationina é posteriormente clivada em cisteína (Cys) e α-oxobutirato pela γ-cistationase (VAN DEN VEYVER, 2002).

## II. Via de Remetilação

Alternativamente, a metionina (Met) na HMC pode ser remetilada através da via da remetilação, utilizando o 5-metil-tetra-hidrofolato (5-MTHF) ou a betaína como doadores de grupos metil, esta remetilação pode ser dependente ou independente de folato, respectivamente (Figura 1). Na via de remetilação dependente de folato a enzima metionina sintase (MS) utiliza a vitamina B como co-factor para catalisar a transferência do grupo metil do 5-MTHF para a HMC formando-se metionina e tetra-hidrofolato (THF). Nesta via, o metabolismo da HMC encontra-se diretamente associado ao ciclo do folato. A enzima MS é a única fonte de produção de THF e este pode ser ainda convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MeTHF) pela serina hidroximetiltransferase (SHMT), que recorre à vitamina B6 como co-factor, o qual é posteriormente reduzido a 5-MTHF pela enzima 5,10-metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) e vitamina B2 (VAN DEN VEYVER, 2002).

A via de remetilação independente de folato utiliza a enzima betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) para catalisar a transferência do grupo metil da betaína (intermediário da oxidação da colina) para a HMC formando-se metionina e dimetilglicina. A enzima BHMT é expressa principalmente no rim e fígado, ao contrário da MS que é expressa em praticamente todas as células (VAN DEN VEYVER, 2002).

### 1.4.1 Efeitos na HMC

Mais recentemente surgiu a hipótese de que a Hiperhomocisteinémia (hHMC) pode induzir alterações epigenéticas responsáveis pelo aparecimento da disfunção endotelial. A disfunção endotelial é atualmente considerada como passo chave no desenvolvimento do processo aterosclerótico. Quando o endotélio perde a capacidade de manter a homeostase vascular, instalam-se as condições apropriadas para este ser invadido por lípidos e leucócitos; a resposta inflamatória é incitada e surgem estrias lipídicas, o primeiro passo na formação da aterosclerose. Se a situação persistir, as estrias lipídicas progredem e a placa fica

exposta à ruptura, predispondo o endotélio à ocorrência de trombogênese e oclusão vascular (REVILLA *et al.*, 2009).

Vários estudos, de longo prazo, demonstraram que os indivíduos com HMC elevada apresentavam um risco 3 a 4 vezes maior para infarto agudo do miocárdio, comparativamente com aqueles que apresentavam níveis normais. Outros cientistas demonstraram que até 40% dos pacientes com história de acidente vascular cerebral e/ou doenças cardiovasculares, exibem concentrações elevadas de HMC no sangue (EGGER *et al.*, 2004).

#### **1.4.2 Fatores nutricionais**

As causas mais frequentes da HMC média e da HMC moderada são as deficiências em vitaminas, que são necessárias ao metabolismo da HMC, enquanto co-factores. Na verdade, as concentrações plasmáticas de HMC revelam uma correlação inversa com as concentrações plasmáticas de vitamina B12 e de folatos (CIACCIO *et al.*, 2008). A associação mais consistente foi observada em casos cujas concentrações de folatos, no plasma, eram inferiores ao normal (BALLANTYNE *et al.*, 2001).

#### **1.4.3 Idade**

As concentrações plasmáticas de HMC aumentam progressivamente ao longo da vida, quase duplicando, desde a infância até a velhice (BJORKE & UELAND, 2006). O declínio da função renal e uma ingestão inadequada de vitaminas, poderão estar associados ao aumento da concentração de HMC na terceira idade (CASTRO *et al.*, 2006) e estima-se que, cerca de 55% dos idosos apresentam uma deficiência em, pelo menos, uma das três vitaminas envolvidas no metabolismo da HMC (KERR *et al.*, 2009).

#### **1.4.4 Sexo**

Um elevado número de estudos populacionais, estabeleceu inequivocamente, a associação entre concentrações de HMC elevadas em

indivíduos do sexo masculino (BATES *et al.*, 2002), sugerindo que, os fatores que conferem um elevado risco de HMC diferem entre homens e mulheres.

Na tentativa de explicar este fenômeno foram realizados estudos que sugeriram que os estrogênios diminuía as concentrações plasmáticas de HMC (BATES *et al.*, 2002). Vários estudos propuseram que os estrogênios comprometeriam o catabolismo da metionina e, conseqüentemente, influenciariam as concentrações de HMC; todavia, não é conhecido o mecanismo preciso através do qual os estrogênios poderão afetar o metabolismo da HMC (WATERLAND, 2006). Outros autores sugeriram também, que as velocidades de remetilização e transmetilização seriam superiores em mulheres na fase de pré-menopausa, quando comparadas com as dos homens. Provavelmente este fenômeno seria ocasionado por diferenças na atividade das enzimas (MS e BHMT) entre os dois sexos (CASTRO *et al.*, 2006).

### **1.5 Epigenética**

Epigenoma é o resultado da interação entre o genoma e o ambiente, representado na estrutura da cromatina e no padrão de metilação do DNA (ROTHSTEIN *et al.*, 2009). Epigenética, por sua vez, representa mudanças na expressão gênica possíveis de serem herdadas na meiose e mitose, que não são codificadas pela seqüência de nucleotídeos do DNA (ADCOCK *et al.*, 2007).

É uma área da genética que estuda alterações na função gênica que não estão relacionadas a alterações na seqüência primária do DNA, o que permite que células com o mesmo genoma, tenham fenótipos distintos, podendo ser transmitidas hereditariamente no genoma durante a divisão celular (BIRD, 2002).

O atual desenvolvimento tecnológico possibilitou o sequenciamento do genoma humano e de vários genomas. Entretanto, apenas o conhecimento da seqüência de bases do DNA não basta para responder às várias questões existentes. Os processos epigenéticos diferentemente da genética, na qual há a transmissão de informações com base em seqüências de genes (JONES & LAIRD, 1999), são dinâmicos e fortemente influenciados pelo ambiente e pela

exposição a fatores externos como dieta, condições de vida, exercício, estresse, substâncias químicas, drogas e toxinas.

As alterações epigenéticas são herdáveis e reversíveis, afetando a conformação espacial do DNA e sua atividade transcricional, garantindo, dessa forma, a manutenção da estabilidade e integridade do DNA. Tal processo leva à alteração do fenótipo sem alteração na sequência de bases do DNA, podendo gerar formas diversificadas de expressão, resultando em diferentes fenótipos (SZYF, 2003). As alterações epigenéticas ocorrem durante o desenvolvimento do organismo, sendo reproduzidas durante a replicação do DNA (VERCELLI, 2004).

Na década de 90 poucos sabiam o significado da palavra epigenética e a maioria dos cientistas acreditava que a essência de todas as doenças humanas estava relacionada à variação da sequência de DNA (JONES & LAIRD, 1999). Os mecanismos epigenéticos regulam muitos processos celulares direta ou indiretamente e são processos críticos na resposta celular ao ambiente e estímulos endógenos (JONES & LAIRD, 1999). Dependendo da área em que o estudo é realizado, o fator ambiental pode ter diferentes significados. Para psicólogos e sociólogos, é a conjunção da interação entre grupos sociais, dinâmica familiar e cuidados maternos. Nutricionistas têm em mente a pirâmide alimentar e suplementos dietéticos, enquanto que toxicologistas poderiam pensar nos poluentes do ar, solo e água. Assim, o ambiente como um todo é capaz de alterar a expressão de genes e mudar o fenótipo (JONES & LAIRD, 1999).

Existem vários mecanismos epigenéticos conhecidos e, entre eles, as mudanças na conformação da cromatina, as modificações de histonas e a metilação do DNA.

A regulação da expressão gênica por mecanismos epigenéticos é um processo dinâmico, sendo que o seu *status* pode ser mudado, regulando a transcrição gênica em conjunto com fatores de transcrição (VERCELLI, 2004). Assim, a metilação do DNA, algumas formas metiladas de histonas e a condensação da cromatina estão associadas à inacessibilidade ao DNA e sua consequente repressão ou silenciamento (CHO *et al.*, 2004). Por sua vez, o DNA não metilado, formas acetiladas de histonas e cromatina aberta estão geralmente

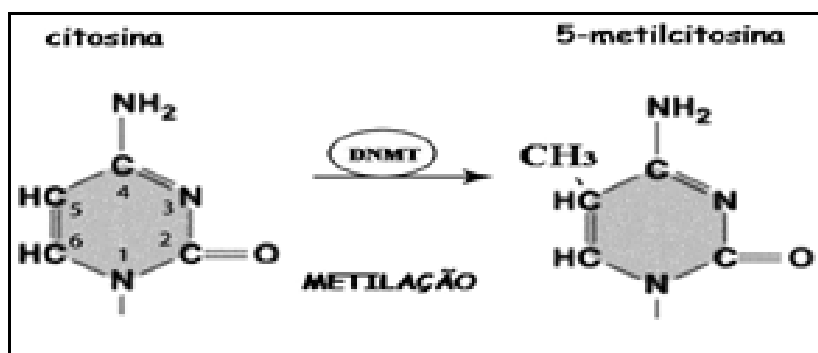
associados com a ativação ou expressão de determinado gene. Esses fatores afetam a transcrição gênica, provocando mudanças no fenótipo, sem as correspondentes alterações de genótipo (VERCELLI, 2004).

Apesar de ser potencialmente hereditário, diferentemente da informação codificada pelas sequências de nucleotídeos, o código epigênico pode ser modificado ao longo da vida da célula permitindo que alterações ocorram (FITZPATRICK & WILSON, 2003). Alterações epigênicas estão associadas a diversas doenças.

### 1.5.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma alteração epigenética que ocorre pela adição covalente de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ), no carbono 5' do anel de citosina, resultando em uma 5-metilcitosina (5-mC) (BIRD, 2002), como se pode observar na Figura 2. Porém, a maioria das citosinas presentes no genoma não está metilada. Esse processo não afeta a sequência primária de bases do DNA, mas resulta em uma alteração conformacional do mesmo (GEHRING *et al.*, 2009).

**Figura 2** - Incorporação do grupo  $\text{CH}_3$ , no carbono 5 da citosina gerando a 5-metilcitosina, sendo este processo catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs)



Fonte: LAIRD, 2006

A metilação do DNA pode interferir na expressão gênica de pelo menos três formas: 1) afetando diretamente a adesão de ativadores ou repressores da transcrição; 2) inibindo a transcrição através de proteínas de adesão à citosina metilada, que se liga especificamente ao DNA metilado; 3) alterando a estrutura da cromatina, influenciando na acessibilidade ao gene (ARMENANTE *et al.*, 1999).

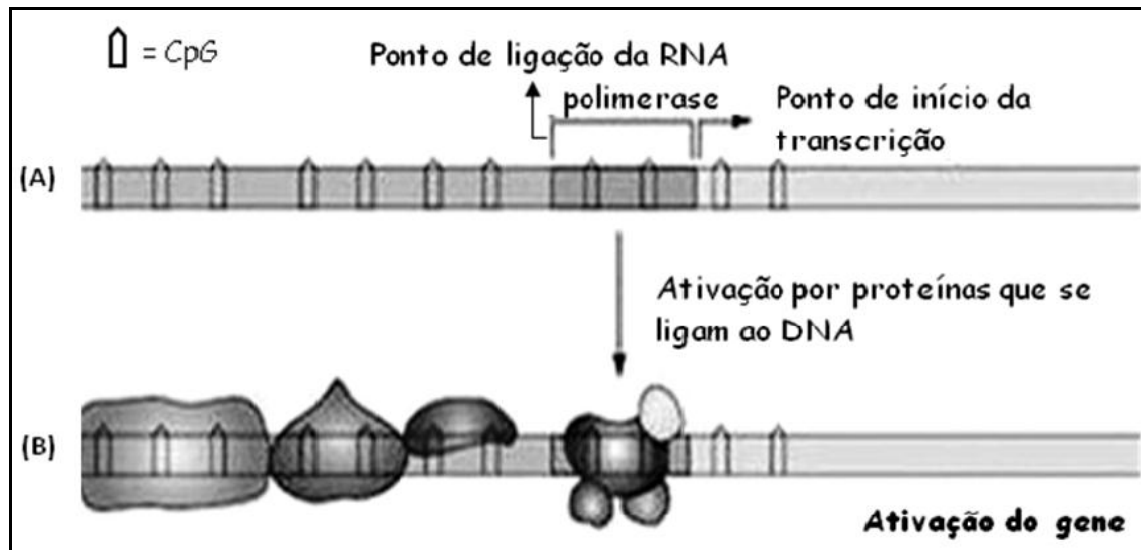
O processo de metilação é catalisado por uma família de enzimas, denominada DNA-metiltransferases (DNMT), que transferem um grupamento metil para o carbono 5 do anel da citosina, utilizando como doador de metil, a S-adenosilmetionina (SAM). A DNMT catalisa a transferência do grupo metil do SAM para o DNA resultando em um DNA metilado e em uma S-adenosilhomocisteína (SAH), produto da SAM sem o metil (VAN DEN VEYVER, 2002).

Para que ocorra o processo de metilação é necessário que a citosina esteja na sequência 5' – CG - 3', conhecida como dinucleotídeo CpG, embora Imamura e colaboradores (2005) observaram metilações em citosinas que não estavam presentes em sítios CpGs.

Conforme Miranda & Jones (2007), as sequências metiladas dentro do genoma podem ser classificadas em dois grupos diferentes: regiões pobres em CpGs e Ilhas CpGs. Uma ilha CpG (CG ou CpG, onde p representa o grupo fosfato) é definida como uma região de DNA, maior que 200pb, com um conteúdo de GC acima de 0,5 e a razão da frequência entre o observado e o esperado de CpG (ob/esp) maior que 0,6 (LAIRD, 2003). Estima-se que o genoma humano apresenta aproximadamente 29.000 ilhas CpG (BIRD, 2002) e 50-60% destas ilhas estão localizadas próximas à região promotora de genes ativos podendo também se estender para dentro do primeiro éxon (LAIRD, 2003).

A importância funcional das ilhas CpG dentro dos promotores está associada com a repressão transcricional dos genes (LONG & CAI, 2007). Quando não metilada, os fatores de transcrição têm livre acesso aos seus sítios de ligação na região promotora, ocorrendo assim a transcrição do gene. A Figura 3 esquematiza a região promotora do gene, as ilhas CpG e os fatores de transcrição.

**Figura 3 -** Região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). Região promotora do gene com os fatores de transcrição ligados ao mesmo (B)

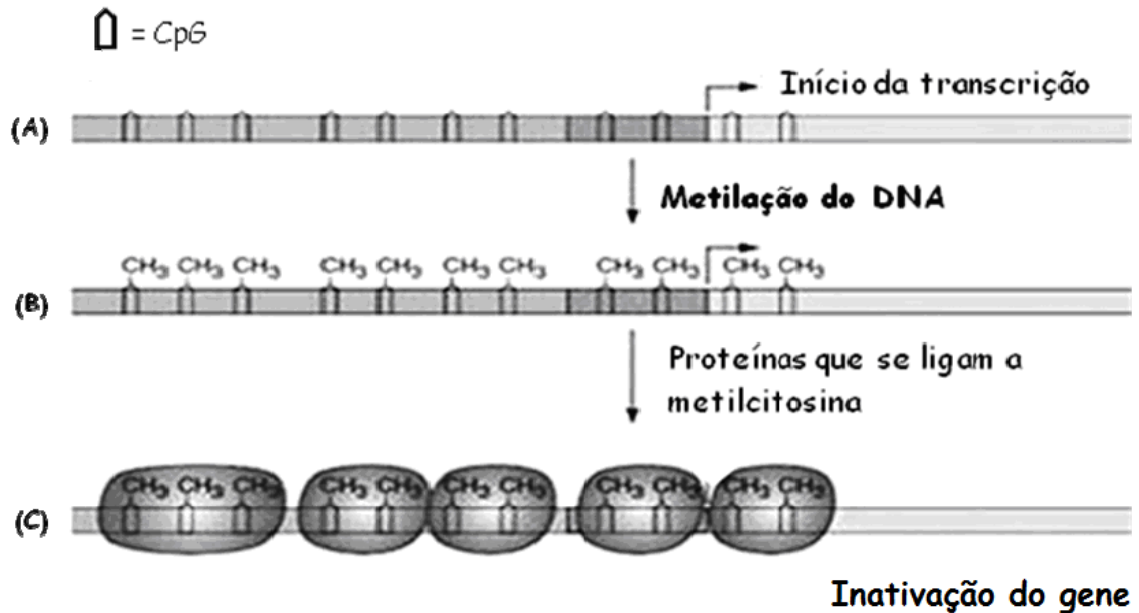


Fonte: LONG, 2007

A metilação das ilhas CpG das regiões promotoras está relacionada com a regulação da expressão gênica por impedir a ligação de elementos fundamentais ou fatores de transcrição na cadeia de DNA. Portanto, a metilação do DNA impede a transcrição do gene e caracteriza-se como um mecanismo regulatório da expressão gênica, como se pode observar na Figura 4 (LONG & CAI, 2007).

A interferência na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento na região promotora e a ligação de repressores específicos de transcrição ao DNA metilado como, por exemplo, as MBP (*Methyl binding proteins*) e as proteínas da família MBD (proteínas ligadoras de domínio metil), impedem a ligação de fatores transcricionais (ROBERTSON, 2005). A Figura 4 esquematiza a região promotora do gene e as ilhas CpG em uma situação metilada do DNA, com o impedimento da ligação dos fatores de transcrição e com a consequente inativação do gene.

**Figura 4 -** Região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). A metilação do DNA impede a transcrição do gene (B). Região promotora do gene com os repressores específicos ligados ao mesmo (C) impedindo a ligação de fatores transcritoriais



Fonte: ROBERTSON, 2005

Existem evidências mostrando que algumas doenças humanas podem estar associadas a alterações no padrão de metilação, afetando diferentes tecidos corporais, como em doenças neurodegenerativas, autoimune, cardiovasculares, entre outras (PLASS, 2002).

### 1.6 Métodos para avaliação de padrões de metilação no DNA

As primeiras análises da metilação do DNA em loci específicos gênicos só foram possíveis com o advento das enzimas de restrição sensíveis a metilação em conjunto com a análise por "Southern blotting". No entanto, o estudo da metilação do DNA obteve um grande avanço com a conversão das bases do DNA pelo bissulfito de sódio (LAIRD, 2003).

Na década de 1970, descobriu-se que o bissulfito de sódio mediava a deaminação de citosina. Esta substância promove a deaminação de citosinas não metiladas, transformando-as em uracilas. Por outro lado, as citosinas metiladas

permanecem como citosinas, pois o grupamento metil protege contra a reação de deaminação (COSTELLO & PLASS, 2001).

A digestão com as enzimas de restrição foi usada em técnicas que visam uma análise global de metilação do DNA no genoma, como RLGS “restriction landmark genomic scanning”, MCA “methylated CpG island amplification”, DMH “differential methylation hybridization” e MS-APPCR “methylation-sensitive arbitrarily primed PCR” (LAIRD, 2003).

A conversão do DNA genômico pelo bissulfito de sódio é utilizada em um grande número de técnicas para a análise da metilação do DNA: MSP “methylation specific-PCR”, MS-SNuPE “methylation-sensitive single nucleotide primer extension”, COBRA “combined bisulphite restriction analysis” ,além do BSP “bissulfite-sequencing PCR” (LAIRD, 2003).

Associando a utilização do bissulfito de sódio à PCR, surgiu a PCR sensível à metilação (“Methylation sensitive PCR” - MSP) que consiste na utilização de dois pares de “primers” específicos para DNA metilado ou não, que irão se complementar conforme o padrão de metilação da amostra, permitindo a detecção de DNA metilado ou desmetilado (WANG *et al.*, 1995).

Além disso, existe a possibilidade de associação do tratamento com o bissulfito de sódio à PCR e sequenciamento, onde é possível verificar cada CG susceptível a metilação do “amplicon” gerado, tornando essa metodologia mais precisa na avaliação do padrão de metilação de DNA (LONG & CAI, 2007).

### **1.7 Metilação e Nutrientes**

Os componentes dos alimentos tem a capacidade de influenciar a metilação do DNA em pelo menos três vias diferentes (ROSS, 2007). Primeiro, a dieta é importante para fornecer e regular o suprimento de grupos metil disponíveis para a formação do S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil. Segundo, a dieta modifica a utilização dos grupos metil, incluindo mudanças na atividade das DNA metiltransferase (DNMT). Finalmente, o padrão de metilação do DNA pode influenciar na resposta aos nutrientes por meio de regulação de genes

(ativando ou silenciando) que influenciam na absorção ou alteram o sítio de ação para os componentes bioativos da dieta (ROSS, 2007).

Para manter a metilação apropriada do DNA pela DNMT e SAM, observou-se que as vitaminas B2, B6 e B12 são requeridas para a metilação do DNA funcional induzidas pela SAM a partir da metionina. Assim, os indivíduos com excesso ou depleção de metionina seriam candidatos aos protocolos terapêuticos de intervenção dietética, para a restauração dos padrões específicos de metilação do DNA (WATERLAND, 2006).

## **1.8 Seleção dos genes**

### **1.8.1 *SCN5A***

O gene *SCN5A* pertence a uma família de genes chamados SCN (canais de sódio), o qual está associado com vários distúrbios de condução, entre eles da morte súbita infantil e síndrome de QT longo. Estes canais transportam átomos carregados positivamente de sódio (ions de sódio) em células, que desempenham um papel-chave na capacidade de gerar e transmitir sinais elétricos. Ao alterar as propriedades elétricas destas células, os canais de sódio desempenham um papel importante na sinalização do início de cada batimento cardíaco, a coordenação das contrações das câmaras superior e inferior do coração, e manutenção de um ritmo cardíaco normal. O gene *SCN5A* está localizado no cromossomo 3, a partir dos pares de base 38,589,552 até o par de base 38,691, 163 (ACKERMAN *et al.*, 2001).

### **1.8.2 *MTR***

O gene 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase (*MTR*) codifica a enzima metionina sintetase. Esta enzima desempenha um papel importante no processamento de aminoácidos. Especificamente, a metionina sintetase realiza uma reação química que converte o aminoácido homocisteína para outro aminoácido chamado metionina. O organismo humano usa metionina para produzir proteínas e outros compostos importantes. Para funcionar adequadamente, a metionina sintetase requer metilcobalamina (uma forma de vitamina B12) e outra

enzima chamada metionina sintetase, que é produzida a partir do gene *MTRR* (WATKINS *et al.*, 2002).

Embora seja pouco conhecida a variação da atividade da enzima metionina sintetase, existe uma hipótese de que a metilação neste gene possa elevar os níveis de homocisteína no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares. O gene *MTR* está localizado no cromossomo 1, a partir dos pares de base 236.958.580 até o par de base 237.067.280 (WATKINS *et al.*, 2002).

### **1.9 Uso forense do padrão de metilação**

Estudos envolvendo padrões de metilação do DNA apresentam um potencial promissor nos avanços em genética forense. Esse processo funciona como um regulador da expressão gênica, ou seja, genes que se encontram metilados possuem uma expressão muito reduzida podendo, portanto, levar a uma modificação do fenótipo do indivíduo, mas que não está associada a mudanças na sequência de DNA (ZHAO *et al.*, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

Analisar o padrão de metilação do DNA nas regiões promotoras dos genes *SCN5A* e *MTR* relacionados com doenças cardíacas. Essas análises poderão auxiliar futuramente a realização de autópsias moleculares, um novo campo de estudo da genética forense.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Casuística**

Avaliar um grupo de 50 indivíduos, sendo: 25 com doenças cardiovasculares previamente confirmadas, e outros 25 que não apresentam qualquer tipo de cardiopatia, a fim de verificar a contribuição da metilação para o fenótipo alterado na tentativa de correlacionar os resultados laboratoriais aos achados clínicos.

#### **3.2 Coleta das amostras biológicas**

Foram coletadas amostras de sangue venoso de 25 indivíduos com doenças cardiovasculares confirmadas (indivíduos de famílias que possuem histórico de algum problema cardíaco ou com familiar que já sofreu ataque cardíaco); estas famílias foram selecionadas pelo médico cardiologista Dr. José Antonio Caracciolo da Clínica CEDCOR de Araraquara. Os outros 25 indivíduos não apresentavam cardiopatia aparente ou fatores associados à sua ocorrência (controles).

Para a análise molecular, as amostras de sangue foram coletadas em papel FTA (*Whatman*) e até o momento da extração, os cartões FTA foram mantidos à temperatura ambiente. O material foi obtido após esclarecimento aos familiares sobre a pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre-esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP recebendo o número CEP/FCF/CAr. n. 11/2011).

#### **3.3 Identificação das sequencias-alvo e desenho dos primers**

A sequência original do gene *SCN5A* e *MTR* foi obtida no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e analisada pelo software Promoter (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) para obter a região promotora. Com as sequências específicas dos genes realizou-se a busca no banco de dados do genoma humano com o software BLAT ([www.genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html](http://www.genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html)) para obtenção das sequências completas. No intuito de averiguar a incidência e possíveis padrões de conservação de elementos repetitivos, as sequências foram analisadas com o programa RepeatMasker

([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)) e comparadas no banco de dados de sequências de DNA humano.

As sequências dos “primers” a serem utilizados nas metodologias de PCR para avaliação da modificação do DNA pelo bissulfito, como MSP e BSP, foram desenhadas com base na sequência do DNA após o tratamento com o bissulfito.

Os “primers” foram preliminarmente desenhados no software “Methyl Primer Express” disponível gratuitamente no site da Applied Biosystems.

Também foi utilizado o software “GeneRunner”, para realizar ajustes nas sequências, evitando-se a formação de estruturas secundárias, como dímeros e “loops”. Finalmente, foram realizadas reações de PCR “in silico” (<http://genome.ucsc.edu/>) com os “primers” desenhados, com o objetivo de verificar o tamanho dos produtos das regiões amplificadas.

### **3.4 Extração de DNA**

#### **3.4.1 Extração por Chelex**

O protocolo da Extração por *Chelex* (por amostra) utilizado está descrito a seguir: Em tubo de 1,5 mL, colocou-se 2 discos de papel contendo a amostra (sangue), adicionou-se 50 µL de água ultrapura (MiliQ) submetendo-se ao vortex. Em seguida, a água foi descartada, adicionou-se mais 50 µL de água ultrapura e incubando-se à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, a amostra foi centrifugada por 1 minuto (14.000 rpm - rotações por minuto) descartando-se a água. Adicionou-se, então, 100 µL de Chelex 5% incubando-se por uma hora a 56 °C. Em seguida, a amostra foi vortexada e incubada por 8 minutos a 100 °C. Para finalizar, centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Ao fim da extração, cada uma das amostras foi quantificada e armazenada a -20 °C.

### 3.4.2 Quantificação

Imediatamente após a extração, a amostra de DNA foi submetida à análise de sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260nm no espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Scientific 2000). Este aparelho quantifica o DNA de cadeia dupla (entre outros) de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A \times \epsilon}{b}$$

onde **C** é a concentração de DNA em ng /  $\mu$ L, **A** a absorbância (neste caso a 260 nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA),  **$\epsilon$**  o coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50ng/  $\mu$ L) e **b** a altura da coluna no espectrofotômetro.

### 3.5 Modificação do DNA por Bissulfito

A conversão por bissulfito foi realizada utilizando o Kit “Cells to CpG” da Life technologies - Applied Biosystems, testando-se a ciclagem mais apropriada para as condições das amostras.

Para melhores resultados, o reagente de conversão presente no kit, foi preparado imediatamente antes de executar a conversão por bissulfito. Após o preparo, seguiu-se a etapa de desnaturação do DNA, realizada conforme o protocolo: foram pipetados 45  $\mu$ L da amostra e transferidos para tubos de 0,2 ml, adicionou-se 5  $\mu$ L de reagente “Desnaturation” e agitou-se previamente em vortex; em seguida as amostras foram incubadas a 50 °C por 10 minutos.

Para converter as citosinas não metiladas em uracilas adicionou-se 100  $\mu$ L do reagente de conversão para as amostras desnaturadas, para um total de reação de 150  $\mu$ L.

As amostras foram incubadas utilizando a seguinte ciclagem:

TEMPERATURA	TEMPO
65 °C	30 minutos
95 °C	30 segundos
65 °C	30 minutos
95 °C	30 segundos
65 °C	30 minutos
4 °C	∞

Para remoção de sais e grupos sulfônicos utilizou-se o mesmo kit, seguindo o protocolo: foi dado um pulso na coluna em microcentrifuga a 10.000 rpm por 1 minuto, adicionou-se 600 µL de “Binding Buffer” a amostra convertida (150 µL), fechou-se o tubo para inverter a coluna centrifugando durante 1 minuto e descartando os reagentes que passaram pela coluna.

Para remoção de sais foram adicionados 600 µL de ‘Wash Buffer’ a coluna realizando uma nova centrifugação por 1 minuto.

Para desulfonação do DNA, foram adicionados 200 µL de “Desulfonation Reagent” a coluna, fechando-se o tubo que permaneceu à temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 15 minutos; a seguir, realizou-se uma centrifugação por 1 minuto seguida da adição de 400 µL de “Wash Buffer”; centrifugou-se novamente por 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 40 µL de “Elution Buffer” no centro desta, que ficou novamente em temperatura ambiente por 2 minutos; a seguir foi realizada outra centrifugação por 1 minuto e as amostras convertidas foram armazenadas a - 4 °C.

### **3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As PCR foram realizadas em tubos de 0,2 ml.

A preparação do mix para a PCR foi efetuada conforme o número de amostras a amplificar e o volume foi dividido nos microtubos correspondentes. As reações com os iniciadores (Tabela 3) foi realizada em um volume final de 25 µL e

contendo 100 ng de DNA, 0,3 U de Taq, 10X PCR buffer, 1µL DNTP Mix, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de cada primer (10 pmol/µL).

O conjunto de primers utilizados está descrito na tabela seguinte.

**Tabela 3** – Descrição dos primers utilizados na PCR.

<b>Nome</b>	<b>[ ] (pmol/ µL)</b>	<b>Sequencia</b>	<b>pb</b>	<b>Amplificação</b>
SCN5AF	10	AAGTGGAGGAGATGGAGG	18	670 pb
SCN5AR	10	ATCCTCTTCTTCACCACCT	19	670pb
MTRF	10	GGTGATTGGTTGATATTGA	19	891pb
MTRR	10	CAAAAAAAAAAACTTCCA	18	891pb

### **Programa de ciclagem da PCR**

#### *SCN5A*

96 °C por 5 minutos  
 94 °C por 30 segundos  
 56 °C por 30 segundos  
 68 °C por 1 minuto  
 68 °C por 10 minutos  
 4 °C ∞

} 39 ciclos

#### *MTR*

96 °C por 5 minutos  
 94 °C por 30 segundos  
 52.5 °C por 30 segundos  
 68 °C por 1 minuto  
 68 °C por 10 minutos  
 4 °C ∞

} 39 ciclos

### **3.7 Gel de Agarose**

Os produtos de cada PCR foram analisados em gel de 0,8% agarose. A cada amplificação foi realizada uma reação com controle negativo, utilizando 1  $\mu$ L da solução resultante da extração de DNA em papel FTA (Whatman), para tanto foram utilizados dois discos de FTA sem amostra em cada eppendorf.

### **3.8 Purificação dos produtos da PCR**

Os produtos de PCR foram purificados previamente à realização da reação de sequenciamento para retirada dos nucleotídeos não incorporados e excesso de iniciadores, utilizando *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. Após a purificação dos produtos de PCR, as amostras purificadas foram quantificadas (ng/ $\mu$ L) em NanoDrop Thermo Scientific 2000. As amostras que não estavam na concentração mínima para realização do sequenciamento (1 a 40 ng de produto de PCR purificado, dependendo do *primer* utilizado) foram concentradas (o DNA foi desidratado por 3 minutos em speed-vac e ressuspensão em 10 $\mu$ L de água Mili-Q), e armazenadas sob refrigeração até o momento do uso.

### **3.9 Sequenciamento**

Após amplificação por PCR, as amostras foram sequenciadas para confirmar a conversão do DNA e especificidade dos primers.

O mix para o sequenciamento foi preparado com os seguintes reagentes:

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade por amostra</b>
Água autoclavada	Completar para 10µL
Buffer 5X	1,75 µL
Primer (3,2 picomolar)	1,0 µL
Big Dye Terminator v. 3.1	1,25 µL
Volume do MIX	8,5 µL
Amostra	*
Volume Total	10,0 µL

\*A quantidade da amostra a ser colocada depende da concentração da mesma e do tamanho do fragmento a ser seqüenciado (Tabela 4).

**Tabela 4** – Concentração das amostras utilizadas na reação de sequenciamento

<b>Fragmento (pb)</b>	<b>Concentração (ng/µL)</b>
100 – 200	1 a 3
200 – 500	3 a 10
500 – 1000	5 a 20
1000 – 2000	10 a 40
> 2000	40 a 100

Nota: O volume do produto de PCR purificado que deve ser utilizado na reação de sequenciamento foi calculado de acordo com o tamanho do fragmento (pares de base – pb) e da concentração (nanogramas por microlitros ng/µL). Na análise do gene *SCN5A* o tamanho do fragmento esperado é de 670 pb, para o gene *MTR* o tamanho esperado é de 891 pb .

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) utilizando-se a ciclagem:

96 °C por 1 minuto  
96 °C por 10 segundos  
56 °C por 10 segundos  
60 °C por 4 minutos  
4 °C ∞

} 25 ciclos

### 3.9.1 Purificação da reação de sequenciamento

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados para retirada de nucleotídeos não incorporados através da técnica de precipitação com etanol/EDTA conforme o protocolo: adicionou-se 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol absoluto (100 %) ao produto da reação de sequenciamento (no mesmo tubo em que a reação de sequenciamento foi realizada), homogeneizando e transferindo toda a mistura para um novo tubo de 1,5 mL. A mistura foi deixada no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos, e posteriormente foi centrifugada por 30 minutos a 3000 g em centrífuga (Eppendorf Centrifugeal 5417R). O tubo foi invertido cuidadosamente sobre papel absorvente para que o sobrenadante fosse descartado. Em seguida, adicionou-se lentamente 60 µL de etanol 70% (preparado no momento do uso) nas paredes do tubo e uma nova centrifugação foi feita por 15 minutos a 1650g a 4°C (Eppendorf Centrifugal 5417R), vertendo-se o sobrenadante cuidadosamente sobre papel absorvente. O tubo foi armazenado no escuro para secagem por aproximadamente 24 horas e armazenado em freezer a -20°C até o uso (no máximo uma semana).

### 3.10 Análise das amostras no sequenciador ABI 310 (Applied Biosystems by Life Technologies)

Cada amostra foi ressuspensa conforme descrito: adicionou-se ao tubo de 1,5 mL, 10 µL de Formamida HI – DI (Applied Biosystems by Life Technologies) e o tubo foi agitado, durante 3 minutos. A seguir, deu-se um pulso (centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos) (Eppendorf Centrifugal 5417R) e todo conteúdo do

tubo de 1,5 mL foi transferido para a placa. A placa, onde a amostra foi aplicada, também foi submetida a um pulso e aquecida a 95 °C em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) com a tampa aberta por 3 minutos. Em seguida, a placa foi colocada em gelo por aproximadamente 3 minutos e submetida à eletroforese capilar em sequenciador *ABI 310* (Applied Biosystems by Life Technologies)

### **3.10.1 Análise das sequências obtidas**

As sequências foram analisadas no programa *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e comparadas à sequência padrão obtida no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As sequências dos genes *SCN5A* e *MTR* obtidas do banco de dados NCBI foram submetidas à análise do programa Promoter Prediction Server. Este software prevê sítios de início de transcrição de promotores de vertebrados utilizando-se de dois métodos: (1) Métodos baseados em padrões (buscam a presença ou ausência de sequências reguladoras para a detecção de características como “start” e “stop” códons). (2) Métodos comparativos (comparam a sequência analisada com outras sequências presentes em bancos de dados, com o objetivo de determinar se uma sequência já conhecida está presente em uma dada região analisada).

A seguir, foram analisadas as regiões promotoras, utilizando uma busca no Blat (Figura 5 e 6), ferramenta de bioinformática que analisa por similaridade as sequências genéticas.

**Figura 5 -** Resultado da análise no BLAT mostrando que a sequência apresenta 100% de identidade com uma região de 2800 pb do cromossomo 3 onde esta localizado o gene *SCN5A*

BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SFAN
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	42	2691	2769	2800	77.0%	1	-	14997263	14997340	78
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	53	2691	2769	2800	83.6%	1	-	54177973	54178051	79
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	55	2691	2776	2800	91.4%	1	-	23550270	23550355	86
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	46	2693	2769	2800	80.3%	1	-	100295067	100295142	76
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	47	2690	2768	2800	79.8%	1	-	171164919	171164997	79
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	21	2700	2726	2800	59.2%	1	+	175684171	175684197	27
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	49	2716	2783	2800	81.0%	1	+	203116681	203116744	64
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	44	2681	2768	2800	72.7%	1	+	208464623	208464708	86
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	32	2700	2765	2800	78.2%	1	+	239814951	239815016	66
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	39	2700	2768	2800	87.3%	2	-	14903706	14903773	68
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	35	2689	2770	2800	87.2%	2	+	29706268	29706347	80
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	23	2751	2776	2800	96.2%	2	+	80543042	80543068	27
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	39	2692	2768	2800	75.4%	2	-	84722025	84722101	77
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	36	2713	2768	2800	82.2%	2	+	104938018	104938073	56
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	26	2691	2726	2800	86.2%	2	-	119321150	119321185	36
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	228	1733	2200	2800	82.6%	2	+	165947278	165947748	471
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	302	1575	2200	2800	79.8%	2	-	166245246	166245874	629
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	38	2691	2779	2800	90.7%	2	-	166322703	166322790	88
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	255	1698	2200	2800	83.2%	2	+	166848520	166848825	506
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	142	1977	2200	2800	81.7%	2	+	167084044	167084267	224
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	49	2692	2771	2800	81.3%	2	+	171249132	171249667	536
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	38	2689	2768	2800	97.5%	2	-	197488214	197488294	81
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	32	2716	2779	2800	85.0%	2	-	15411854	15411916	63
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	43	2690	2768	2800	73.1%	2	+	16334608	16334685	78
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	2800	1	2800	2800	100.0%	3	+	38890743	38893542	2800
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	177	1691	2200	2800	82.6%	3	+	30739904	30740023	300
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	311	1473	2266	2800	71.1%	3	+	38888417	38889186	770

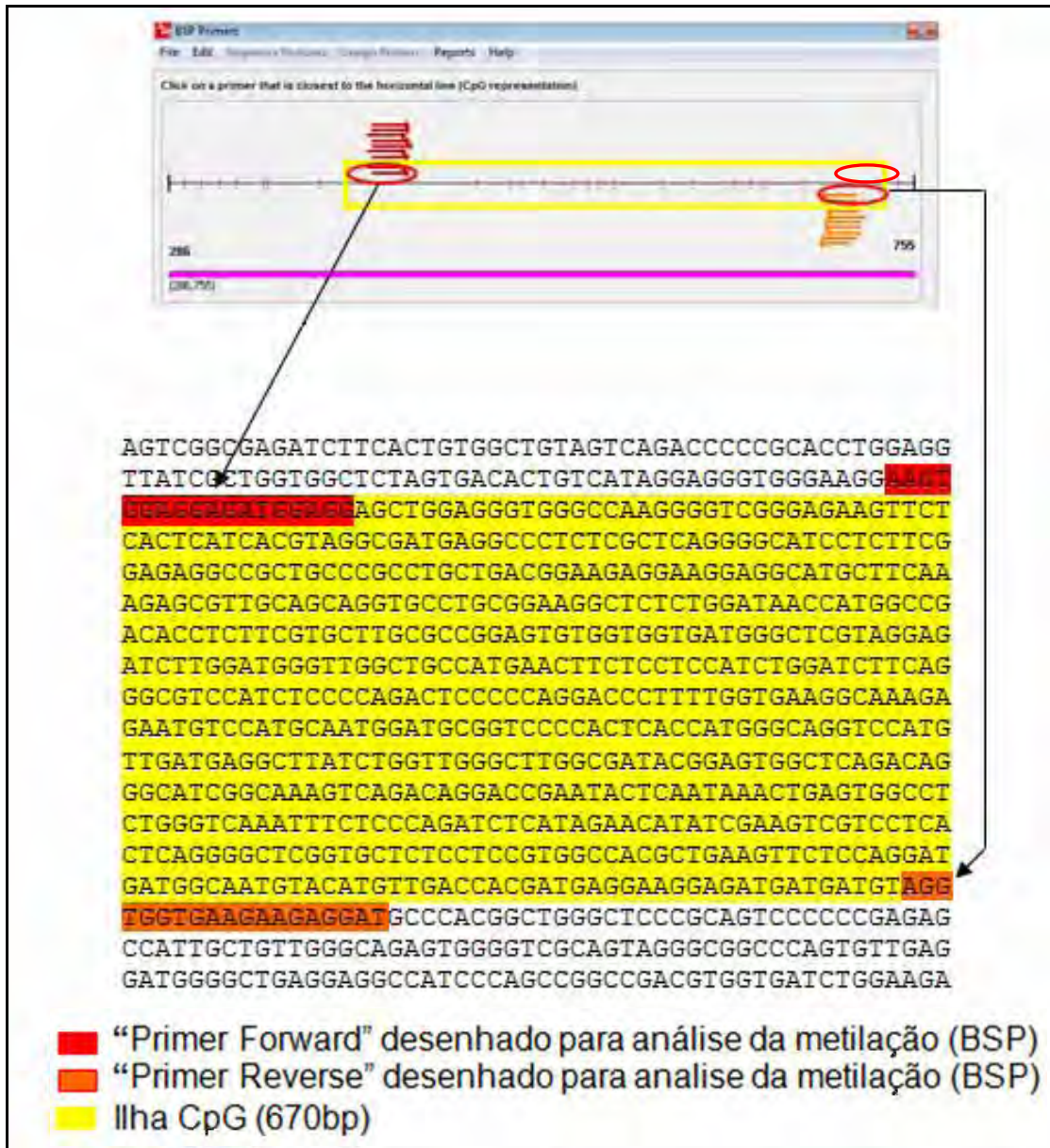
**Figura 6 -** Resultado da análise no BLAT mostrando que a sequência apresenta 100% de identidade com uma região de 8400 pb do cromossomo 1 onde esta localizado o gene *MTR*

BLAT Search Results											
ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	156	2397	2654	8400	92.0%	1	-	10002016	10002274	259
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	179	2407	2658	8400	94.6%	1	+	12506201	12506453	253
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	77	3938	4133	8400	82.4%	1	+	43386907	43387101	195
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	101	3914	4108	8400	83.0%	1	-	59283019	59283212	194
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	199	2408	2687	8400	90.9%	1	+	64042220	64042818	599
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	36	4083	4137	8400	74.6%	1	-	80245343	80245393	51
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	194	2390	2671	8400	91.5%	1	-	81574256	81574552	297
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	193	2392	2647	8400	91.5%	1	-	94123545	94123809	265
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	176	2420	2697	8400	89.7%	1	+	116793637	116794228	592
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	95	3843	4033	8400	83.4%	1	+	154253232	154253414	183
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	161	2432	2655	8400	90.5%	1	-	168843862	168844086	225
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	88	3957	4133	8400	90.5%	1	-	182169110	182169285	176
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	114	2398	2538	8400	91.4%	1	-	235258202	235258823	622
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	40	2604	2648	8400	95.6%	1	-	235258538	235258614	77
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	120	3855	4137	8400	85.2%	1	+	236110852	236111436	585
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	8400	1	8400	8400	100.0%	1	+	236958581	236966980	8400
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	172	2408	2643	8400	89.8%	1	+	239848852	239849087	236
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	141	2398	2655	8400	90.8%	2	-	44373144	44373402	259
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	139	3850	4119	8400	83.3%	2	-	73015667	73015928	262
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	117	3861	4058	8400	83.4%	2	+	87767756	87767955	200
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	114	3856	4114	8400	83.5%	2	+	118671165	118671423	259
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	121	3837	4142	8400	86.0%	2	-	136539361	136539663	303
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	73	3895	4144	8400	86.9%	2	+	170253880	170254131	252
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	93	4004	4137	8400	82.7%	2	+	197596280	197596403	124
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	72	4015	4142	8400	86.2%	2	-	201859442	201859740	299
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	91	2572	2684	8400	91.9%	2	+	204138426	204138677	252
<a href="#">browser details</a>	YourSeq	139	2401	2654	8400	90.7%	2	+	204634988	204635242	255

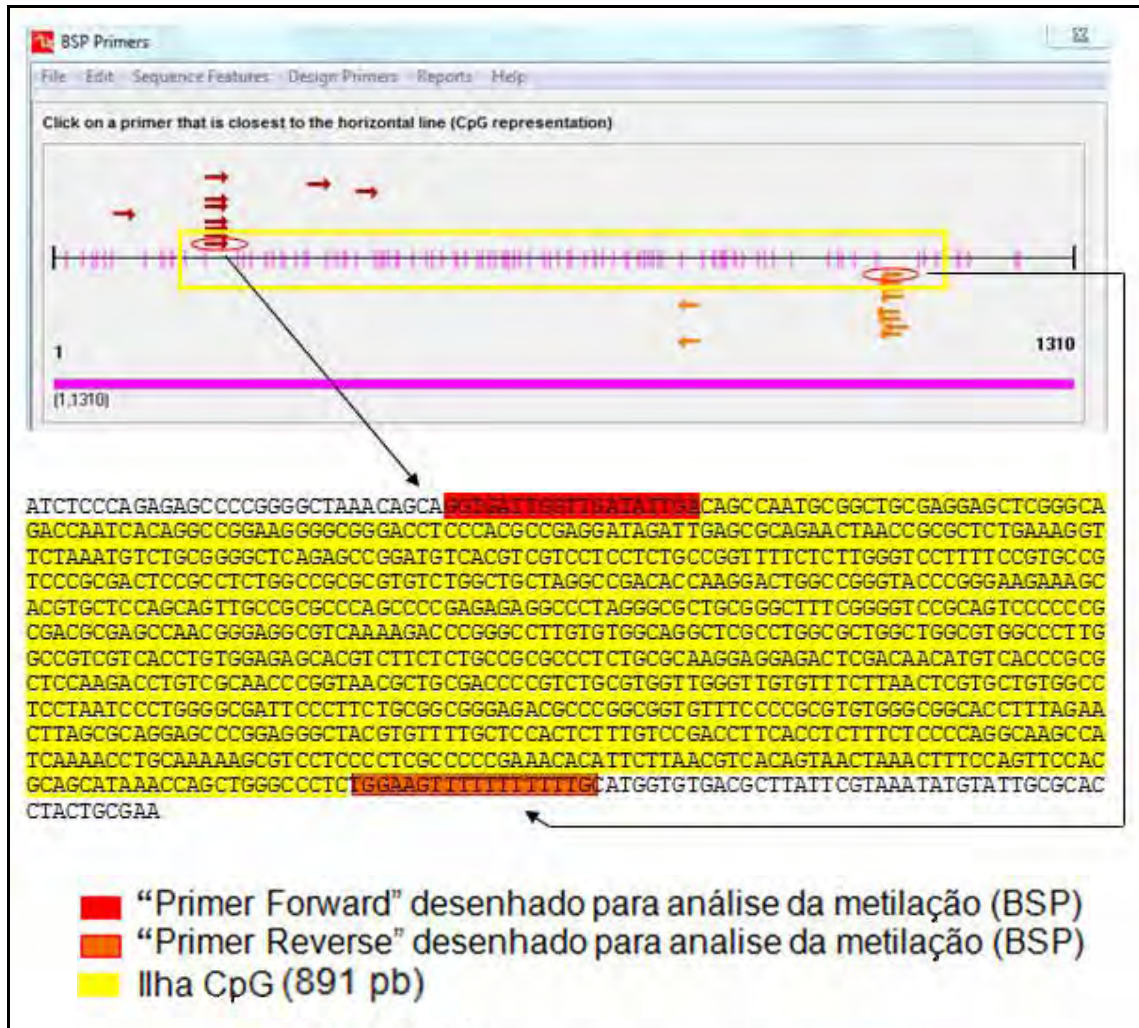
Em seguida as regiões de baixa complexidade (regiões com sequências de bases nitrogenadas muito repetidas) foram identificadas e excluídas por meio do programa RepeatMasker.

O programa Methyl Primer Express também foi utilizado para desenhar os primers pelo método BSP (Figura 7 e 8). Para a identificação das ilhas CpG, foram usados os seguintes parâmetros: examinou-se o conteúdo de GC e a razão entre o observado e o esperado, baseando-se na definição de uma ilha CpG como uma região de DNA maior do que 200bp, com um conteúdo de GC acima de 0,5 e a razão da frequência entre o observado e o esperado de CpG maior que 0,6.

**Figura 7 -** Resultado da análise obtida pelo software “Methyl Primer Express”, utilizando a técnica BSP para análise da metilação no gene *SCN5A*. As setas indicam as regiões na sequência flanqueadas pelos primers

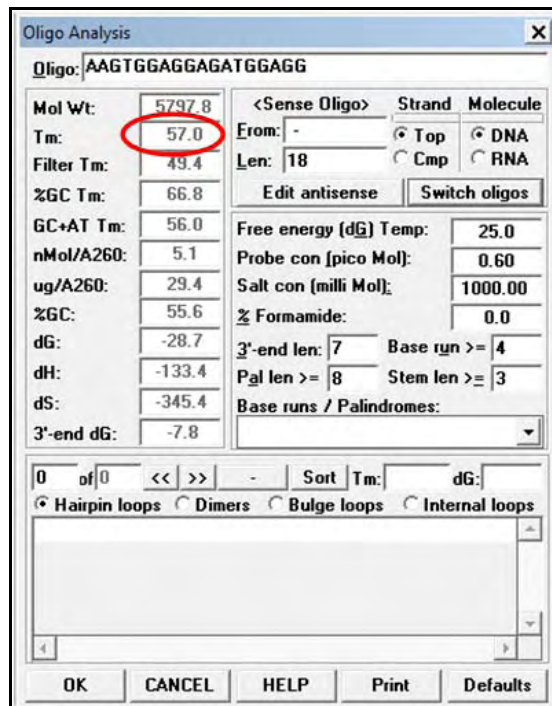


**Figura 8** - Resultado da análise obtida pelo software “Methyl Primer Express”, utilizando a técnica BSP para análise da metilação no gene *MTR*. As setas indicam as regiões na sequência flanqueadas pelos primers

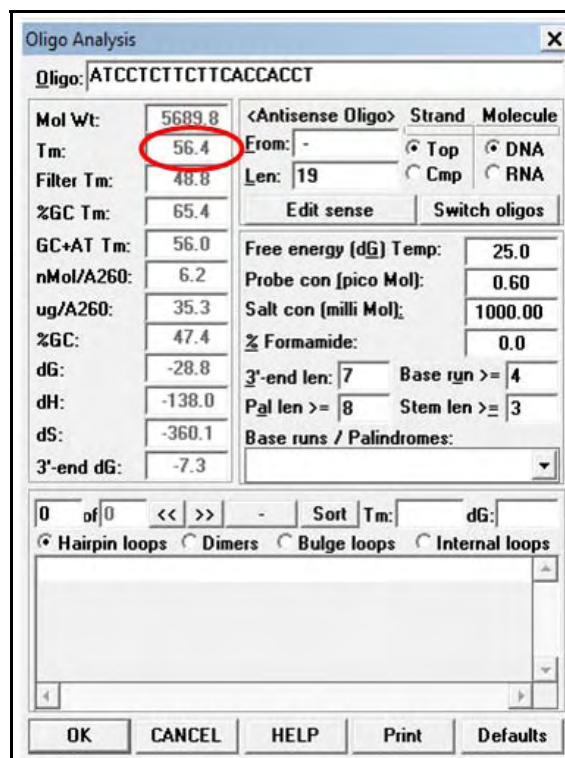


Também foi utilizado o programa “GeneRunner”, para realizar ajustes, evitando-se a formação de estruturas secundárias, como dímeros e “loops” (Figura 9, 10, 11 e 12). Os “primers” foram desenhados apresentando Tm (temperaturas de desnaturação) muito próximas, para maximizar a amplificação do produto.

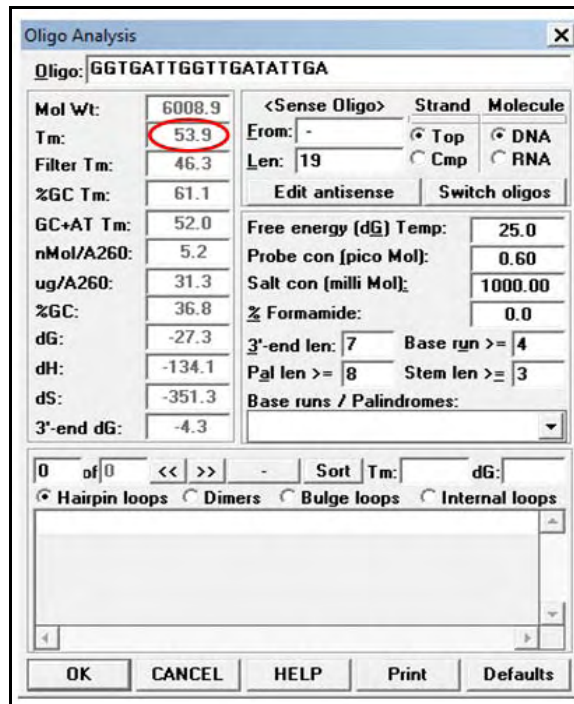
**Figura 9** - Resultado da análise do “primer Foward” do gene *SCN5A*, com Tm de 57 °C (assinalado pelo círculo vermelho)



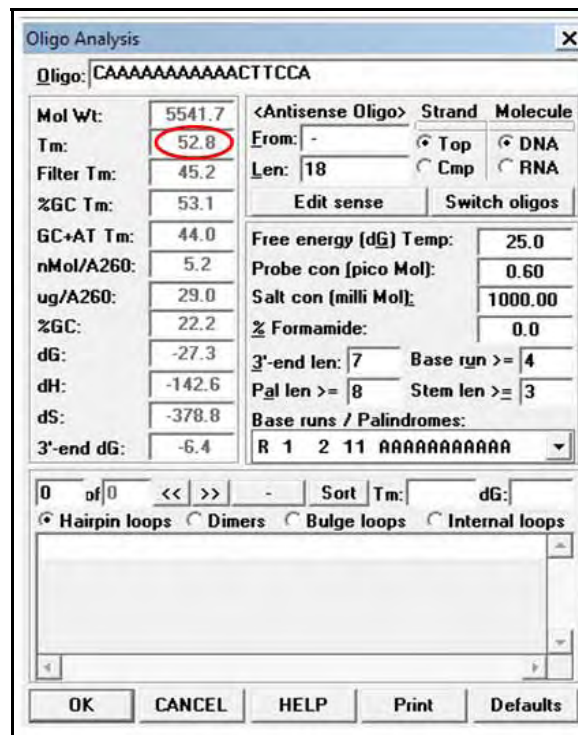
**Figura 10** - Resultado da análise do “primer Reverse” do gene *SCN5A*, com Tm de 56,4 °C (assinalado pelo círculo vermelho)



**Figura 11** - Resultado da análise do “primer Foward” do gene *MTR*, com Tm de 53,9 °C (assinalado pelo círculo vermelho)



**Figura 12** - Resultado da análise do “primer Reverse” do gene *MTR*, com Tm de 52,8 °C (assinalado pelo círculo vermelho).



Finalmente, foi realizada uma reação de PCR “in silico” com os primers desenhados para o gene *SCN5A* e *MTR* (Figura 13 e 14), com o objetivo de verificar o tamanho do produto da região amplificada pelos pares de “primers”.

**Figura 13 -** Produto obtido da reação “in silico” do gene *SCN5A*, mostrando o tamanho do fragmento amplificado (670 pb) pelo par de “primers” e a localização desta sequência no cromossomo 3

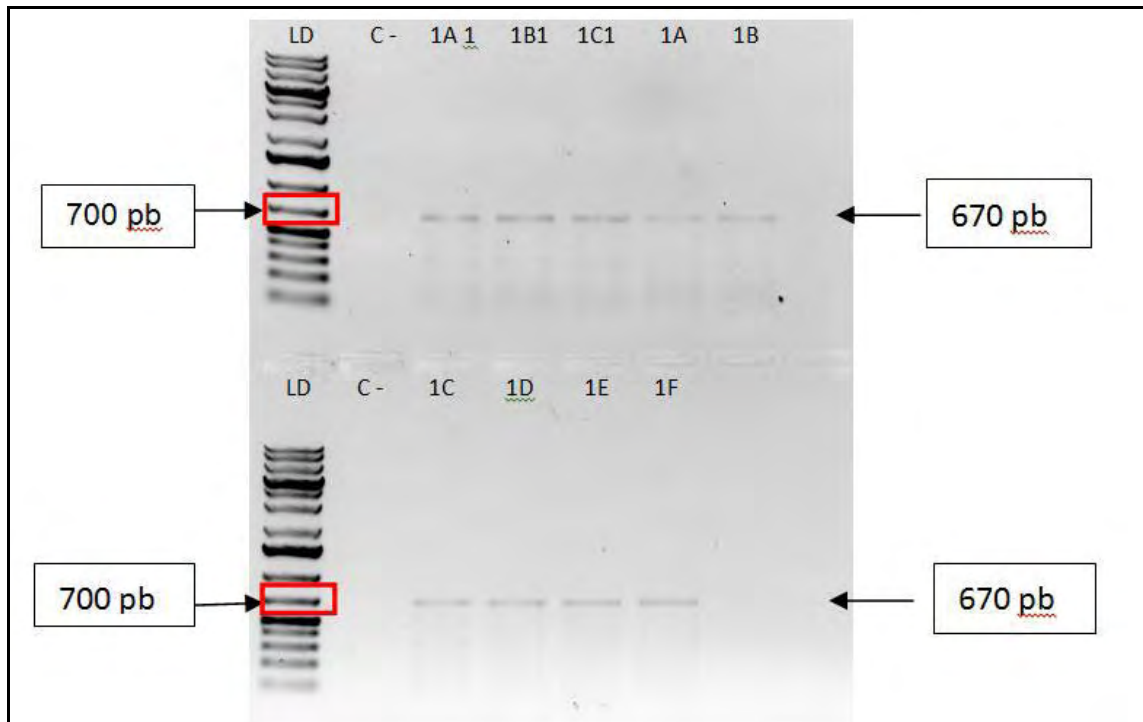


**Figura 14 -** Produto obtido da reação “in silico” do gene *MTR*, mostrando o tamanho do fragmento amplificado (891 bp) pelo par de “primers” e a localização desta sequência no cromossomo 1

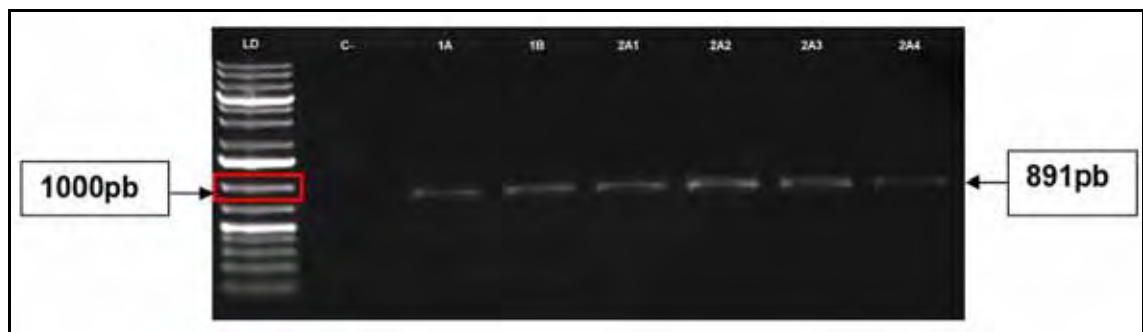


A Figura 15 e 16 mostra o resultado da PCR dos genes *SCN5A* e *MTR* após tratamento com bissulfito de sódio, analisadas em gel 0,8% de agarose, mostrando que em todas elas os fragmentos amplificados apresentam o tamanho esperado (670 pb para o gene *SCN5A* e 891 pb para o gene *MTR*).

**Figura 15** - Gel de agarose contendo os produtos amplificados do gene *SCN5A* após tratamento com bissulfito. LD (Peso Molecular), C- (Controle Negativo), amostras (1A1, 1B1, 1C1 metiladas), (1A,1B,1C,1D,1E e 1F não metiladas). Os tamanhos dos produtos estão indicados em pares de base (pb)



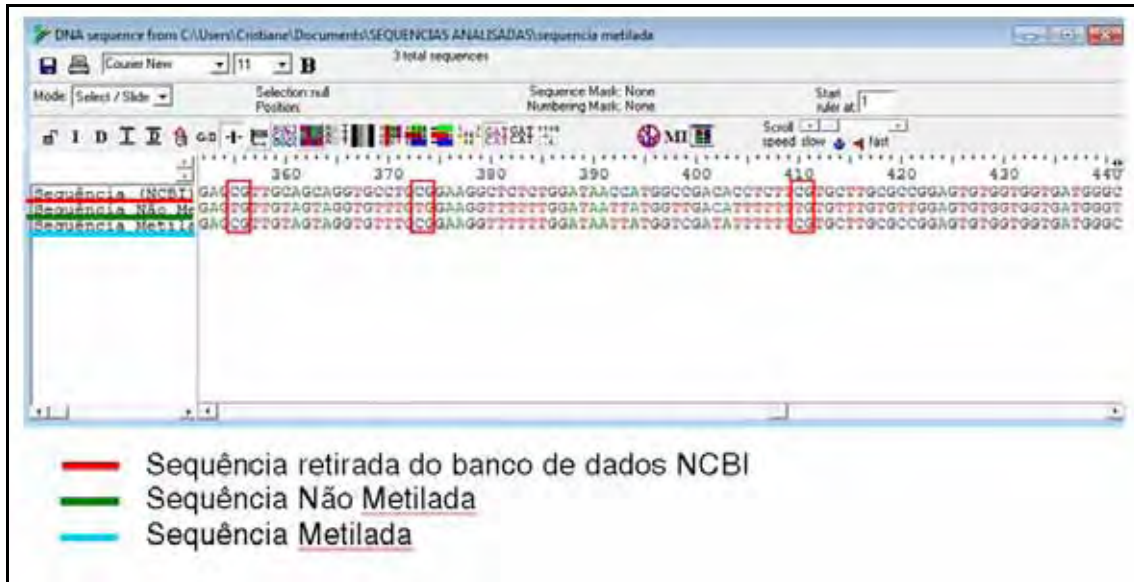
**Figura 16** - Gel de agarose contendo os produtos amplificados do gene *MTR*. LD (Peso Molecular), C- (Controle Negativo), amostras (1A, 1B, não metiladas), (2A1, 2A2, 2A3 e 2A4 metiladas). Os tamanhos dos produtos estão indicados em pares de base (pb)



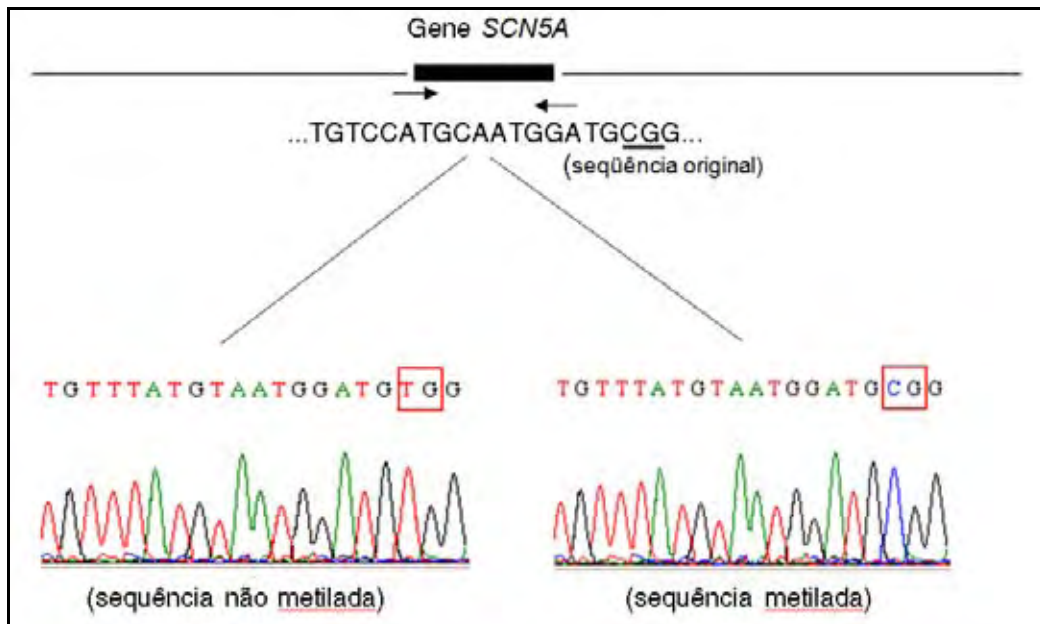
Os resultados do sequenciamento foram analisados no programa BioEdit, onde foi possível verificar a metilação em ilhas de CpG na região promotora dos genes *SCN5A* e *MTR* referentes às 25 amostras de indivíduos cardiopatas e a

ausência de metilação em ilhas de CpG na região promotora dos genes *SCN5A* e *MTR* referentes às 25 amostras de indivíduos saudáveis. (Figura 17, 18, 19 e 20).

**Figura 17 -** Comparação das seqüências metilada e não metilada com a seqüência original do gene *SCN5A* (Seqüência de referência NCBI : NC\_000003.11) analisadas no programa BioEdit



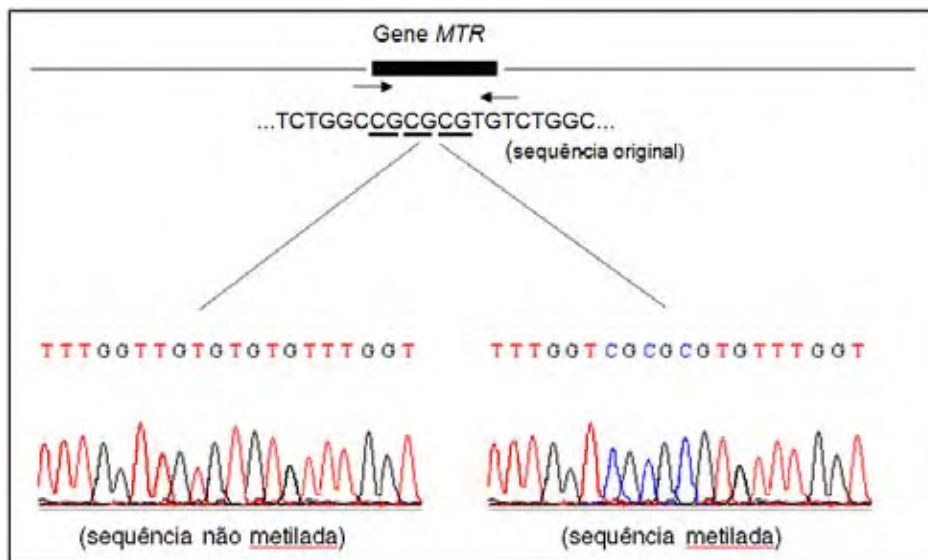
**Figura 18 -** Eletroferogramas das seqüências metilada e não metilada do gene *SCN5A*. A seqüência de interesse está sublinhada na seqüência original.



**Figura 19** - Comparação das seqüências metilada e não metilada com a seqüência original do gene *MTR* (Seqüência de referência NCBI : NC\_000001.10) analisadas no programa BioEdit



**Figura 20** - Eletroferogramas das seqüências metilada e não metilada do gene *MTR*. A seqüência de interesse está sublinhada na seqüência original



Com os dados do sequenciamento foi possível verificar o padrão de metilação desses genes pela técnica de BSP. A viabilidade de estratégias

baseadas em PCR, como a BSP, por exemplo, para acessar modificações de metilação em pequenas quantidades de materiais biológicos, pode servir como uma forma de acesso ao risco molecular ou ainda a detecção da doença *post mortem* (autópsia molecular).

Os resultados foram correlacionados com parâmetros clínico-patológicos já estabelecidos para esta doença, conforme Tabela 5 e 6.

**Tabela 5 -** Relação dos resultados das amostras coletadas aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis

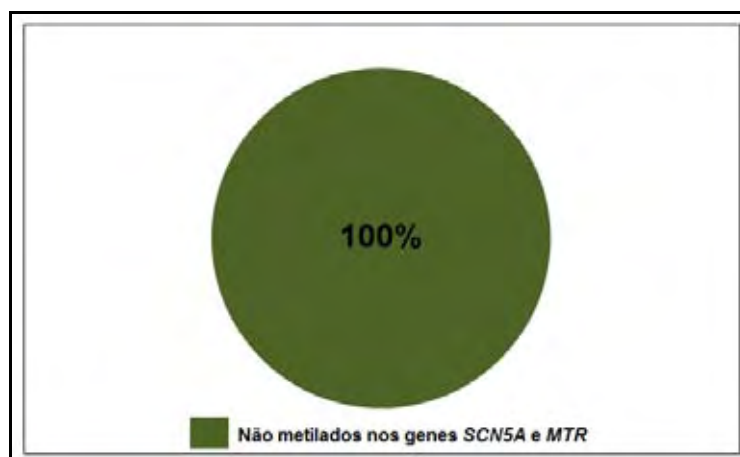
25 AMOSTRAS (Aleatórias) 20 - 35 anos	SEXO	GENE	
		SCN5A	MTR
1A	F	Não metilado	Não metilado
1B	F	Não metilado	Não metilado
1C	F	Não metilado	Não metilado
1D	F	Não metilado	Não metilado
1E	F	Não metilado	Não metilado
1F	F	Não metilado	Não metilado
1G	F	Não metilado	Não metilado
1H	M	Não metilado	Não metilado
1I	F	Não metilado	Não metilado
1J	F	Não metilado	Não metilado
1K	M	Não metilado	Não metilado
1L	F	Não metilado	Não metilado
1M	F	Não metilado	Não metilado
1N	F	Não metilado	Não metilado
1O	F	Não metilado	Não metilado
1P	F	Não metilado	Não metilado
1Q	M	Não metilado	Não metilado
1R	M	Não metilado	Não metilado
1S	F	Não metilado	Não metilado
1T	M	Não metilado	Não metilado
1U	M	Não metilado	Não metilado
1W	M	Não metilado	Não metilado
1V	M	Não metilado	Não metilado
1X	M	Não metilado	Não metilado
1Y	M	Não metilado	Não metilado

**Tabela 6 -** Relação dos resultados das amostras coletadas de indivíduos cardiopatas

25 AMOSTRAS (Cardiopatas) 45 - 75 anos	SEXO	GENE	
		SCN5A	MTR
2A1	M	Não metilado	Metilado
2A2	F	Metilado	Metilado
2A3	M	Não metilado	Metilado
2A4	F	Não metilado	Metilado
2A5	M	Metilado	Não metilado
2A6	F	Não metilado	Metilado
2B	M	Não metilado	Metilado
2C	M	Não metilado	Metilado
2D	F	Metilado	Não metilado
2E	F	Não metilado	Metilado
2F	M	Não metilado	Metilado
2G	M	Metilado	Metilado
2H	F	Metilado	Não metilado
2I	M	Não metilado	Metilado
2J1	M	Metilado	Metilado
2J2	F	Metilado	Não metilado
2K1	M	Metilado	Metilado
2K2	F	Metilado	Metilado
2L1	M	Metilado	Não metilado
2L2	F	Metilado	Não metilado
2M	F	Metilado	Metilado
2N	M	Metilado	Metilado
2O	F	Metilado	Não metilado
2P	M	Metilado	Metilado
2Q	F	Metilado	Não metilado

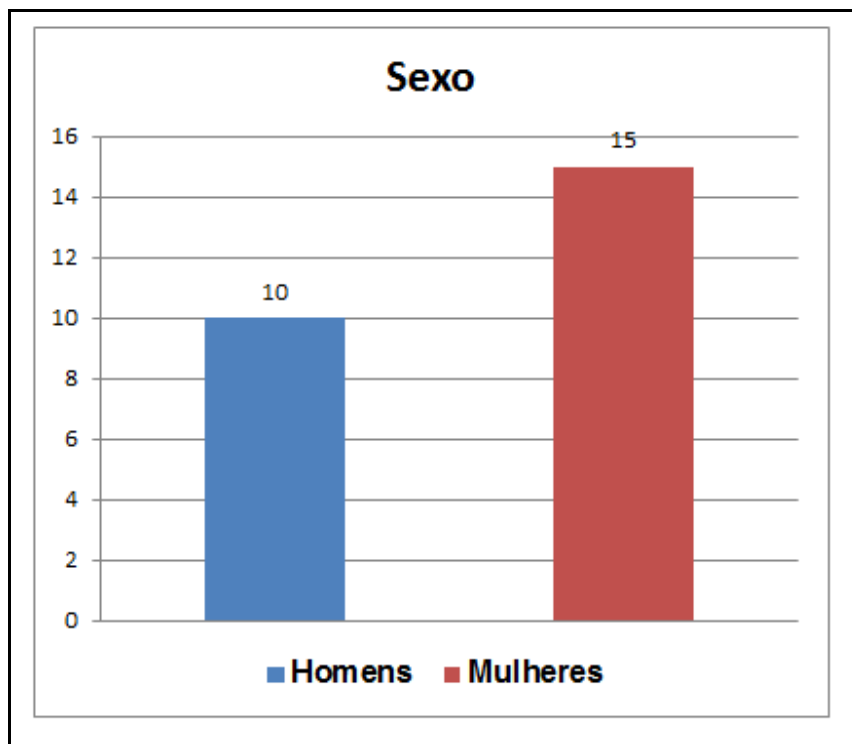
Os resultados obtidos estão formatados nas figuras (Figura 21, 22, 23, 24, 25 e 26).

**Figura 21 -** Resultado das amostras do grupo coletado aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis na análise dos genes *SCN5A* e *MTR*



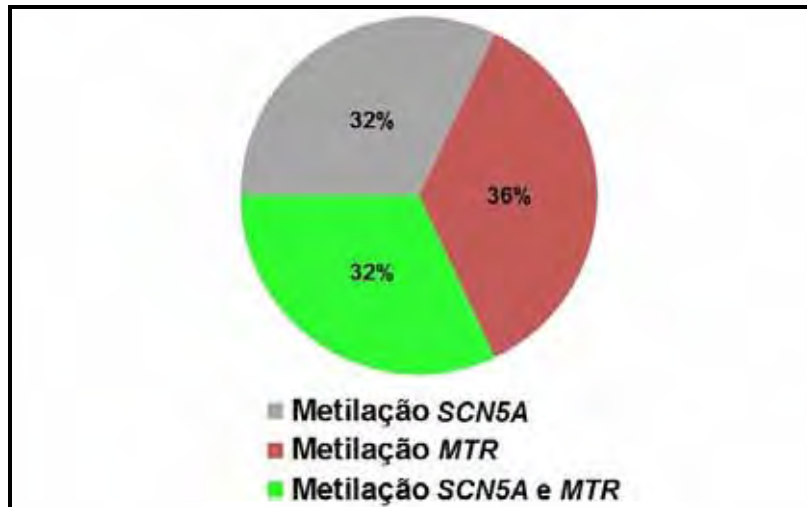
Houve homogeneidade nos resultados encontrados na análise de metilação dos genes *SCN5A* e *MTR* referente às amostras de indivíduos aparentemente saudáveis.

**Figura 22 -** Resultado das amostras do grupo coletado aleatoriamente de indivíduos aparentemente saudáveis separados pelo sexo na análise dos genes *SCN5A* e *MTR*

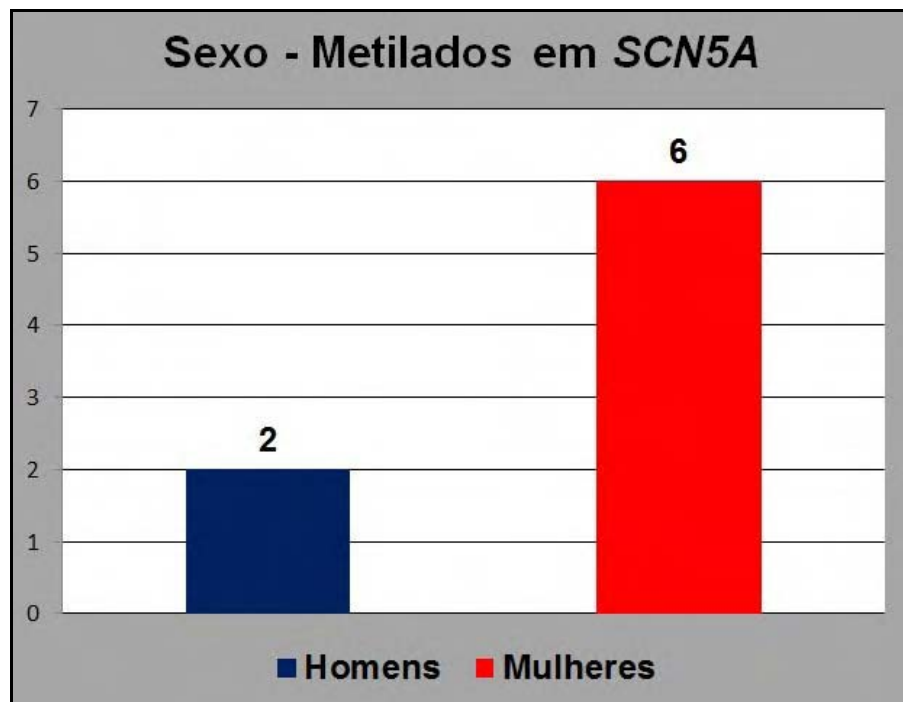


Foram identificados indivíduos com perfis de metilação distintos no gene *SCN5A* e *MTR*, referentes às vinte e cinco amostras que apresentam cardiopatia, considerando que podem ser observadas diferenças no padrão de metilação para diferentes genes.

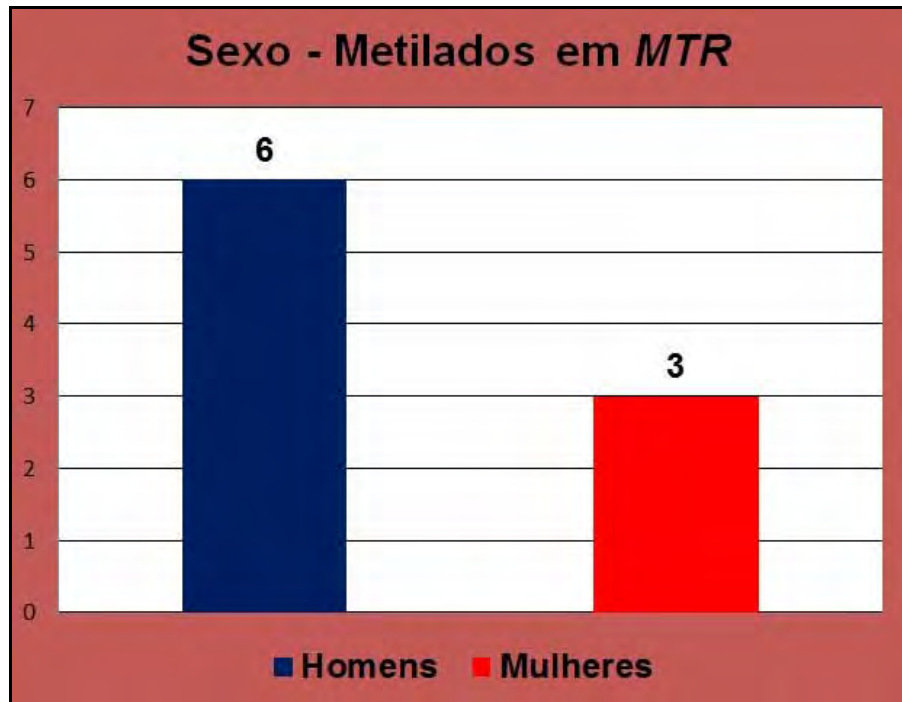
**Figura 23** - Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas na análise dos genes *SCN5A* e *MTR*



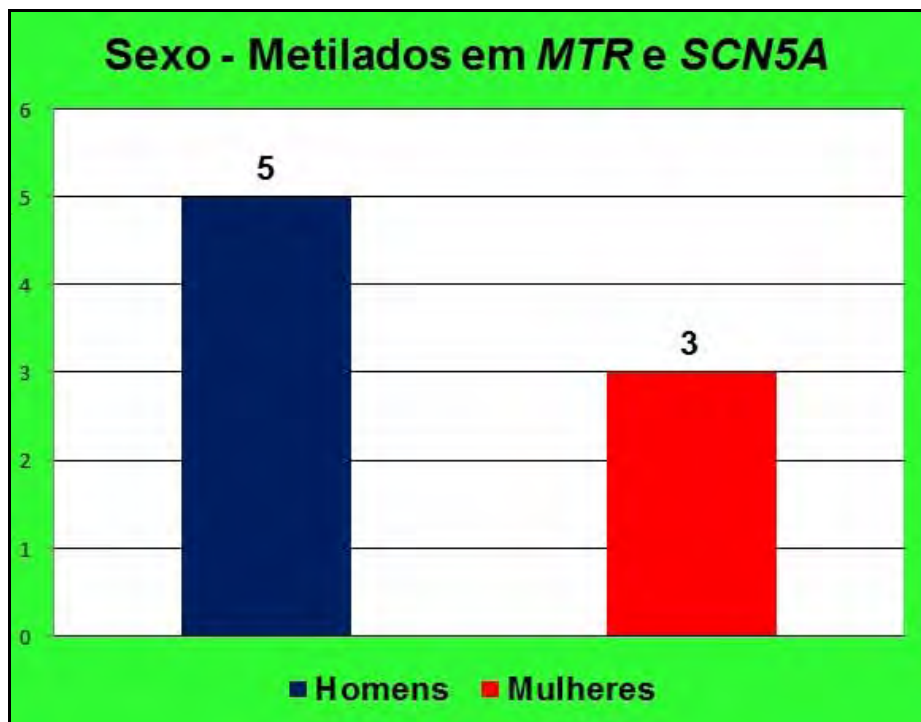
**Figura 24** - Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene *SCN5A*



**Figura 25** - Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene *MTR*



**Figura 26** - Resultado das amostras do grupo de indivíduos cardiopatas separados pelo sexo na análise do gene *MTR* e *SCN5A*



Quando analisamos a frequência de metilação nos diferentes genes observamos maior número de amostras metiladas no gene *MTR*. Esta desigualdade do grau de metilação pode estar relacionada a diferenças nas concentrações plasmáticas de HMC entre os dois sexos (KERRY et al., 2009) conforme observado no estudo de Ghazouani e colaboradores, 2008. As concentrações de HMC mais elevadas no sexo masculino sugerem que os hormônios sexuais pode desempenhar um importante papel no metabolismo da HMC (BALLANTYNE et al., 2001). De forma análoga, foram descritos casos de elevação das concentrações de HMC, em mulheres na fase de menopausa que não efetuavam qualquer procedimento terapêutico de substituição com estrogênios, comparativamente àquelas que se encontravam realizando este tipo de terapêutica de substituição (BALLANTYNE et al., 2001).

Os resultados deste estudo mostraram que 68% das amostras de indivíduos que apresentavam cardiopatias referentes ao gene *MTR* estavam metiladas, apresentando concordância com os dados da literatura, onde este gene é encontrado metilado geralmente em mais de 50% das amostras analisadas. No entanto, o número de amostras analisadas é relativamente pequeno, apenas 25 amostras contra 182 do trabalho citado.

É necessário enfatizar que poucos estudos foram feitos quanto à análise da metilação nos genes *MTR* e *SCN5A* relacionados a morte súbita cardíaca.

O presente trabalho evidenciou grande probabilidade de falha na amplificação das amostras durante a realização da BSP, originada pela baixa qualidade do DNA tratado com bissulfito ou pela presença de grande quantidade de sal na amostra. As amostras que apresentaram metilação negativa foram reavaliadas para confirmação dos resultados.

É evidente a necessidade de se realizar mais estudos para determinar a contribuição exata dos fatores genéticos e não genéticos nas concentrações de HMC.

Estudos futuros necessitam também explorar os mecanismos patológicos específicos, envolvidos na HMC, que por sua vez está associada à doença

vascular. Mais ainda, alerta-se para a necessidade de estudos de intervenção mais abrangentes, de modo a elucidar se as alterações nas concentrações de HMC, através do consumo de suplementos vitamínicos do complexo B e ácido fólico, reduzem verdadeiramente o risco de desenvolvimento da doença vascular.

O conhecimento do epigenoma é tão relevante quanto o conhecimento do genoma da célula. A regulação epigenética é essencial para o correto funcionamento celular e é reforçada pelo grande número de trabalhos descrevendo alterações no padrão normal em diversas doenças humanas.

A importância da metilação e outros eventos epigenéticos na expressão gênica levam a considerações de como essas descobertas poderão ser aplicadas clinicamente.

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia do tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de sequenciamento permitiu verificar a presença de metilação na região promotora do gene *SCN5A* e *MTR*.

Nas amostras de indivíduos aparentemente saudáveis, 100% delas não apresentou metilação nos genes *SCN5A* e *MTR*.

Houve heterogeneidade no padrão de metilação do gene *SCN5A* e *MTR* nas amostras analisadas de indivíduos que apresentam cardiopatia, com uma predominância de sequências metiladas no gene *MTR*, 68% no gene *MTR* e 64% no gene *SCN5A*.

## REFERÊNCIAS

- ACKRMANM, M. J.; SIU, B. L.; STURNER, W. Q.; TESTER, D. J.; VALDIVIA, C. R.; MAKIELSKI, J. C.; TOWBIN, J. A. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. **JAMA**, v. 14, n. 18, p. 2264-2269, 2001.
- ADCOCK, I. A.; TSAPROUNI, L.; BHAVSAR, P.; ITO, K. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Current Opinion Immunology**, v. 19, p. 694-700, 2007.
- ARMENANTE, F.; MEROLA, M.; FURIA, A.; TOVEY, M.; PALMIERI, M. Interleukin-6 repression is associated with a distinctive chromatin structure of the gene. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 4483-4490, 1999.
- AYDIN, M.; GOKKUSU, C.; OZKOK, E.; TULUBAS, F.; UNLUCERCI, Y.; PAMUKCU, B.; OZBEK, Z.; UMMAN, B. Association of genetic variants in Methylenetetrahydrofolate Reductase and Paraoxonase-1 genes with homocysteine, folate and vitamin B12 in coronary artery disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 325, n. 1/2, p. 199-208, 2009.
- BALLANTYNE, C. M.; OLSSON, A. G.; COOK, T. J.; MERCURI, M. F.; PEDERSEN, T. R.; KJEKSHUS, J. Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. **Circulation**, v. 14, n. 25, p. 3046-3051, 2001.
- BATES, C. J.; MANSOOR, M. A.; GREGORY, J.; PENTIEV, K.; PRENTICE, A. Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 1, p. 71-79, 2002.
- BEAULOYE, V.; ZECH, F.; TRAN, H. T.; CLAPUYT, P.; MAES, M.; BRICHARD, S. M. Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. **Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 8, n. 8, p. 3025-3032, 2007.
- BENNOUAR, N.; ALLAMI, A.; AZEDDOUG, H.; BENDRIS, A.; LARAQUI, A.; EL JAFFALI, A.; EL KADIRI, N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and homocysteine are risk factors for coronary artery disease in Moroccan population. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 45-87, 2007.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes e Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan. 2002.
- BJORKE, M. A. L.; UELAND, P. M. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. **Clinical Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 7-21, 2003.
- CARRACEDO, A.; SALAS, A.; LAREU, M. V. Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. **Medicina Forense**, v. 16, n. 1/2, jun. 2010.

CASTRO, R.; HEIL, S. G.; RIVERA, I.; JAKOBS, C. Molecular genetic analysis of the cystathionine beta-synthase gene in Portuguese homocystinuria patients: three novel mutations. **Clinical Genetics**, v. 60, n. 2, p. 161-163, 2006.

CASTRO, R.; RIVIERA, I.; BLOM, H.; JAKOBS, C. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. **Inherited Metabolic Disease**, v. 29, p. 3-20, 2006.

CERRONE, M.; PRIORI, S. G. Genetics of sudden death: focus on inherited Channelopathies. **European Heart Journal**, v. 32, n. 17, p. 2109-2118, 2011.

CIACCIO, M.; BIVONA, G.; BELLIA, C. Therapeutical approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, n. 1, p. 219-224, 2008.

CHO, K. S.; ELIZONDO, L. I.; BOERKOEL, C. F. Advances in chromatin remodeling and human disease. *Current Opinion in Genetics e Development*, v. 14, p. 308-315, 2004.

CHUGH, S. S.; JUI, J.; GUNSON, K.; STECKER, E. C.; JOHN, B. T.; THOMPSON, B. Current burden of sudden cardiac death: multiple source surveillance versus retrospective death certificate-based review in a large U.S. community. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 6, p. 1268-1275, 2004.

COSTELLO, J. F.; PLASS, C. Methylation matters. **Medical Genetics**, v. 38, p. 285-303, 2001.

DOLINSKY, L. C.; PEREIRA, L. M. C. DNA Forense. **Saúde e Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 11-22. jul./dez. 2007.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 63, p. 429-457, 2004.

FITZPATRICK, D. R.; WILSON, C. B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clinical Immunology**, v. 109, n.1, p. 37-45, 2003.

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. **Trends in Genetics**, v. 25, n. 2, p. 82-90, Feb. 2009.

GIROLDO, M. L.; ALVES, A. S.; BAPTISTA, F. Doença aterosclerótica: uma patologia multi-factorial. **Sábios- Revista Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2007.

JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer-epigenetics comes of age. **Nature Genetics**, v. 21, p. 163-167, 1999.

KERR, M. A.; LIVINGSTONE, B.; BATES, C. J.; BRADBURY, I.; SCOTT, J. M.; WARD, M.; PENTIEVA, K.; MANSOOR, M. A.; McNULTY, H. Folate, related B vitamins, and homocysteine in childhood and adolescence: potential implications for disease risk in later life. **Pediatrics**, v. 123, n. 2, p. 627-35, 2009

- LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews**, v. 3, p. 253-6, 2003.
- LIEVERS, K. J.; KLUIJTMANS, L. A.; BLOM, H. J. Genetics of Hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 46-59, 2003.
- LONG, J. E.; CAI, X. Igf2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. **Gene**, v. 388, p. 125-134, 2007.
- MANSUR, A. P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M. F. F. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 76, n. 6, p. 497-510, 2001.
- MANSUR, A. P.; SOUZA, M. F. M.; TIMERMAN, A. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias, cerebrovasculares e isquêmicas do coração em 11 capitais do Brasil de 1980 a 1998. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 79, n. 9, p. 269-276, 2002.
- OKRAINEC, K.; BANERJEE, D. K.; EISENBERG, M. J. Coronary artery disease in the developing world. **American Heart Journal**, v. 148, n. 1, p. 7-15, 2004.
- PIMENTA DE FRANÇA, C. **Avaliação de alguns factores de risco e determinantes genéticas que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose e doença vascular, numa população jovem**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Centro de Estudos da Macaronésea, Universidade da Madeira, Funchal, 2008.
- PLASS, C. Cancer epigenomics. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 2479-2488, 2002.
- REVILLA, J. I. G.; HERNÁNDEZ, F. P.; SALVADOR, M. T.; MARTIN, M. T. C. Influencia de factores bioquímicos y genéticos en las concentraciones de homocisteína. **Anales de Pediatría**, v. 60, p. 215-221, 2009.
- ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nature**, v. 6, p. 597-610, 2005.
- OTHSTEIN, M. A.; CAI, Y.; GARY, E. The ghost in our genes: legal and ethical implications of epigenetics. **Health Matrix Clevel**, v. 19, n. 1, p. 1-62, 2009.
- ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Experimental Oncology**, v. 29, p. 250-256, 2007.
- STOVER, P. J.; CAUDILLI, M. A. Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions. **American Dietetic Association**, v. 108, p. 1480-1487, 2008.

SZYF, M. Targeting DNA methylation in cancer. **Ageing Research Reviews**, v. 2, n. 3, p. 299-328, July 2003.

VAN DEN VEYER, I. B. Genetic effects of methylation diets. **Annual Review Nutrition**, v. 22, p. 255-282, 2002.

VERCELLI, D. Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. **Allergy Clinical Immunology**, v. 113, p. 381-386, 2004.

WATERLAND, R. A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **Nutrition**, v. 136, p. 1706-1710, 2006.

WATKINS, D.; HWANG, H. Y.; KIM, C. D.; MURRAY, A.; PHILIP, N. S.; KIM, W.; LEKIS, H.; WAI, T.; HILTON, J. F.; DORÉ, C.; HOSACK, A.; WILSON, A. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. **Human Genetics**, v. 71, n. 1, p. 143-153, 2002.

ZHAO, G.; YANG, Q.; HUANG, D.; YU, C.; YANG, R.; CHEN, H.; MEI, K. Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. **Forensic Science International**, v. 154, p. 122-127, 2005.