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

(21) BR 10 2012 028699-8 A2

(22) Data de Depósito: 09/11/2012
(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)

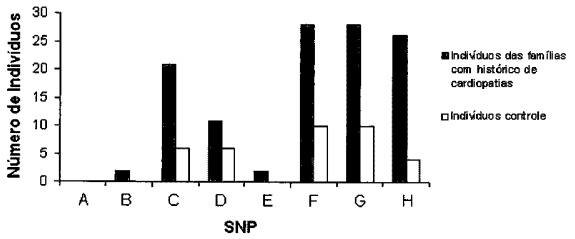
(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: MÉTODO E KIT PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA CARDÍACA (MSC)

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

(72) Inventor(es): DANILO FAUSTINO BRAGANHOLI, REGINA MARIA BARRETO CICARELLI

(57) Resumo: MÉTODO E KIT PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA CARDÍACA (MSC) A presente invenção descreve um método e kit para a identificação de polimorfismos associados à morte súbita cardíaca (MSC) . A tecnologia desenvolvida promove a análise em conjunto de SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) relacionados à MSC. Esta técnica poderá ser utilizada na genética forense e médica, para auxiliar no diagnóstico de causa de morte e doenças cardiovasculares, respectivamente, bem como na identificação da pré-disposição genética ao desenvolvimento destas doenças.



MÉTODO E KIT PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA CARDÍACA (MSC)

CAMPO DE APLICAÇÃO:

Esta invenção se aplica no campo da farmacogenética cardiovascular e faz referência a um método e kit para a identificação de polimorfismos associados à morte súbita cardíaca (MSC).

A tecnologia ora desenvolvida promove a análise em conjunto de SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) relacionados à MSC. O conhecimento dos polimorfismos que estão mais associados à MSC e a análise destes em conjunto geram maior facilidade na rotina prática de genética e patologia forense, bem como permite uma robustez nos resultados.

Esta técnica poderá ser utilizada na genética forense e médica, para auxiliar no diagnóstico de causa de morte e de doenças cardiovasculares, respectivamente, bem como na identificação da pré-disposição genética ao desenvolvimento destas doenças.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO:

A morte súbita cardíaca (MSC) é considerada um grave problema de saúde, sendo predominantemente causada pela doença cardíaca isquêmica.

Mutações nos genes codificadores dos canais iônicos cardíacos (KCNQ1, KCNH2 e KCNE1 do canal de potássio e SCN5A do canal de sódio) podem perturbar o equilíbrio de correntes iônicas que regulam a ação potencial e, assim, causar arritmias com risco de vida sem defeitos na estrutura cardíaca.

As doenças causadas por anormalidades genéticas, as

quais interrompem o componente elétrico da função cardíaca, são chamadas de "canalopatias".

O processo de repolarização ventricular é importante e bem definido e evidências epidemiológicas mostram que um processo perturbado de repolarização, medido como um prolongamento do intervalo QT, está associado a eventos cardíacos adversos e aumento da mortalidade.

Repolarizações anormais costumam ocorrer sem consequências, mas, em situações inesperadas ou de esforço físico (tal como a prática de esportes, forte emoção ou estímulos auditivos) podem gerar uma corrente elétrica cardíaca fora do controle e, dessa forma, uma potencial disritmia, colocando a vida em risco.

A MSC não causa anormalidades estruturais no coração e, portanto, a *causa mortis* permanece inexplicada após uma investigação médico-legal abrangente, incluindo autópsia e análises laboratoriais.

Uma investigação pós-morte é vital para determinar a causa da morte e oferece, ainda, a oportunidade de avaliar o risco potencial para a família e aconselhamento genético adequado.

Neste contexto, com o objetivo de agregar praticidade e agilidade à análise de polimorfismos relacionados à MSC, a presente invenção se refere a uma reação de SNaPshot em *multiplex* que analisa 8 SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês *single nucleotide polymorphism*) para sua possível utilização na genética médica e forense, em casos de morte sem causas exteriores aparentes.

ESTADO DA TÉCNICA:

O documento de anterioridade US 2011143956 descreve

métodos e kits de diagnóstico e microensaios de DNA para avaliar os riscos de MSC ou parada cardíaca súbita (PCS) por meio do uso de marcadores.

O documento americano US 2011143345 se refere ao uso de sequências genômicas como novos marcadores genéticos para avaliar os riscos de MSC ou PCS, bem como composições compreendendo as mesmas.

Diferentemente dos dois documentos, esta invenção baseia-se em uma reação de SNaPshot em multiplex, na qual polimorfismos distintos são utilizados como marcadores.

Já no documento US 2011159493, revelam-se um ou mais polimorfismos, incluindo SNPs, para o diagnóstico de doenças cardíacas, como insuficiência e arritmia cardíacas.

Neste documento, o diagnóstico de doenças cardíacas é realizado pela análise de polimorfismos por meio das técnicas de microensaio de DNA e Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP), enquanto, na presente invenção, a detecção é realizada por meio de reação de SNaPshot em multiplex.

Os polimorfismos utilizados para a detecção e diagnóstico neste documento de anterioridade também são distintos daqueles ora descritos.

No documento US 2005287574, revela-se um método para a classificação de indivíduos quanto aos riscos de sofrer uma MSC, por meio da identificação de um perfil genotípico que inclui SNPs associadas a esse tipo de morte.

Assim como na presente invenção, este documento de anterioridade se utiliza da técnica de SNaPshot para detecção de polimorfismos.

No entanto, os polimorfismos utilizados como

marcadores são distintos daqueles ora utilizados.

As reações de SNaPshot padronizadas e descritas na presente invenção são altamente específicas, pois verificam somente as regiões do DNA que se tem interesse.

Para isto, foram desenhados iniciadores utilizados nas reações de PCR e SNaPshot, não descritos anteriormente, que, em concentrações individualizadas, possibilitam a análise dos polimorfismos em conjunto, o que agiliza a interpretação dos resultados.

A técnica ora desenvolvida ocorre em *multiplex* e é específica, permitindo a análise de mais de um SNP em uma mesma reação, tornando esta tecnologia ágil na elaboração e análise dos resultados, reduzindo a probabilidade de erros.

Além disso, as metodologias descritas no estado da técnica e utilizadas para este tipo de análise verificam um número menor de polimorfismos ou polimorfismos menos correlacionados à MSC. Ainda, estas não apresentam grande especificidade, o que pode aumentar a possibilidade de erros.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS:

A figura 1 é representa graficamente a frequência dos polimorfismos rs1805128 (A), rs2074238 (B), rs2074518 (C), rs2968864 (D), rs4725982 (E), rs12053903 (F), rs12576239 (G) e rs16857031 (H) nos indivíduos testados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

METODOLOGIA:

Seleção dos SNPs (polimorfismos):

Para o desenvolvimento da tecnologia desta presente, foram analisados os seguintes SNPs descritos abaixo:

- rs1805128;

- rs2074238,
- rs2074518,
- rs2968864,
- rs4725982,
- rs12053903,
- rs12576239, e
- rs16857031.

Seleção dos iniciadores para PCR:

Para cada um dos SNPs descritos na seção acima, têm-se os respectivos iniciadores que foram desenhados com o auxílio dos softwares PerlPrimer v.1.1.19 e AutoDimer v.1 e da ferramenta online In-Silico PCR.

Os iniciadores forward e reverse para cada um dos polimorfismos descritos estão listados nas Tabelas 1 e 2 abaixo.

Tabela 1 - Polimorfismos e seus respectivos iniciadores forward.

N°	**Polimorfismo (SNP)**	**Iniciador *forward* (5′ - 3′)**	**SEQ. ID. correspondente**
1	**rs1805128**	GATTCTTCGGCTTCTTCACC	SEQ. ID. 1
2	**rs2074238**	CTCCACCTCCCTCTTATCGT	SEQ. ID. 2
3	**rs2074518**	GGTCCCACTTGAAATACGAC	SEQ. ID. 3
4	**rs2968864**	GTGCTTTGCCAAGTCATTCTG	SEQ. ID. 4
5	**rs4725982**	AAATACCTCTTCCTACAGCAG	SEQ. ID. 5
6	**rs12053903**	GCCCATCTTCTACATCTTGG	SEQ. ID. 6
7	**rs12576239**	TCTAAGCAGAGCACGTTTGG	SEQ. ID. 7
8	**rs16857031**	TTTACCTCAAACTGAGCCCA	SEQ. ID. 8

Tabela 2 - Polimorfismos e seus respectivos iniciadores reverse.

Polimorfismo	**Iniciador *reverse***	**SEQ. ID.**

(SNP)	(5′ - 3′)	correspondente
rs1805128	TTTCAACGACATAGCACGAC	SEQ. ID. 9
rs2074238	GGAGTACACCCATAAACACAG	SEQ. ID. 10
rs2074518	GGAAGGAGAAGGAAGTAGAG	SEQ. ID. 11
rs2968864	AAAGTTATCCTAGCCCAACCT	SEQ. ID. 12
rs4725982	TGGGTGGTTGTTCATTTGTC	SEQ. ID. 13
rs12053903	CACACTTTGAATAGCAAGGAG	SEQ. ID. 14
rs12576239	TTCACTGCAGAAGAGACCAC	SEQ. ID. 15
rs16857031	GAGTGAAGACGGAAGTGGTG	SEQ. ID. 16

Os iniciadores são misturados em um conjunto (*mix*) compreendendo os volumes e concentrações descritos abaixo na Tabela 3.

Tabela 3 - Volumes e concentrações dos iniciadores.

SNPs	Concentração (pMOL/µl)	Volume na reação (µl)	Concentração na reação (pMOL/µl)
rs1805128	12,5	0,16	2,0
rs2074238	25,0	0,375	9,375
rs2074518	12,5	0,16	2,0
rs2968864	10,0	0,24	2,4
rs4725982	12,5	0,16	2,0
rs12053903	6,25	0,24	1,5
rs12576239	12,5	0,24	3,0
rs16857031	12,5	0,2	3,0
	TOTAL	1,775	

Reação de PCR:

Os reagentes utilizados na reação de PCR devem ser conforme segue:

- 0,4 µl de Taq DNA polimerase;
- 1 µl de tampão com $MgCl_2$ e dNTPs;

- 1,775 µl da mistura de iniciadores;
- 100 pg DNA; e
- Água deionizada (Milli-Q) q.s.p. 11 µl.

A reação de PCR é realizada em 5 passos, em que o 1° passo ocorre sob a temperatura de 95 °C por 10 minutos, o 2° ocorre a 95 °C por 30 segundos, o 3° passo ocorre a 51 °C por 45 segundos e o 4° passo ocorre a 72 °C por 30 segundos. Há a repetição de 35 ciclos a partir do segundo até o quarto passo sendo que, no terceiro passo, há um aumento de 0,3 °C por ciclo e, ao fim dos 35 ciclos a temperatura é mantida a 4°C por tempo infinito.

Resumidamente, os passos da reação de PCR ocorrem conforme o esquema abaixo:

95 °C - 10 minutos

95 °C - 30 segundos
*51 °C - 45 segundos } 35 ciclos
72 °C - 30 segundos

4 °C - até ser retirado do termociclador

*aumento de 0,3 °C por ciclo

O produto da PCR deve ser purificado pela adição de 1 µl de EXO-SAP IT e em uma ciclagem cujo 1° ciclo ocorre a 37 °C por 95 minutos, o segundo ciclo ocorre a 78 °C por 15 minutos e, em seguida, a temperatura é mantida a 4 °C por tempo infinito.

Seleção dos iniciadores para SNaPshot:

Para a reação de SNaPshot (minisequenciamento), são utilizados os seguintes iniciadores, os quais foram desenhados com o auxílio dos softwares PerlPrimer v.1.1.19 e AutoDimer v.1. Ao final dos iniciadores, e conforme a Tabela 4 abaixo, uma cauda de diferentes tamanhos foi

inserida, que não se anela para haver a separação dos fragmentos.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores com cauda.

Polimorfismo	**Iniciador com cauda (5'- 3')**	**Orientação**	**SEQ. ID. correspondente**
rs1805128	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGAC AAAACTGACTAAACTAGGTGCCA CGTCGTGAAAGTCTGACAACAAC GTCTACATCGAGTCC	*forward*	SEQ. ID. 17
rs2074238	GTGAAAGTCTGACAAAACTGACT AAACTAGGTGCCACGTCGGAAAG TCTGACAA CCACCTCAAAGTCACGC	*forward*	SEQ. ID. 18
rs2074518	AACTGACTAAACTAGGTGCCACG TCGTGAAAGTCT GACAACCTGTCTCAGCCTGCCTA	*reverse*	SEQ. ID. 19
rs2968864	AGTCTGACAA CCACTGCTCATGCTTAAGTAA	*forward*	SEQ. ID. 20
rs4725982	ACTAAACTAGGTGCCACGTCGTG AAAGTCTGACAACTGAGGG AGGTTACACC	*reverse*	SEQ. ID. 21
rs12053903	GTGAAAGTCTGACAAAACTGACT AAACTAGGTGCCACGTCGTGAAA GTCTGACAAAACTGACTAAACTA GGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGA CAAAAGCTGGGTGGGCA	*reverse*	SEQ. ID. 22
rs12576239	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGAC AA CCACCACCCGTTCTC	*reverse*	SEQ. ID. 23
rs16857031	AGTCTGACAAAACTGACTAAACT AGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTG	*forward*	SEQ. ID. 24

	ACAAGCCCATCCCATGAGGTT		

Os iniciadores são misturados em um conjunto (*mix*) compreendendo os seguintes volumes e concentrações, conforme Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Volumes e concentrações dos iniciadores com cauda.

SNPs	**Concentração (pMOL/µl)**	**Volume na reação (µl)**	**Orientação**
rs1805128	2,0	0,3	*forward*
rs2074238	2,0	0,45	*forward*
rs2074518	2,0	0,525	*reverse*
rs2968864	2,0	0,3	*forward*
rs4725982	2,0	0,1	*reverse*
rs12053903	1,25	0,375	*reverse*
rs12576239	1,25	0,3	*reverse*
rs16857031	2,0	0,3	*forward*
	TOTAL	2,65	

Reação de SNaPshot:

Os reagentes utilizados na reação de SNaPshot devem ser conforme segue:

- 0,25 µl de tampão sem $MgCl_2$;
- 1,25 µl de SNaPshot *mix reaction*;
- 2,65 µl da mistura de iniciadores;
- 1 µl do produto de PCR purificado; e
- Água deionizada (Milli-Q) q.s.p. 6,5 µl

A reação de SNaPshot é realizada em 3 passos, em que o 1° passo ocorre sob a temperatura de 96 °C por 3 minutos, o 2° ocorre a 55°C por 5 segundos, o 3° passo ocorre a 60 °C por 30 segundos.

Os três passos são repetidos por 30 ciclos e ao fim, a temperatura é mantida a 4 °C por tempo infinito, até a retirada das amostras do termociclador.

O produto da reação de SNaPshot deve ser purificado pela adição de 1 µl de SAP IT e em uma ciclagem cujo 1° ciclo ocorre a 37 °C por 95 minutos, o segundo ciclo ocorre a 78 °C por 15 minutos e, em seguida, a temperatura é mantida a 4 °C por tempo infinito.

A reação de SNaPshot desenvolvida é *multiplex,* ou seja, permite a análise de mais de um SNP em uma mesma reação, além de ser específica aos SNPs analisados.

Por fim, 1 µl do produto obtido na reação de SNaPshot foi purificado por meio de um processo de eletroforese.

Validação do método:

Sensibilidade:

A verificação da sensibilidade e a validação foram realizadas no estudo com as amostras citadas abaixo.

Exemplo da invenção:

A metodologia ora desenvolvida foi utilizada para analisar amostras de sangue de 28 indivíduos pertencentes a cinco famílias com histórico de insuficiência cardíaca e de dez indivíduos que não possuem um histórico familiar direto de problemas cardíacos (grupo controle).

Alelos do tipo "T/T" foram identificados no SNP rs12053903 de todas as amostras analisadas do grupo com histórico de cardiopatia e do grupo controle de maneira homozigótica.

Em relação ao SNP rs12576239, o grupo com histórico familiar apresentou 20 amostras contendo alelos "C/T" e 8 amostras contendo os alelos "T/T". No grupo controle, foram

identificadas 6 amostras com os alelos "T/T" e 4 com "C/T".

No que diz respeito ao SNP rs16857031, 25 amostras do grupo com histórico familiar apresentaram o polimorfismo em heterozigosidade, ou seja, a base ancestral ou original (C) e a base derivada que configura o SNP (G). Uma amostra apresentou homozigose com os alelos "G/G" e 2 amostras, os alelos "C/C".

No grupo controle, o perfil "G/C" foi encontrado em 4 amostras e 6 amostras não apresentaram troca de bases apresentando os alelos "C/C".

Conforme mostrado no gráfico da Figura 1, oito SNPs, apresentando alelos derivados (homozigose ou heterozigose), mostraram-se mais frequentes nas amostras de indivíduos das famílias com histórico e controles. São elas: rs1805128 (A), rs2074238 (B), rs2074518 (C), rs2968864 (D), rs4725982 (E), rs12053903 (F), rs12576239 (G) e rs16857031 (H).

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

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

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

O SNP rs16857031 foi identificado em percentagem superior nos indivíduos das famílias com histórico de cardiopatias em comparação com os controles e o rs2968864 foi identificado em maior percentagem no grupo controle.

O número de amostras analisadas foi relativamente pequeno e os indivíduos utilizados como controle foram selecionados de modo aleatório em relação ao conhecimento médico sobre o histórico familiar para possíveis irregularidades cardíacas.

Mesmo assim, essa amostragem permitiu verificar que alguns SNPs mostraram-se discriminativos, como rs16857031, rs2074518, rs12576239 e rs12053903.

Além de amostras de sangue, realizou-se também análise em ossos e dentes provenientes de 5 esqueletos cuja causa de morte foi atribuída a problemas cardiovasculares. No entanto, houve dificuldade na análise dos SNPs, devido a baixa qualidade do DNA autossômico.

Nas reações realizadas com estas amostras, não foi possível analisar os 8 SNPs. Os eletroferogramas das reações de SNaPshot possibilitaram somente a análise do SNP rs16857031 para quatro amostras e dos SNPs rs16857031 e rs2074238 para uma das amostras.

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

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

As características genéticas que interferem no intervalo QT são herdadas em cerca de 35% da população geral.

Esta informação pode ser exemplificada com a análise do SNP rs4725982 em dois indivíduos da família 8 (pai e filho), os únicos a apresentar a base polimórfica para este

SNP de todas as amostras estudadas.

Estes indivíduos foram classificados no haplogrupo T pelas análises no cromossomo Y, que é raro no mundo e cuja frequência do polimorfismo SNP rs4725982 esta apresentada na Tabela 6 a seguir:

Tabela 6 - Frequência dos alelos do SNP rs4725982 em europeus, asiáticos e africanos (sub-saarianos).

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

A frequência dos alelos "T/T" em europeus e africanos é relativamente baixa, o que pode reforçar sua correlação a cardiopatias ou MSC.

O perfil "C/C" nesse polimorfismo, encontrado nas amostras das outras famílias, tem uma alta frequência em europeus e africanos, o que pode explicar a predominância destes alelos nas amostras analisadas, já que praticamente todos os indivíduos foram classificados em haplogrupos de origem europeia.

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

Ao contrário, o SNP rs12576239 com o alelo derivado "T", foi identificado em todas as amostras e apresenta uma

frequência mediana para o perfil "C/T" e praticamente nula para o perfil "T/T" em europeus.

O rs16857031 que também foi identificado em todas as amostras com o alelo derivado "G" possui frequência mediana e baixa para os perfis "C/G" e "G/G", respectivamente, indicando a possiblidade dos alelos estarem relacionados a um histórico familiar compatível com irregularidades cardíacas.

A frequência dos perfis "A/A" e "A/G" do SNP rs2968864 é alta em europeus, o que pode justificar a identificação destes em todas as amostras.

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

Os polimorfismos que foram identificados em maior frequência no grupo com histórico de cardiopatias estão localizados nos genes SCN5A, KCNQ1 e KCNH2, já sabidamente conhecidos como os mais relacionados a cardiopatias e MSC, e NOS1AP, também muito relacionado a irregularidades cardíacas.

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

O SNP rs16857031 com o perfil "G/G" possui baixa frequência em europeus e foi identificado em quatro amostras. Os alelos "C/G" possuem frequência mediana e foram identificados em uma amostra. Este pode ser mais um indício de que, estes alelos não estejam relacionados à população de origem, mas sim, a um histórico familiar

compatível com irregularidades cardíacas uma vez que estas amostras também foram classificadas em haplogrupos de origem europeia pelo DNAmt.

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

Este produto pode ser comercializado como um kit que deverá conter todos os reagentes citados acima nas concentrações ideais para a realização das reações de PCR e SNaPshot e poderá ser utilizado para diagnóstico de MSC, doenças cardiovasculares e identificação de pré-disposição genética a enfermidades cardíacas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a identificação de polimorfismos associados à morte súbita cardíaca (MSC) **caracterizado** por compreender as etapas de:

(a) seleção dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) específicos associados à MSC;

(b) seleção dos iniciadores forward e reverse específicos para cada um dos SNPs selecionados na etapa (a);

(c) amplificação dos fragmentos de DNA pela técnica de PCR em multiplex;

(d) purificação dos produtos obtidos na etapa (c) pela adição de de EXO-SAP IT;

(e) seleção dos iniciadores específicos para a realização do minisequenciamento;

(f) minisequenciamento dos fragmentos de DNA pela técnica do SNaPshot em multiplex;

(g) purificação dos produtos obtidos na etapa (f) pela adição de SAP IT;

(h) separação dos fragmentos da etapa (f) pela técnica de eletroforese;

(h) identificação do polimorfismo relacionado à MSC na amostra testada.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os polimorfismos selecionados na etapa (a) são rs1805128, rs2074238, rs2074518, rs2968864, rs4725982, rs12053903, rs12576239 e rs16857031.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores forward

utilizados na reação de PCR são aqueles correspondentes as SEQ. IDs. 1 a 8.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores reverse utilizados na reação de PCR são aqueles correspondentes as SEQ. IDs. 9 a 16.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores utilizados na reação de SNaPshot são, para cada um dos polimorfismos, respectivamente SEQ. IDs. 17 de orientação forward, SEQ. IDs. 18 de orientação forward, SEQ. IDs. 19 de orientação reverse, SEQ. IDs. 20 de orientação forward, SEQ. IDs. 21 de orientação reverse, SEQ. IDs. 22 de orientação reverse, SEQ. IDs. 23 de orientação reverse e SEQ. IDs. 24 de orientação forward.

6. Kit para executar o método descrito na reivindicação 1 **caracterizado** por compreender um conjunto de iniciadores específicos para a reação de PCR em multiplex e um conjunto de iniciadores específicos para a reação de SNaPshot em multiplex.

7. Kit, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores forward utilizados na reação de PCR são aqueles correspondentes as SEQ. IDs. 1 a 8.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores reverse utilizados na reação de PCR são aqueles correspondentes as SEQ. IDs. 9 a 16.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que os iniciadores utilizados na

reação de SNaPshot são, para cada um dos polimorfismos, respectivamente SEQ. IDs. 17 de orientação forward, SEQ. IDs. 18 de orientação forward, SEQ. IDs. 19 de orientação reverse, SEQ. IDs. 20 de orientação forward, SEQ. IDs. 21 de orientação reverse, SEQ. IDs. 22 de orientação reverse, SEQ. IDs. 23 de orientação reverse e SEQ. IDs. 24 de orientação forward.

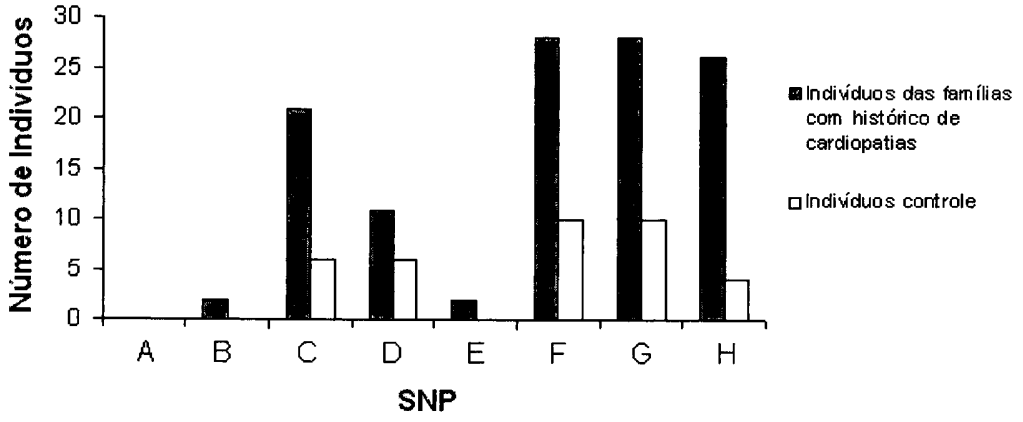

Número de Indivíduos
30
25
20
15
10
5
0
A
B
C
D
E
F
G
H
SNP
Indivíduos das famílias com histórico de cardiopatias
Indivíduos controle

FIGURA 1

Resumo

MÉTODO E KIT PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA CARDÍACA (MSC)

A presente invenção descreve um método e kit para a identificação de polimorfismos associados à morte súbita cardíaca (MSC). A tecnologia desenvolvida promove a análise em conjunto de SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) relacionados à MSC. Esta técnica poderá ser utilizada na genética forense e médica, para auxiliar no diagnóstico de causa de morte e doenças cardiovasculares, respectivamente, bem como na identificação da pré-disposição genética ao desenvolvimento destas doenças.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

<120> MÉTODO E KIT PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA CARDÍACA (MSC)

<130> 201290214

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 1
gattcttcgg cttcttcacc 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 2
ctccacctcc ctcttatcgt 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 3
ggtcccactt gaaatacgac 20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 4
gtgctttgcc aagtcattct g 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 5
aaatacctct tcctacagca g 21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 6
gcccatcttc tacatcttgg 20

<210> 7

<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 7
tctaagcaga gcacgtttgg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador forward

<400> 8
tttacctcaa actgagccca 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 9
tttcaacgac atagcacgac 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 10
ggagtacacc cataaacaca g 21

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 11
ggaaggagaa ggaagtagag 20

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 12
aaagttatcc tagcccaacc t 21

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 13
tgggtggttg ttcatttgtc 20

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 14

cacactttga atagcaagga g 21

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 15
ttcactgcag aagagaccac 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Iniciador reverse

<400> 16
gagtgaagac ggaagtggtg 20

<210> 17
<211> 84
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 17
gtgccacgtc gtgaaagtct gacaaaactg actaaactag gtgccacgtc gtgaaagtct 60

gacaacaacg tctacatcga gtcc 84

<210> 18
<211> 71
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 18
gtgaaagtct gacaaaactg actaaactag gtgccacgtc ggaaagtctg acaaccacct 60

caaagtcacg c 71

<210> 19
<211> 58
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 19
aactgactaa actaggtgcc acgtcgtgaa agtctgacaa cctgtctcag cctgccta 58

<210> 20
<211> 31
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 20
agtctgacaa ccactgctca tgcttaagta a 31

<210> 21
<211> 52
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 21
actaaactag gtgccacgtc gtgaaagtct gacaactgag ggaggttaca cc 52

<210> 22
<211> 109
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 22
gtgaaagtct gacaaaactg actaaactag gtgccacgtc gtgaaagtct gacaaaactg 60

actaaactag gtgccacgtc gtgaaagtct gacaaaagct gggtgggca 109

<210> 23
<211> 40
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 23
gtgccacgtc gtgaaagtct gacaaccacc acccgttctc 40

<210> 24
<211> 67
<212> DNA
<213> Iniciador com cauda

<400> 24
agtctgacaa aactgactaa actaggtgcc acgtcgtgaa agtctgacaa gcccatccca 60

tgaggtt 67