



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**PESQUISA DE MARCADORES
GENÉTICOS PARA A RETINOPATIA
DIABÉTICA PELA GENOTIPAGEM DE
SNPs EM GENES CANDIDATOS**

Tânia Patrícia da Silva Duarte

2013

**Pesquisa de marcadores genéticos para a retinopatia
diabética pela genotipagem de SNPs em genes candidatos**

Tânia Duarte



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

PESQUISA DE MARCADORES GENÉTICOS PARA A RETINOPATIA DIABÉTICA PELA GENOTIPAGEM DE SNPs EM GENES CANDIDATOS

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Conceição Egas (Biocant) e a co-orientação da Doutora Ana Luísa Carvalho (Universidade de Coimbra).

Tânia Patrícia da Silva Duarte

2013

Aos meus pais e irmã

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora Doutora Conceição Egas por me dar a oportunidade de trabalhar num local de prestígio como a Unidade de Serviços Avançados do Biocant e pelo seu apoio ao longo de todo o ano de trabalho.

À minha orientadora Doutora Maria José Simões pela sua disponibilidade e apoio, pelos ensinamentos, rigor científico, paciência e incentivo e por me proporcionar todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Luísa Carvalho por ter sido minha orientadora (interna) da Universidade de Coimbra e pelo auxílio que me deu ao longo do ano de trabalho.

À minha colega de laboratório, e agora grande amiga, Susana Carmona, por todo o apoio que me deu tanto na parte laboratorial ao longo de todo o ano de trabalho como na escrita da tese. Tenho a agradecer também à Susana e a toda a grande equipa que trabalha no Biocant por todos os momentos de descontração passados no “nosso” local de trabalho.

A todos os Professores, Colegas e Amigos dos laboratórios onde precisei de trabalhar e pelos serviços onde precisei de ir, tanto neste último ano de Mestrado como em todo o meu percurso académico em Bioquímica. Obrigada por todo o auxílio e ensinamentos.

Às minhas amigas de curso que agora serão “p’ra vida”. Sem vocês ter estado em Bioquímica não era a mesma coisa.

Um agradecimento especial ao meu melhor amigo Ricardo que esteve sempre presente ao longo deste ano e com quem partilhei as minhas alegrias e tristezas, não só deste trabalho, como da minha vida. Obrigado meu irmão do coração pela amizade, carinho, compreensão e paciência... um apoio incondicional que foi fundamental para que conseguisse chegar ao fim desta etapa da minha vida com um sorriso na cara.

Aos meus amigos da “aldeia” pela amizade e pelos momentos de fuga ao *stress* do trabalho que muitas vezes me proporcionaram.

À minha família pelo apoio para continuar e seguir em frente e que nunca criticou a minha ausência ao longo dos 5 anos de curso e em especial a ti, Ana Duarte, minha maninha, pelo teu apoio em toda a minha vida, por me fazeres sempre sorrir quando estou contigo e por ajudares os pais quando eu não podia estar presente.

Aos meus pais, Emília e António, por viver, por poder estudar e, por isso, conseguir chegar tão longe... por tudo, o meu Muito Obrigado.

Índice

Agradecimentos	iii
Abreviaturas.....	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv

Capítulo 1

Introdução.....	1
1.1. Diabetes <i>Mellitus</i>	3
1.2. Retinopatia Diabética (RD).....	3
1.2.1. Fatores de risco da RD.....	4
1.2.2. Características físicas e classificação da RD	4
1.2.3. Sintomas e tratamento da RD	6
1.2.4. Incidência da RD	6
1.3. A genética no desenvolvimento da RD	7
1.3.1. Genes candidatos ao desenvolvimento da RD.....	8
1.3.1.1. Gene ACE	8
1.3.1.2. Gene AGER	10
1.3.1.3. Gene AKR1B1	12
1.3.1.4. Gene NOS1	13
1.3.1.5. Gene NOS3	14
1.3.1.6. Gene VEGF.....	16
1.3.1.7. Gene PPARGC1A.....	17
1.3.1.8. Gene TGF- β 1	18
1.3.1.9. Gene MTHFR	19
1.3.1.10. Gene ICAM1	21
1.3.1.11. Gene TNF- α	21
1.4. Estudos de associação do tipo caso-controlo	25
1.4.1. Trabalho preliminar	26
1.4.1.1. Seleção de SNPs	26
1.4.2. Genotipagem de SNPs	29

1.4.2.1. Resultados (<i>Openarray</i>).....	30
1.4.3. Trabalho presente.....	30
1.5. Objetivos	31

Capítulo 2

Materiais e Métodos..... 33

2.1. Indivíduos selecionados para estudo.....	35
2.2. Extração do DNA genómico.....	36
2.2.1. Quantificação e avaliação da qualidade do DNA	36
2.2.1.1. Quantificação e determinação do grau de pureza por espectrofo-	
tometria.....	36
2.2.1.2. Quantificação fluorimetria	37
2.2.2. Parâmetros de qualidade das amostras.....	37
2.3. Métodos de genotipagem	
<i>Allele-specific</i> PCR com <i>MeltDoctor</i> por PCR em tempo real.....	37
2.3.1. Desenho de <i>primers</i>	38
2.3.2. Condições experimentais e análise dos resultados	41
2.4. Sequenciação de Sanger.....	44
2.4.1. Amplificação do DNA por PCR para sequenciação.....	44
2.4.2. Purificação do produto PCR	45
2.4.3. Reações de sequenciação	45

Capítulo 3

Resultados..... 47

3.1. Seleção dos SNPs.....	49
3.2. Genotipagem por AS-PCR.....	51
3.2.1. Gene NOS1	52
3.2.1.1. rs77074921 (G/A)	52
3.2.1.1.1. Genótipo GG	52
3.2.1.1.2. Genótipo AA	53
3.2.1.1.3. Genótipo GA	54
3.2.1.2. rs76839820 (G/A)	55

3.2.1.2.1. Genótipo GG	55
3.2.1.2.2. Genótipo AA	56
3.2.1.2.3. Genótipo GA	57
3.2.2. Gene MTHFR	58
3.2.2.1. rs72552099 (T/G).....	58
3.2.2.1.1. Genótipo TT	58
3.2.2.1.2. Genótipo GG	59
3.2.2.1.3. Genótipo GT.....	60
3.2.3. Gene ACE.....	61
3.2.3.1. rs8075924 (C/T).....	61
3.2.3.1.1. Genótipo CC.....	62
3.2.3.1.2. Genótipo TT	63
3.2.3.1.3. Genótipo CT.....	63
3.2.3.2. rs4357 (C/T).....	65
3.2.3.2.1. Genótipo CC.....	65
3.2.3.2.2. Genótipo TT	66
3.2.3.2.3. Genótipo CT.....	67
3.2.3.3. rs121912703 (C/T), rs113110741 (G/C) e rs12720744 (C/T)	69
3.3. Descoberta de outros SNPs nas amostras sequenciadas.....	72
3.3.1. Gene MTHFR	72
3.3.1.1. rs1801131 (T/G).....	73
3.3.1.1.1. Genótipo TT	73
3.3.1.1.2. Genótipo GG	73
3.3.1.1.3. Genótipo TG.....	74
3.3.2. Gene ACE.....	76
3.3.2.1. rs12720743 (-/T)	77
3.3.2.2. rs4363 (G/A)	77
3.3.2.2.1. Genótipo GG	77
3.3.2.2.2. Genótipo AA	78
3.3.2.2.3. Genótipo GA	78

Capítulo 4

Discussão	81
------------------------	-----------

4.1. Análise dos resultados de AS-PCR e sequenciação de Sanger	84
4.1.1. Gene NOS1	84
4.1.2. Gene MTHFR	85
4.1.3. Gene ACE.....	87
4.2. Técnica AS-PCR	89
4.3. Perspetivas futuras.....	90

Capítulo 5

Conclusão	93
------------------------	-----------

Referências bibliográficas	97
---	-----------

Anexos.....	109
--------------------	------------

Anexo I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1	111
--	-----

Anexo II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE	117
---	-----

Anexo III – Genótipo das amostras para os SNP rs121912703, rs113110741, rs12720744, rs12720743 e rs4363 do gene ACE.....	125
---	-----

Anexo IV – Otimizações da técnica AS-PCR.....	126
--	-----

I. Gene NOS1	128
---------------------------	------------

i.i. rs77074921 (G/A)	128
------------------------------------	------------

i.i.i. Primers específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	128
---	-----

i.i.ii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR.....	129
---	-----

i.i.iii. Alteração da temperatura de <i>annealing</i>	130
--	-----

i.i.iv. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes.....	131
--	-----

i.i.v. <i>Primers</i> sem <i>mismatch</i> vs <i>primers</i> com <i>mismatch</i>	133
--	-----

i.i.v.i. <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i> com cauda GC de 15 bases ..	134
--	-----

i.i.v.ii. <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i> com cauda GC de 21 bases..	135
--	-----

i.i.v.iii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases	136
---	-----

i.i.v.iv. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 22 bases	137
--	-----

i.i.v.v. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na penúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases (alelo G) e na antepenúltima base (alelo A)	137
i.i.vi. Fragmentos homozigóticos de controlo positivo, em diferentes proporções, para originar heterozigótico.....	138
i.ii. rs76839820 (G/A)	140
i.ii.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	140
i.ii.ii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR.....	142
i.ii.iii. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes	143
i.ii.iv. <i>Primers</i> sem <i>mismatch</i> vs <i>primers</i> com <i>mismatch</i>	144
i.ii.iv.i. <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i>	145
i.ii.iv.ii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3'	146
II. Gene MTHFR	150
ii.i. rs72552099 (T/G).....	150
ii.i.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	150
ii.i.ii. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes.....	151
ii.i.iii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR.....	152
III. Gene ACE	153
iii.i. rs8075924 (C/T).....	153
iii.i.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	153
iii.i.ii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR.....	155
iii.i.iii. Alteração da temperatura de <i>annealing</i>	156
iii.i.iv. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes.....	156
iii.i.v. Comportamento dos DNAs nas reações com <i>primers</i> na mesma reação	156
iii.i.vi. Otimização dos controlos positivos (D1 e D18).....	158
iii.ii. rs4357 (C/T).....	159
iii.ii.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	159
iii.ii.ii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR	161
iii.ii.iii. Alteração da temperatura de <i>annealing</i>	162
iii.ii.iv. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes	163
iii.ii.v. <i>Primers</i> sem <i>mismatch</i> vs <i>primers</i> com <i>mismatch</i>	164
iii.ii.v.i <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i>	165

iii.ii.v.ii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3'	166
iii.ii.v.iii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na penúltima (alelo C) e na antepenúltima base (alelo T) da extremidade 3'	167
iii.iii. rs121912703 (C/T).....	168
iii.iii.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	168
iii.iii.ii. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes	169
iii.iii.iii. Alteração da temperatura de <i>annealing</i> e da quantidade de <i>primers</i>	169
iii.iii.iv. <i>Primers</i> sem <i>mismatch</i> vs <i>primers</i> com <i>mismatch</i>	170
iii.iii.iv.i. <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i> com cauda GC de 15 bases	171
iii.iii.iv.ii. <i>Primers</i> específicos sem <i>mismatch</i> com cauda GC de 25 bases	172
iii.iii.iv.iii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases	172
iii.iii.iv.iv. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases	173
iii.iii.iv.v. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases (alelo C) e na penúltima base (alelo T).....	174
iii.iii.iv.vi. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases (alelo C) e sem <i>mismatch</i> (alelo T).....	174
iii.iv. rs113110741 (G/C).....	175
iii.v. rs12720744 (C/T)	176
iii.v.i. <i>Primers</i> específicos no mesmo poço de reação de PCR.....	176
iii.v.ii. Variação da quantidade de <i>primers</i> nas reações de PCR.....	176
iii.v.iii. Alteração da temperatura de <i>annealing</i>	179
iii.v.iv. <i>Primers</i> específicos em reações de PCR independentes.....	180
iii.v.v. <i>Primers</i> sem <i>mismatch</i> vs <i>primers</i> com <i>mismatch</i>	180
iii.v.v.i. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na penúltima base da extremidade 3' (alelo G) e sem <i>mismatch</i> (alelo A)	181
iii.v.v.ii. <i>Primers</i> específicos com <i>mismatch</i> na penúltima base da extremidade 3' (alelo C) e com <i>mismatch</i> na antepenúltima base (alelo T).....	181
iii.v.vi. Otimização dos controlos positivos (D18 e 198)	184

Abreviaturas

ACE	<i>Angiotensin I Converting Enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1</i>
AE	Tampão de eluição
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGER	<i>Advanced Glycation End Product-Specific Receptor</i>
AIBILI	Associação para Investigação Biomédica e Inovação em Luz e Imagem
AKR1B1	<i>Aldo-Keto Reductase family 1</i>
AL	Tampão de lise
Ang-I	Angiotensina I
Ang-II	Angiotensina II
ANNOVAR	<i>Annotate Variation</i>
AS-PCR	<i>Allele-Specific PCR</i>
dbSNPs	Base de dados de SNPs
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
eNOS	NOS endotelial
EMD	Edema Macular Diabético
GWAS	<i>Genome-wide association studies/ estudos de associação do genoma</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
I/D	(Inserção/Deleção)
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>

MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)</i>
NO	Óxido nítrico
NOS1	<i>Nitric Oxide Synthase 1</i>
NOS3	<i>Nitric Oxide Synthase 3</i>
nm	nanómetros
nNOS	NOS neuronal
nsSNPs	SNPs não sinónimos
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PharmGKB	<i>The Pharmacogenomics Knowledgebase</i>
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PPARGC1A	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha</i>
RAS	Sistema renina-angiotensina
RD/DR	Retinopatia diabética/ <i>Diabetic retinopathy</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SYSNPs	<i>Select Your SNPs</i>
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor, Beta 1</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

Resumo

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicémia, que a longo prazo leva a complicações que afetam vários órgãos, como os olhos, onde se desenvolve a retinopatia diabética (RD). A RD resulta de uma complicação microvascular da retina que pode culminar em cegueira. Esta doença afeta cada vez mais indivíduos com diabetes em todo o mundo. Em 2011, Portugal continental já registava 34,5% de diabéticos portadores de RD. Para além da hiperglicémia, outros fatores de risco estão envolvidos, nomeadamente a idade de início da diabetes, o estilo de vida e os fatores genéticos do diabético.

Numa fase inicial, as lesões associadas à RD podem ser reversíveis, contudo, nessa fase, a doença não apresenta sintomas. A identificação de marcadores genéticos que permitam delinear os diabéticos com suscetibilidade para o desenvolvimento de RD agressiva e de progressão rápida pode constituir a base para a seleção dos indivíduos que necessitam de uma vigilância clínica mais apertada. Em adição, a identificação destes marcadores poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares que acompanham o desenvolvimento da doença podendo contribuir para o aparecimento de novos alvos terapêuticos.

O presente estudo teve como objetivo a pesquisa de alterações genéticas, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), em 307 indivíduos, portugueses, diabéticos do tipo 2 com RD. Tratou-se de um estudo caso-controlo em que os doentes foram classificados em 3 fenótipos diferentes: A - indivíduos com RD não progressiva (grupo controlo), B - indivíduos com RD intermédia entre os fenótipos A e C, e C - indivíduos com RD agressiva e de progressão rápida. Num estudo prévio 200 SNPs foram selecionados a partir de 11 genes candidatos, de forma manual e com recurso a ferramentas bioinformáticas. Destes, 172 foram genotipados pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], tendo sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre o fenótipo A (controlo) e os fenótipos B e C para alguns SNPs dos genes NOS1, MTHFR, ACE e AGER, associando-os com o desenvolvimento de RD. Neste trabalho foram selecionados 8 SNPs dos 28 que não foram genotipados pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®]. Por apresentarem características com maior potencial foram escolhidos os SNPS: NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs8075924, ACE_rs4357, ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 e

ACE_rs12720744 e para a sua análise foi eleita a técnica *Allele-Specific* PCR (AS-PCR) com detecção por desnaturação de alta resolução (*MeltDoctor*).

De acordo com os resultados finais, os SNPs NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs121912703 e ACE_rs113110741 foram monomórficos nos 307 doentes. Para o ACE_rs8075924, foram detetados os 3 genótipos possíveis, mas as frequências alélicas e genotípicas foram distribuídas igualmente pelos 3 fenótipos pelo que não são associáveis com o desenvolvimento da doença. Os ACE_rs4357 e ACE_rs12720744 poderão ser interessantes e estar associados com a progressão da doença, mas estudos adicionais serão necessários para delinear estas eventuais correlações.

A genotipagem por AS-PCR foi confirmada por sequenciação de Sanger. Neste processo foram identificados 3 novos SNPs: MTHFR_rs1801131, ACE_rs12720743 e ACE_rs4363. O rs1801131 verificou-se ser um *tagged-SNP* do rs4846049, estudado por *TaqMan*[®] *OpenArray*[®]. Os SNPs ACE_rs12720743 e ACE_rs4363, apesar do número de indivíduos estudados ser reduzido, poderão vir a ser interessantes, porque embora sejam intrónicos, o primeiro corresponde a uma deleção presente nas amostras que também apresentam heterozigotia para o ACE_rs12720744, não se registando esta heterozigotia para os indivíduos sem a deleção em ACE_rs12720743, e o segundo porque se situa numa zona de *splicing* (6 bases afastado do exão) e por isso pode afetar a transcrição e posteriormente a tradução na proteína.

Palavras-chave: Retinopatia diabética, SNPs, genotipagem.

Abstract

Diabetes *Mellitus* (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, which leads to long-term complications that affect several organs such as eyes, where diabetic retinopathy develops (DR). DR is a microvascular complication of retina that may result in blindness. This disease has become more common among people with diabetes worldwide. In 2011, Portugal had registered 34,5% of diabetic patients with DR. In addition to hyperglycemia, other risk factors are involved, including the age of onset, lifestyle and genetic factors.

Lesions associated with DR may be reversible at an initial stage; however the disease is asymptomatic. The identification of genetic markers that allow identification of diabetic patients with susceptibility to develop aggressive DR and rapid progression may constitute the basis for selection of individuals who require a closer clinical monitoring. In addition, the identification of these markers may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms related to the development of the disease and may also contribute to the discovery of new therapeutic targets.

The aim of the present study was to find genetic alterations, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), in 307 type 2 diabetic Portuguese patients with DR. This was a case-control study and patients were classified into three different phenotypes: A - individuals with non-progressive DR (control group), B - individuals with intermediate DR phenotypes between A and C, and C - individuals with aggressive and rapid progression of DR. In a previous study 200 SNPs were selected from 11 candidate genes manually and using bioinformatics tools. From the 200 selected SNPs, 172 were then genotyped by *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] genotyping system and the results showed statistically significant differences between A (control) and B and C phenotypes for some SNPs located in NOS1, MTHFR, ACE and AGER genes, which allow the association of these SNPs with the development of DR. In this study 8 SNPs from the 28 missing SNPs were selected, due to higher deleterious potential: NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs8075924, ACE_rs4357, ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 and ACE_rs12720744. The SNPs were studied by the technique Allele-Specific PCR (AS-PCR) with detection by high-resolution denaturation (MeltDoctor).

According to the final results, NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs121912703 and ACE_rs113110741 SNPs were monomorphic in the 307 patients. Although the three possible genotypes were detected for ACE_rs8075924, the allele and genotype frequencies were also distributed equally among the three phenotypes, indicating lack of association with disease development. ACE_rs4357 and ACE_rs12720744 could be interesting and be associated with the progression of DR, but further studies are needed to delineate these possible correlations.

The genotyping results by AS-PCR were confirmed by Sanger sequencing. The sequence analysis resulted in the identification of 3 new SNPs: MTHFR_rs1801131, ACE_rs12720743 and ACE_rs4363. The rs1801131 was found to be a tagged-SNP of rs4846049, genotyped by *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] genotyping system. ACE_rs12720743 and ACE_rs4363, although intronic and only genotyped for 40 individuals, may be interesting. The first is a deletion and appeared in all the patients heterozygous in ACE_rs12720744, but not in those homozygous in this position. The second SNP is in a splice site (6 bases away from exon) and therefore could affect the transcription and subsequent translation into protein.

Keywords: Diabetic retinopathy, SNPs, genotyping

Capítulo 1

Introdução

1.1. Diabetes *Mellitus*

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crónica que afeta cada vez mais indivíduos em todo o mundo [1, 2]. Esta doença engloba um conjunto de doenças metabólicas que levam à hiperglicémia, ou seja, ao aumento dos níveis de glicose no sangue, devido à ocorrência de defeitos na secreção e/ou resistência à ação da insulina [1-3]. A longo prazo, o descontrolo crónico dos níveis de glicose no sangue conduz a complicações que afetam diferentes órgãos como os olhos, rins, nervos e coração [1, 4].

A DM divide-se essencialmente no tipo 1 (insulino-dependentes) e tipo 2 (não insulino-dependentes). A DM do tipo 1 engloba cerca de 5-10% do total de diabéticos, afeta maioritariamente indivíduos com menos de 20 anos, e caracteriza-se pela diminuição da secreção de insulina devido à destruição das células- β pancreáticas por um processo autoimune [1, 3-5]. A diabetes do tipo 2 afeta cerca de 90 a 95% do total de diabéticos, a maioria dos indivíduos após os 40 anos, e caracteriza-se pela resistência à ação da insulina que é provocada pela combinação de fatores genéticos e ambientais (idade, obesidade, gravidez, entre outros) [1, 3-5].

1.2. Retinopatia Diabética (RD)

A retinopatia diabética é uma complicação microvascular da retina relacionada com a diabetes [6]. A retina é um importante componente do olho que transmite as imagens do nervo ótico para o cérebro através das células fotossensíveis (cones e bastonetes) (Figura 1.1) [7, 8]. A hiperglicémia crónica é o principal fator que potencia o desenvolvimento anormal de vasos sanguíneos na retina levando a hemorragias e isquémia no olho [9, 10]. A destruição da retina, associada à diabetes, causa sérios danos na visão podendo culminar em cegueira.

As vias bioquímicas envolvidas na patogénese da RD incluem a via do polioliol (a via metabólica, induzida pela hiperglicémia, cujos produtos potenciam as lesões no olho) e a do stress oxidativo [10, 11]. Outras moléculas envolvidas são: a proteína cinase C (PKC), os produtos finais de glicação (AGEs), os fatores de crescimento e as moléculas de adesão de células endoteliais e leucócitos, que são reguladas positivamente pelos fatores de crescimento [6, 12-17]. Algumas destas moléculas

encontram-se envolvidas em fenômenos de resposta imunitária, formação de colagénio, adesão e agregação de plaquetas e inflamação [15].

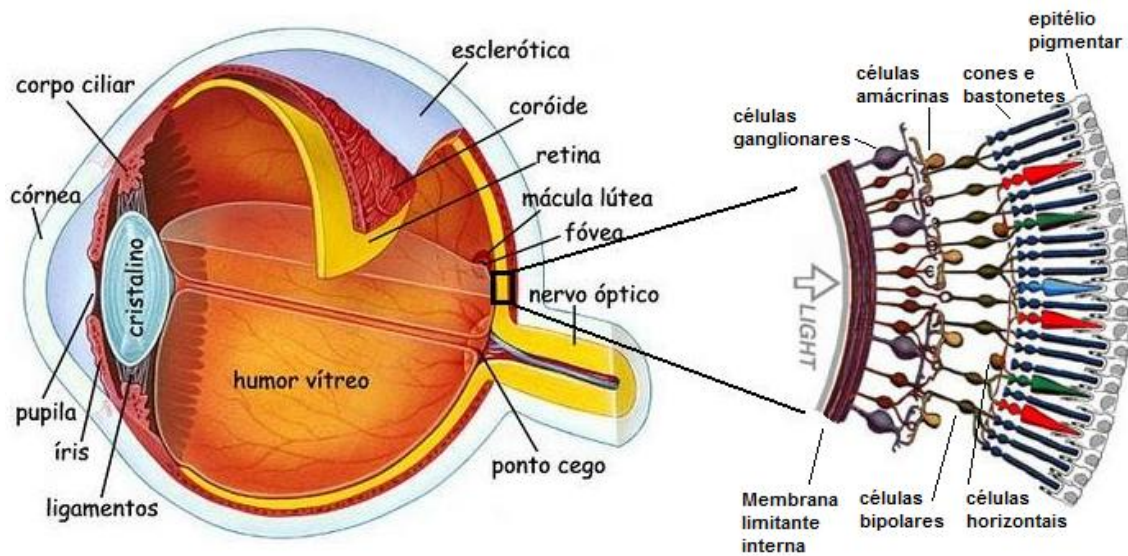


Figura 1.1: Desenho esquemático da constituição do olho humano com o pormenor das camadas celulares da retina. A retina, camada amarela, está envolvida por uma camada de vasos sanguíneos, a coróide. Imagem adaptada das referências 8 e 18.

1.2.1. Fatores de risco da RD

Os fatores de risco que contribuem para o aparecimento e progressão da RD, para além da hiperglicémia, são também a idade de início da diabetes, o aumento da pressão arterial, a dieta, o tabagismo, a hipertensão, a nefropatia e fatores oculares como, por exemplo, a miopia e o glaucoma [5, 6, 10, 11, 19, 20].

Para além destes fatores de risco que se podem controlar, estão também associados fatores genéticos, como variações únicas no gene, que ainda não estão totalmente clarificados [11].

1.2.2. Características físicas e classificação da RD

A hiperglicémia interage de forma complexa com a predisposição genética, hiperlipidémia e alterações nos fatores de coagulação, levando a diversas lesões no

organismo [10]. A hiperglicemia gera stress oxidativo e dano nos capilares da retina, que para compensar essa perda, o organismo tenta desenvolver mecanismos com o objetivo de formar novos vasos sanguíneos, num processo chamado de neovascularização, em determinada etapa do desenvolvimento da RD [16, 21]. No entanto, estes novos vasos são muito frágeis, não conseguem responder às necessidades da retina e causam edema, resultando numa deficiência visual que é complementada pelo espessamento da membrana basal, formação de microaneurismas, ruptura da barreira hemato-retiniana, e apoptose de células endoteliais e do pericito (células de suporte que ocorrem nos capilares da lâmina basal e contribuem para a estabilização dos vasos sanguíneos pequenos) [6, 12, 15, 21, 22].

A RD pode ser classificada de acordo com o tipo de diabetes, alterações no aspeto da retinopatia, entre outros fatores [5]. De uma forma geral, a RD pode ser dividida em RD proliferativa, forma predominante em diabéticos do tipo 1 e não proliferativa, prevalente em diabéticos do tipo 2 [5, 23]. Na RD proliferativa ocorre neovascularização. Na RD não proliferativa, os processos inflamatórios levam ao aumento da permeabilidade vascular e à ruptura da barreira hemato-retiniana (barreira que regula o ambiente no interior da retina), o que conduz ao derrame de fluídos que causam edema na retina e, por conseguinte, disfunção dos fotorreceptores que pode conduzir à perda de visão quando o centro da mácula, a fóvea, é afetado (Figura 1.2) [21, 24]. Estes indivíduos dizem-se “portadores” de Edema Macular Diabético (EMD) [21].

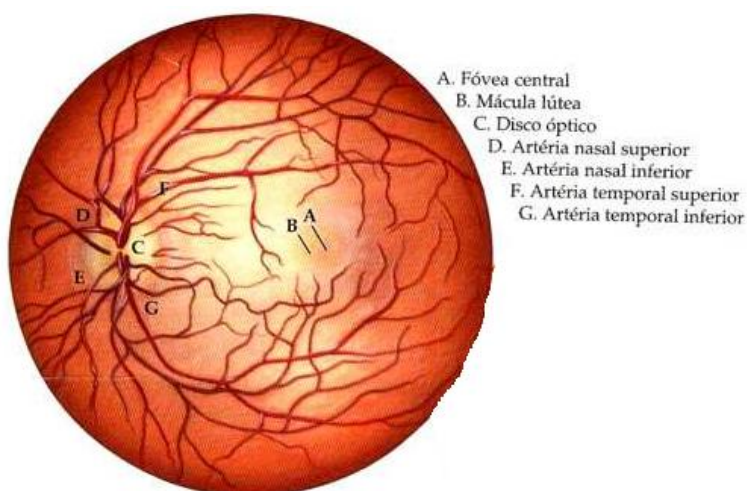


Figura 1.2: Imagem representativa do fundo do olho onde se destaca a posição da fóvea (A), mácula (B) e disco óptico (C). Imagem adaptada da referência 7.

1.2.3. Sintomas e tratamento da RD

Os doentes com RD não possuem sintomas até ao momento em que a doença se começa a agravar de forma intensa e irreversível. Numa fase avançada, os sintomas da RD incluem: visão distorcida; moscas volantes, que correspondem a derrames e se traduzem na flutuação de pequenas partículas negras no interior do olho; sombras ou áreas de visão que não se conseguem alcançar; dificuldade em ver à noite e posterior perda de visão [25, 26].

Estes sintomas ocorrem numa fase já avançada da RD, pelo que o acompanhamento oftalmológico dos doentes com diabetes é crucial na deteção precoce e atuação atempada, numa fase em que ainda é possível reverter este processo e evitar complicações dramáticas [25]. Apesar dos avanços, até ao momento não é conhecida nenhuma terapia preventiva eficaz [22, 27, 28]. Existe uma técnica, a fotocoagulação a laser, para o tratamento do EMD, mas tem a desvantagem de ser destrutiva [16, 28]. A qualidade de vida dos diabéticos com RD é sem dúvida afetada, pelo que é fundamental apostar na prevenção através da ida regular ao oftalmologista, bom controlo da glicémia e da pressão sanguínea [2, 16].

1.2.4. Incidência da RD

A RD apresenta elevados níveis de incidência nos países em desenvolvimento, sendo uma das principais causas de perda de visão, muito provavelmente devido à falta de acompanhamento dos doentes com diabetes [12, 29].

A grande maioria dos indivíduos com DM do tipo 1 e 60-80% dos indivíduos com tipo 2 adquirem algum tipo de retinopatia após 15 a 20 anos de duração da doença [15, 30].

Em Portugal continental, no ano de 2011, os registos do Sistema Nacional de Saúde, reportaram que 34,5% dos doentes com diabetes eram portadores de RD [2]. Existe um programa nacional de rastreio da doença que engloba a realização periódica de retinografias (exame de imagem que fotografa as áreas do fundo do olho, como a retina, a coróide, o nervo ótico e os vasos sanguíneos) [2, 31]. A Tabela 1.1 mostra o progressivo aumento de retinografias realizadas nos vários pontos do país, deste 2009 a 2011, bem como o número de pessoas identificadas para tratamento [2].

Tabela 1.1: Número de retinografias realizadas no âmbito dos Programas de Rastreio da Retinopatia Diabética e de pessoas identificadas para tratamento. ARS – Administração Regional de Saúde, LVT – Lisboa e Vale do Tejo. Tabela adaptada da referência 2.

ARS	Retinografias realizadas			Pessoas identificadas para tratamento em 2011	
	Em 2009	Em 2010	Em 2011	Número	Porcentagem
Norte	791	8 839	39 006	1 309	3,4%
Centro	14 766	15 271	15 473	736	4,8%
LVT	3 131	13 867	23 105	514	2,2%
Alentejo	n.d.	2 761	2 872	38	1,3%
Algarve	10 907	9 395	13 580	1 348	9,9%
Total	29 595	50 133	94 151	3 945	4,2%

1.3. A genética no desenvolvimento da RD

Acredita-se que existe uma componente genética associada ao desenvolvimento da RD. Existem diabéticos que desenvolvem RD, em períodos de tempo relativamente curtos, apesar de um controlo rigoroso dos níveis de glicose e da pressão arterial [11, 32]. Outros, pelo contrário, não mantêm um controlo apertado dos fatores de risco, acima referidos, e ainda assim não desenvolvem complicações ao nível da retina [6]. Estas evidências sugerem que outros fatores, para além da hiperglicémia e pressão sanguínea elevada, contribuem para o desenvolvimento e progressão da RD [11]. Diferenças epidemiológicas e patofisiológicas evidenciam o envolvimento de fatores genéticos e alterações hemodinâmicas [23]. Na população mundial observam-se diferenças na progressão da doença em diferentes locais (países) bem como em diferentes raças, sendo possível associar diferentes fatores genéticos e ambientais com o desenvolvimento da doença [11].

A RD é então considerada uma doença complexa ou multifactorial; o seu desenvolvimento parece envolver fatores genéticos, provavelmente vários genes (contexto poligénico), e ambientais (estilos de vida) [6, 16, 33].

Na literatura têm sido referenciados vários genes como potencialmente associados com o desenvolvimento da RD, mas nenhum foi ainda implicado de forma inequívoca. A retinopatia pode ser de tal modo complexa que envolve mais influências

poligénicas e ambientais que outras doenças também consideradas complexas, mas mais entendidas do ponto de vista etiológico [11]. Outra das razões pode estar associada com a falta de uniformidade na determinação e classificação dos diferentes fenótipos da doença [11, 15]. Para além dos aspetos já focados, existem ainda casos de RD que se podem desenvolver exclusivamente devido a fatores de risco ambientais ou então ainda aqueles que se desenvolvem em não diabéticos [11]. O tamanho da amostra (estudos com mais de 100 indivíduos com RD são pouco frequentes), a mistura de populações e a interpretação dos resultados estatísticos são outras das possíveis razões para a falta de consenso observada [6, 15].

1.3.1. Genes candidatos ao desenvolvimento da RD

Com base na literatura estão descritos onze genes candidatos com elevado potencial para o desenvolvimento da RD e, por isso, os mais interessantes, para já, no desencadear da doença: ACE, AGER, AKR1B1, NOS1, NOS3, VEGF, PPARGC1A, TGF- β 1, MTHFR, ICAM1 e TNF- α .

1.3.1.1. Gene ACE

O gene ACE - “Angiotensin I Converting Enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1”, localizado no cromossoma 17q23.3, codifica uma proteína conhecida como enzima conversora da angiotensina I [34].

A ACE é essencialmente sintetizada nas células endoteliais dos capilares pulmonares e renais [35]. Encontra-se na membrana celular destas células, mas também é secretada para o espaço extracelular [36-38]. Esta proteína está envolvida em vários processos biológicos, tais como: a proliferação de células do músculo liso, a regulação da vasodilatação e da vasoconstrição, a regulação da pressão arterial sistémica pelo sistema renina-angiotensina (RAS), no processo catabólico de peptídeos e de hormonas, na remodelação dos vasos sanguíneos ou no desenvolvimento renal, entre outros [38, 39].

A ACE tem atividade proteolítica, sendo um dos componentes essenciais no RAS [36, 38]. Este é um sistema enzimático-peptídeo que ocorre na circulação e nos tecidos, designando-se por RAS circulante e RAS local, respetivamente [40-42]. No

olho, o RAS encontra-se ativo sistêmica e localmente e, de forma geral, regula a pressão sanguínea e a homeostase de fluidos [16, 42]. O RAS controla a pressão sanguínea por regulação da libertação da enzima renina a partir da pró-renina, precursor inativo da renina, que é sintetizado constitutivamente pelos rins (Figura 1.3) [23, 42-44]. A renina é libertada quando o fluxo renal do aparelho justaglomerular ou a concentração de NaCl no filtrado dos rins diminui [35, 44]. Após libertação, a renina atua no peptídeo inativo angiotensinogénio (produzido pelo fígado) e por clivagem converte-o em angiotensina I (Ang-I) [35]. Posteriormente, a ACE catalisa a conversão do decapeptídeo Ang-I, através de hidrólise, num octapeptídeo, a angiotensina II (Ang-II) [36, 39, 45].

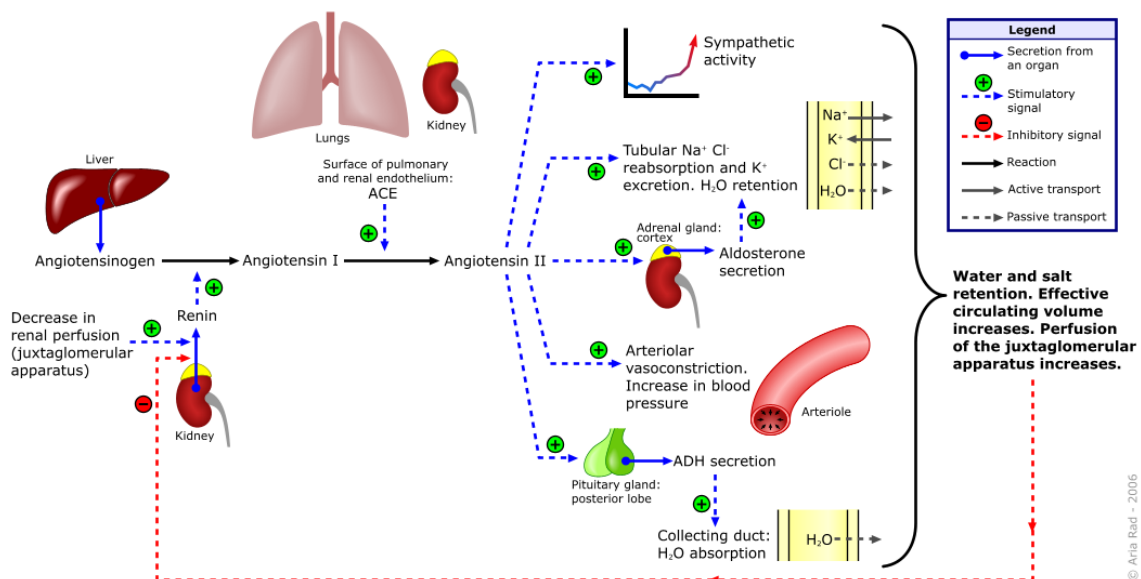


Figura 1.3: Sistema renina-angiotensina. Imagem retirada da referência 44.

A Ang-II é um forte vasoconstritor que se encontra fisiologicamente ativo [34, 37, 42, 46]. A Ang-II regula a pressão arterial de uma forma direta através de vasoconstrição pela modulação de sódio e reabsorção de água através da estimulação dos seus recetores no rim e de uma forma indireta pela estimulação da síntese e libertação de aldosterona pelas glândulas supra-renais ou ainda pela estimulação da sensação de sede no sistema nervoso central [35, 42]. Na retina, a alteração da regulação da pressão sanguínea e do equilíbrio líquido-electrólito potencia o desenvolvimento de RD [27, 34, 37, 46]. Em animais, os recetores da renina, da ACE e da Ang-II foram encontrados nos vasos de diversas estruturas do olho, nomeadamente da retina [16, 19]. Em humanos com RD foram observadas elevadas concentrações de pró-renina, ACE e Ang-II no plasma ocular [16, 19, 23, 27, 47]. Deste modo, estes componentes têm sido correlacionados com diabetes, complicações microvasculares e retinopatia proliferativa,

em particular [23]. O aumento destes componentes demonstra o envolvimento do RAS local nas disfunções da retina ao nível vascular, ou seja, relacionam-se com a severidade da doença [16, 27]. A Ang-II como forte vasoconstritor e fator angiogénico (desenvolvimento de novos vasos a partir dos existentes) pode ser o fator causativo da neovascularização no olho diabético, típico da retinopatia proliferativa [19, 48]. Diferentes níveis de expressão do gene ACE têm sido associados com o polimorfismo I/D (Inserção/Deleção), que corresponde à repetição da sequência alu em 287 pares de bases, localizado no intrão 16, sendo as concentrações elevadas relacionadas com a homozigotia para o alelo D [23, 39, 47].

Para além do seu forte envolvimento no RAS, a proteína ACE também inativa a bradiquinina, um peptídeo vasodilatador, através da sua clivagem em produtos de degradação de quinina [45]. Este peptídeo atua no sistema “kallikrein-kinin”, um sistema também envolvido na regulação da pressão sanguínea e do tónus vascular mas por vasodilatação [36, 39, 49].

1.3.1.2. Gene AGER

O gene AGER - “Advanced Glycation End Product-Specific Receptor”, localizado no cromossoma 6p21.3, codifica uma proteína designada pelo mesmo nome [50].

Esta proteína é um recetor multi-ligando que possui duas isoformas: uma encontra-se na membrana celular e a outra é secretada [10, 50, 51]. O AGER é expresso em vários tecidos, como os pulmões, coração, rins, cérebro, músculo-esquelético, e em diferentes tipos de células, como as endoteliais e imunitárias (macrófagos/monócitos, neutrófilos e linfócitos), astrócitos e microglia [10, 32, 52, 53].

AGER liga os produtos finais de glicação avançada (AGEs) e também diversas moléculas envolvidas na homeostase, no desenvolvimento, na inflamação e em doenças como a diabetes [50, 51, 54]. Esta proteína, como membro da superfamília das imunoglobulinas dos recetores da superfície celular, está envolvida na regulação positiva da resposta inflamatória, na regulação da apoptose, na regulação positiva da proliferação de células do músculo liso ou na ativação do fator nuclear de transcrição NF-kB, entre outros [10, 50, 51, 53, 54].

Os AGEs são um grupo complexo e heterogêneo de produtos finais de reações não enzimáticas entre açúcares redutores (como a glucose) e proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos, catalisadas por metais de transição (Figura 1.4) [10, 52, 55]. Os produtos intermédios destas reações, também conhecidas como reações de *Maillard*, são as bases de *Schiff* e os produtos *Amadori* que participam numa via direta de formação dos AGEs (Figura 1.4) [10].

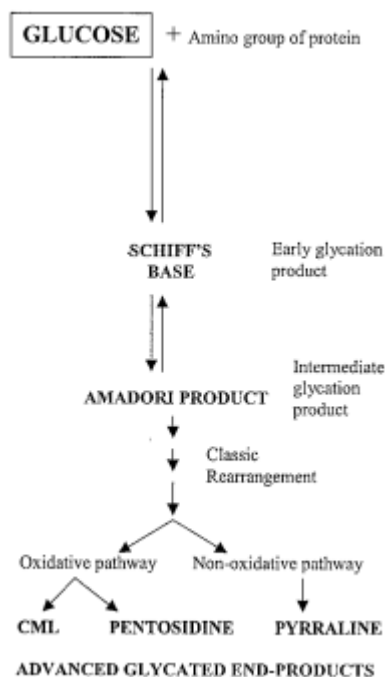


Figura 1.4: Via direta de formação de AGEs. Imagem adaptada da referência 10.

Os AGEs acumulam-se no tecido vascular com o envelhecimento e também com a diabetes, pois a glicação encontra-se aumentada nesta doença [10, 55, 56]. AGEs podem ser também provenientes de fontes exógenas, como é o caso do fumo do tabaco [10].

Os AGEs ao interagirem com o recetor AGER levam ao aumento intracelular do stress oxidativo, que estimula a produção das cinases PKC e ERK1/2 [55]. Estas duas moléculas conduzem à ativação de NF- κ B, um regulador pleiotrópico, que regula positivamente genes de “respostas-à-lesão” levando à expressão de várias citocinas, como o VEGF, TGF- β , IL-1 α , IL-6 e TNF- α , e a moléculas de adesão, como a CD18 e a ICAM-1, que estão associadas com a ocorrência de danos nas células da retina, como a acumulação de leucócitos na retina (leucostase retinal) e a quebra da barreira hemato-retiniana em diabéticos [10, 33, 52, 55, 56]. A acumulação de AGE pode também

contribuir para derrames vasculares devido ao aumento da permeabilidade das células endoteliais retiniais, conduzindo a oclusão e isquemia. Por sua vez, a indução de fatores de crescimento como VEGF, resultam na angiogênese e na neovascularização [10].

A expressão de AGER tem sido descrita em alguns tipos de células da retina, como nas ganglionares e epiteliais [53]. As preparações de vasos da retina de ratinhos diabéticos (com 26 semanas de diabetes (Figura 5b)) demonstram um aumento de 2,6 vezes de AGEs em relação a não diabéticos (Figura 4a), o que reflete a relação quantitativa entre a glicemia e acumulação de AGEs [32].

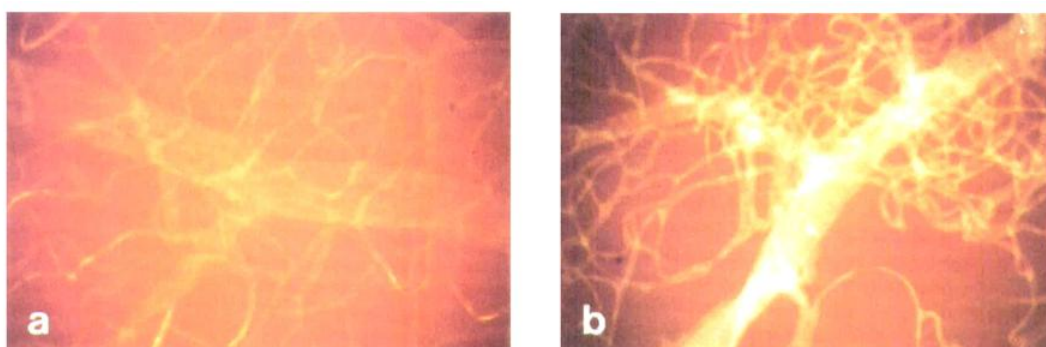


Figura 1.5: Microfotografias de preparações de vasos da retina de ratos sem diabetes (a) e com diabetes (b) com marcação de fluorescência específica para AGEs. Imagem retirada da referência 10.

1.3.1.3. Gene AKR1B1

O gene AKR1B1 - “Aldo-Keto Reductase family 1”, localizado no cromossoma 7q35, codifica uma proteína, a aldose reductase, que está envolvida em danos microvasculares em diabéticos através da via do polioliol [57, 58]. Esta via catalisa a redução da glucose em sorbitol, uma molécula que, de uma forma indireta, faz parte de uma via alternativa à produção de AGEs (Figura 1.6) [10, 18, 58, 59].

O gene AKR1B1 é expresso em muitos tecidos dos mamíferos e existe em grande concentração na retina, nas lentes, entre outros; sendo que a acumulação de sorbitol nestas estruturas causa desequilíbrios osmóticos que conseqüentemente levam a alterações do olho [18, 60].

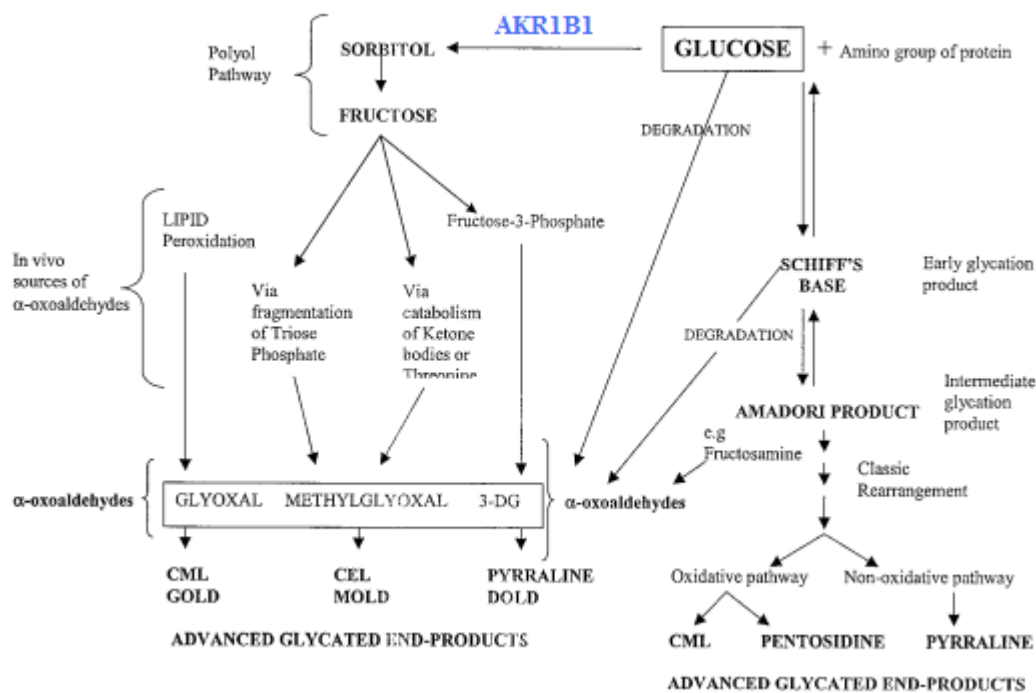
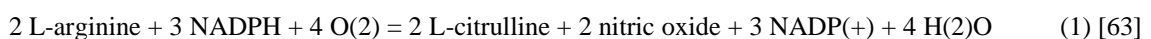


Figura 1.6: “Via direta” e “via indireta” da formação de AGEs pela ativação da via do polioli. Imagem adaptada da referência 10.

1.3.1.4. Gene NOS1

O gene NOS1 – “Nitric Oxide Synthase 1”, ou nNOS (NOS neuronal), localizado no cromossoma 12q24.22, codifica a sintase do óxido nítrico 1 (neuronal) [61, 62].

Esta proteína pertence à família das sintases do óxido nítrico (NO), onde se incluem as sintases induzível (NOS2) e endotelial (NOS3), que sintetizam NO e L-citrulina a partir de L-arginina e O₂ molecular, pelo estímulo cálcio/calmodulina, de acordo com a reação representada na equação 1 [24, 61, 63-65]. A proteína localiza-se no sarcolema do músculo-esquelético, cardíaco e liso, sendo que é no músculo-esquelético que apresenta elevados níveis de expressão [61, 64, 66].



O NO é um radical livre reativo que atua como mediador biológico em vários processos fisiológicos e patológicos incluindo: biossíntese de neurotransmissores, neurotoxicidade, atividades antimicrobianas e antitumorais, resposta ao calor e à hipoxia, processo catabólico da arginina, regulação positiva da vasodilatação (atua para

manter uma apropriada vasodilatação arterial), coagulação sanguínea (é libertado no meio circulante em resposta aos produtos derivados das plaquetas), resposta ao stress multicelular, fusão do mioblasto, contração do músculo-esquelético, função sexual, e homeostase dos fluidos corporais [61, 62, 64, 65, 67]. Tem sido também implicado em doenças como aterosclerose, RD, degeneração da mácula relacionada com idade, entre outras [24, 61].

No leito vascular da retina, há libertação basal constante de NO que mantém a circulação retiniana num estado de vasodilatação [65]. Sabe-se que o NO está envolvido na leucostase e quebra da barreira hemato-retiniana num estado precoce da RD, pois o NO medeia a molécula de adesão de leucócitos, ICAM-1, mas ainda não se conseguiu compreender qual das sintases é a principal envolvida na sua produção [9]. A Figura 1.7 mostra a adesão de leucócitos nos vasos da retina de murganhos (Figura 1.7A e 7B) sem diabetes (controlo) (C), com diabetes (D) e controlos + diabéticos tratados com L-NAME, um inibidor das 3 sintases do NO, (L-NAME e D L-NAME, respetivamente). Nos murganhos diabéticos tratados com L-NAME observa-se uma redução significativa do número de leucócitos em comparação com os animais diabéticos não tratados (Figuras 1.7A, 1.7B e 1.7C). No grupo controlo, o tratamento com o inibidor não causou mudanças significativas, indicando que na diabetes existe um claro aumento da produção de NO. A Figura 1.7D mostra um aumento no número de leucócitos aderentes nos vasos localizados perto do disco ótico, induzido pela diabetes, em comparação com o grupo controlo. Verifica-se que o número de leucócitos aderentes nas retinas dos ratos diabéticos, tratados com o inibidor, diminuiu; pelo contrário, não foram observadas alterações nas retinas dos ratos controlo sujeitos a esse tratamento. Os vasos das retinas dos ratos controlo permaneceram normais, não se detetou vazamento. Nos ratos diabéticos, duas semanas após o início de indução de diabetes ocorreu desagregação da barreira hemato-retiniana, observada pela saída de azul de Evans dos vasos da retina. O mesmo não se verificou nos ratos diabéticos tratados com L-NAME (Figura 1.7A) [9].

1.3.1.5. Gene NOS3

O gene NOS3 – “Nitric Oxide Synthase 3”, ou eNOS (NOS endotelial), localizado no cromossoma 7q36, é expresso constitutivamente e codifica a sintase do óxido nítrico 3 [63, 68].

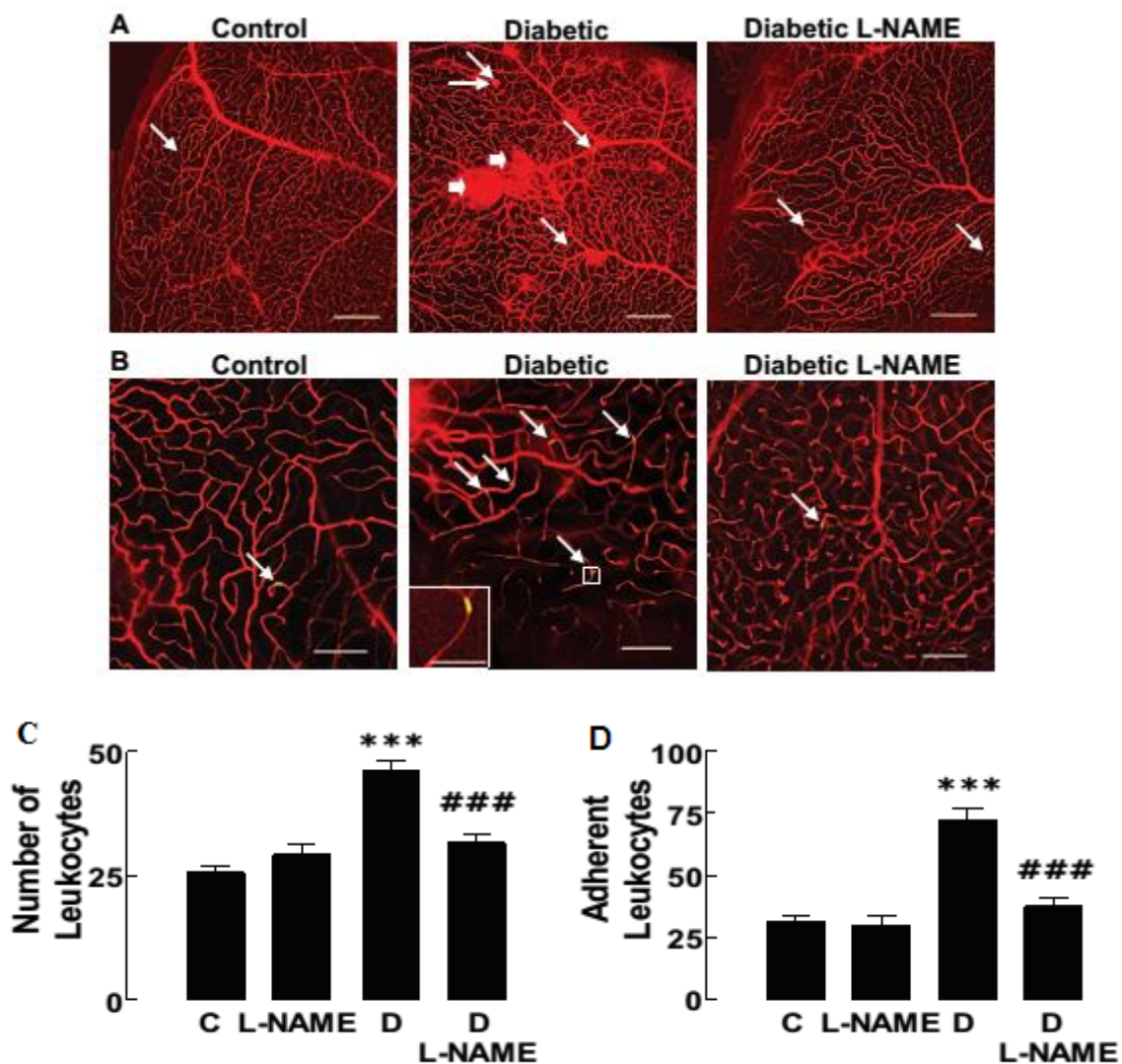


Figura 1.7: Envolvimento de NO na leucostase da retina e ruptura da barreira hemato-retiniana na diabetes. Os leucócitos corados com C-AM, isolados a partir do baço de ratinhos controle, foram injetados em diferentes grupos: controles (C), controles tratados com L-NAME (L-NAME), diabéticos (D), diabéticos tratados com L-NAME (D_L-NAME). L-NAME é um inibidor das 3 sintases do NO. (A) Imagens da acumulação de leucócitos e da ruptura dos vasos das retinas. Setas compridas: leucócitos aderentes (verde). Setas curtas/grossas: vazamento dos vasos retinianos. Barra de escala: 200 μ m. (B) Imagens semelhantes às de (A) mas com maior ampliação. Barra de escala: 100 μ m. As imagens de (A) e (B) foram obtidas através de sistema de imagem confocal a laser. (C) Gráficos referentes à quantificação do número de leucócitos aderentes nos vasos de toda a retina para cada condição do ensaio. (D) Quantificação de leucócitos aderentes utilizando um oftalmoscópio a laser. Os dados são apresentados como média \pm SD de pelo menos seis ratos. *** P <0,001 em comparação com os ratos controle; # # # P <0,001 em comparação com ratos diabéticos. Imagens adaptadas da referência 9.

A proteína localiza-se na membrana celular e no complexo de Golgi e sintetiza NO a partir de L-arginina, tal como a NOS1 (equação 1) [61, 63].

Os processos biológicos associados ao NO, produzido pela NOS3, encontram-se descritos anteriormente para o gene NOS1 [63, 68]. O NO é também responsável pela angiogénese nos vasos coronários, induzida por fatores de crescimento, como observado em modelos animais *knockout* para NOS3 [6, 63]. O NOS3 tem ainda uma função

importante na homeostase cardiovascular, pois tem a capacidade de regular o diâmetro dos vasos sanguíneos e manter este ambiente anti-proliferativo e anti-apoptótico [63]. A redução de NO endotelial conduz à diminuição da vasodilatação. Quando as células endoteliais são expostas a elevados níveis de glucose ocorre produção de aniões superóxido que se combinam rapidamente com o NO, diminuindo a eficácia da vasodilatação e comprometendo a homeostase geral da vasculatura [9]. Na reação de NO com superóxido há ainda outro fator preocupante que é a produção de peroxinitrito, uma espécie reativa de oxigênio tóxica, observada em níveis aumentados na retina de ratos diabéticos [9]. O peroxinitrito pode danificar proteínas, lípidos e DNA [24]. A formação destas espécies em excesso prejudica a hemodinâmica ocular [69].

1.3.1.6. Gene VEGF

O gene VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor A”, localizado no cromossoma 6p21.1, codifica o fator de crescimento vascular endotelial [70, 71].

Esta proteína atua através de interações recetor-ligando, principalmente nas células endoteliais, e tem várias funções: medeia o aumento da permeabilidade vascular, induz a angiogênese, a vasculogênese (desenvolvimento de novos vasos a partir de células embrionárias), a proliferação de células endoteliais, a migração celular, inibe a apoptose, provoca a adesão de leucócitos na retina e pensa-se que é um forte mediador da neovascularização ocular relacionada com a isquemia da retina [13, 21, 70, 72-75]. A Figura 1.8 mostra que a injeção intravítrea de VEGF (Figura 1.8B), em olho de macaco, provoca neovascularização na retina [76].

VEGF é produzido na retina em resposta a situações de hipoxia, pois a deficiente oxigenação da retina, bem como a hiperglicemia, induzem a sobreexpressão da proteína [21, 77, 78]. Os monócitos migram em resposta ao fator de crescimento e quando aderem ao endotélio, assim como outros leucócitos, são responsáveis pelo aumento local de VEGF [74]. Por esta razão o corpo vítreo dos indivíduos com RD apresenta maior concentração da proteína [78]. Ainda outros fatores como, por exemplo, o TNF- α e AGEs, que têm sido associados à RD, levam ao aumento da expressão dos níveis de VEGF que por sua vez leva ao aumento de outras moléculas também associadas à doença, como a ICAM-1 e NOS3 [13, 74].

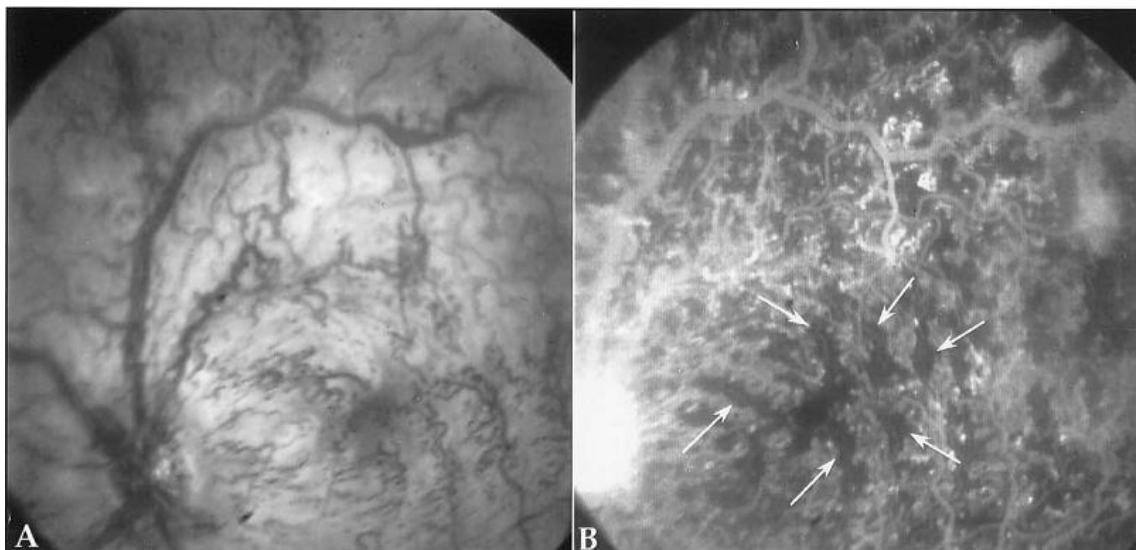


Figura 1.8: Fotografia de fundo de olho de macaco (A) e angiografia fluoresceínica do mesmo olho (B). A: fotografia após injeção intravítrea de VEGF que mostra dilatação dos vasos sanguíneos. B: imagem obtida 54 segundos após a injeção de VEGF onde é possível observar regiões de não perfusão capilar incluindo a mácula (setas), saída de corante a partir do nervo ótico e os vasos da retina terminam em estruturas parecidas com micro-aneurismas. Imagem retirada da referência 76.

1.3.1.7. Gene PPARGC1A

O gene PPARGC1A – “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha”, localizado no cromossoma 4p15.1, codifica uma proteína com o mesmo nome [79, 80].

Esta proteína nuclear está associada com a ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias metabólicas como, por exemplo, no metabolismo oxidativo, na homeostase energética celular, no metabolismo da glicose e de lípidos e também parece estar envolvida no controlo da pressão sanguínea e no desenvolvimento de obesidade [79-81].

A PPARGC1A (ou PGC-1 α) é expressa em maior quantidade em tecidos que possuem uma capacidade oxidativa elevada, pois é regulada em resposta ao stress oxidativo atuando na regulação das espécies oxidativas [82]. Destes tecido destacam-se o cérebro, os rins e o fígado, que induz a expressão da proteína em situações de jejum; o coração, devido a isquémia; o músculo-esquelético, por causa do exercício físico onde pode ocorrer a troca de tipos de fibras (“fiber type switching”) e o tecido adiposo castanho, pela exposição ao frio [82, 83].

A redução da expressão desta proteína, principalmente no músculo-esquelético, associa-se à redução de genes oxidativos na DM do tipo 2 [82, 84]. A diminuição da

expressão da PPARGC1A, em conjunto com a disfunção mitocondrial em vários tecidos, principalmente no adiposo, pensa-se estarem, portanto, associadas à resistência da insulina e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de DM do tipo 2 [85].

No entanto, já se verificou *in vivo* que, numa situação de isquemia e durante o exercício físico, onde a expressão da proteína PPARGC1A aumenta, há aumento da expressão de VEGF e de outros genes indutores da angiogénese, uma conseqüência da RD (Figura 1.9).

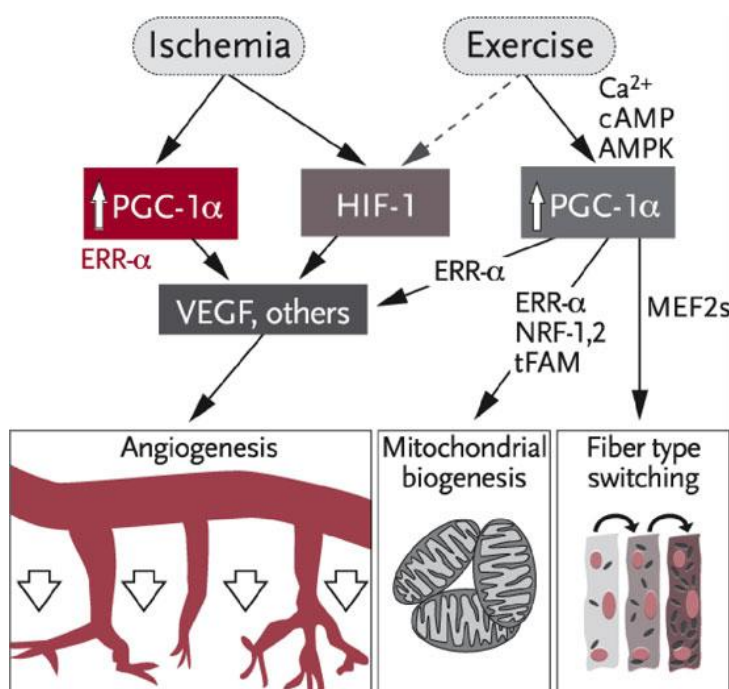


Figura 1.9: Diagrama representativo das proteínas envolvidas na formação de angiogénese, biogénese mitocondrial e troca de tipos de fibras após indução da expressão de PGC-1α por isquemia e exercício. Imagem retirada da referência 84.

Têm vindo a ser feitos estudos em vários SNPs do gene PPARGC1A para perceber a sua influência na diabetes [82].

1.3.1.8. Gene TGF-β1

O gene TGF-β1 – “Transforming Growth Factor, Beta 1”, localizado no cromossoma 19q13.2, codifica o fator de crescimento transformante β1 [86, 87].

Este peptídeo multifuncional é expresso em fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, plaquetas e monócitos e está envolvido na regulação da proliferação, diferenciação, adesão e migração celular em vários tipos de células, na modulação das

células imunitárias e produção de citocinas, e promove a síntese de componentes da matriz extracelular, onde se localiza [22, 86, 87]. Deste modo, desempenha um papel importante na regulação da função vascular e homeostase [88].

A expressão de TGF- β 1 e recetores, existentes também nas células que produzem a proteína, foi demonstrada no olho [22]. Evidências sugerem que este fator de crescimento é necessário à função normal da barreira hemato-retiniana (Figura 1.10), mas também que a interação do TGF- β 1 com o seu recetor, ALK-5, está envolvida no espessamento da membrana basal dos capilares da retina que ocorre precocemente na RD [22].

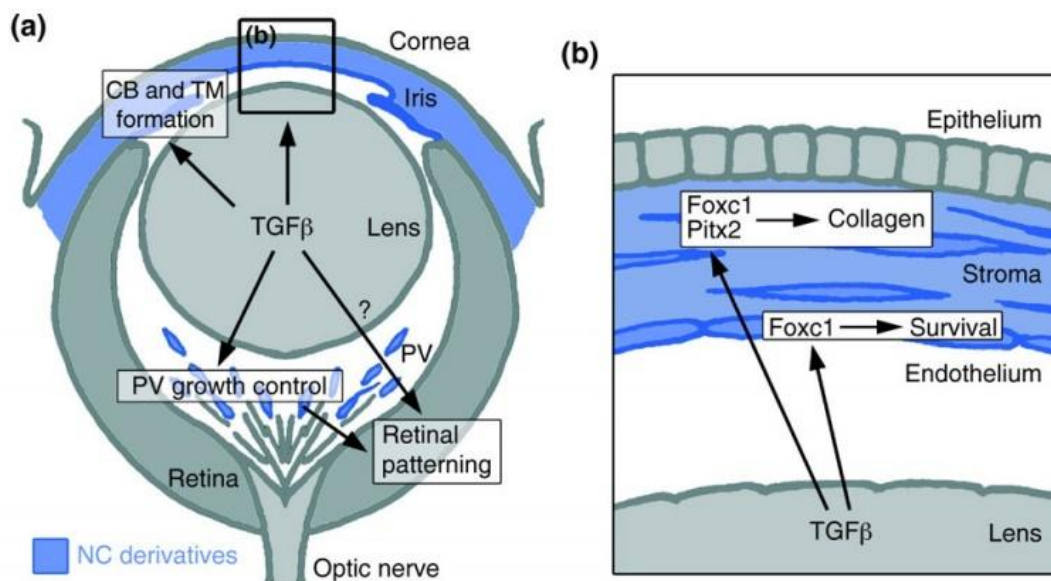


Figura 1.10: Ação do TGF- β no olho de rato. a) Células derivadas da crista neural (NC), a azul formam a parte anterior do olho e o vítreo primário (PV). O TGF- β promove a formação dos corpos ciliados (CB) e da malha trabecular (TM) e controla o crescimento de PV. b) Na córnea, o TGF- β está envolvido na expressão dos fatores de transcrição Foxc1 e Pitx2 e na diferenciação das células derivadas de NC em queratócitos estromais que sintetizam colágeno e também na expressão de Foxc1 que leva à formação de células endoteliais da córnea e sobrevivência da célula. Imagem retirada da referência 89.

1.3.1.9. Gene MTHFR

O gene MTHFR – “Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)”, localizado no cromossoma 1q36.3, codifica uma proteína com o mesmo nome, uma oxirredutase [90-93].

Esta proteína MTHFR está envolvida em vários processos biológicos como no metabolismo de aminoácidos, vitaminas, ácido fólico (Vitamina B9) e homocisteína, na biossíntese de metionina e síntese de neurotransmissores [92, 94, 95]. A MTHFR catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato, de

acordo com a equação 2. Este último é um co-substrato, a maior forma circulante de folato, para a remetilização de homocisteína em metionina, ou seja, para a biossíntese de metionina [91, 93, 94, 96, 97]. A metionina é utilizada pelo organismo na síntese de proteínas e de outros compostos [94].



Se a atividade de MTHFR diminui, a concentração de folato também, o que afeta a metilação de homocisteína em metionina [96]. A diminuição de folato tem consequências negativas para o organismo, pois este composto influencia a síntese, reparação e metilação de DNA, provocando danos nos cromossomas que podem originar tumores [96].

A hiperhomocisteinemia é uma doença causada por defeitos genéticos das enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína sendo a presença do polimorfismo C677T (Ala222Val), no gene MTHFR, um dos responsáveis por prejudicar a atividade dessas enzimas (Figura 1.11) [93, 97-99]. Por conseguinte, a doença caracteriza-se pela presença de elevadas concentrações de homocisteína no plasma, fator de risco para doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, cancro, diabetes, entre outras [97, 100, 101]. O MTHFR é, na prática, um forte indicador da predisposição para o desenvolvimento de doenças crônicas [95]. A hiperhomocisteinemia em indivíduos diabéticos tem sido relacionada com a prevalência de doenças microvasculares e, conseqüentemente, com a RD [3, 90, 98].

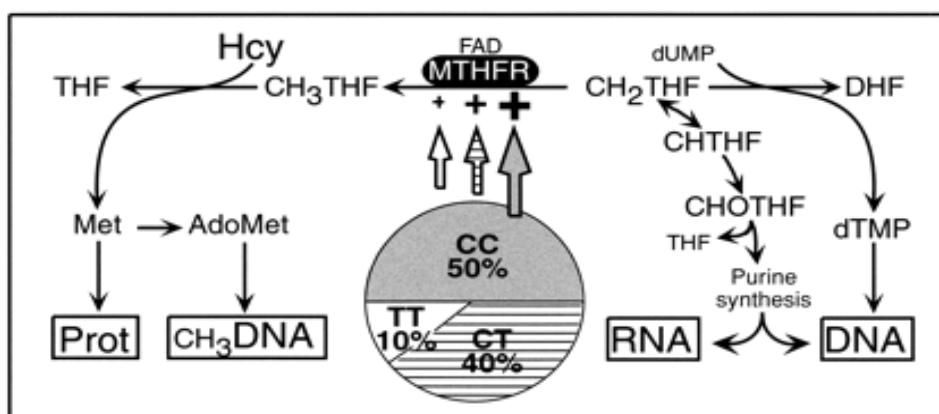


Figura 1.11: O gene MTHFR está envolvido em vários processos biológicos como a síntese de metionina (Prot), metilação de DNA (CH₃DNA) e sínteses de RNA e DNA. O polimorfismo C677T deste gene afeta, de forma diferente, esses processos devido à diminuição da produção de folato necessário a todos eles. O gráfico mostra a distribuição do genótipo encontrado em populações brancas, pois a prevalência deste polimorfismo varia muito com a população e etnia, e as setas verticais relacionam o genótipo com a atividade de MTHFR. Imagem retirada da referência 95.

1.3.1.10. Gene ICAM1

O gene ICAM1 – “Intercellular Adhesion Molecule 1”, localizado no cromossoma 19p13.2, codifica uma glicoproteína, ICAM-1, que é geralmente expressa em células do endotélio e do sistema imunitário [29, 102, 103].

A proteína promove a adesão e migração de leucócitos nas células endoteliais em locais de dano e inflamação, através da sua interação com os recetores presentes nos leucócitos (Figura 1.12) [29, 104].

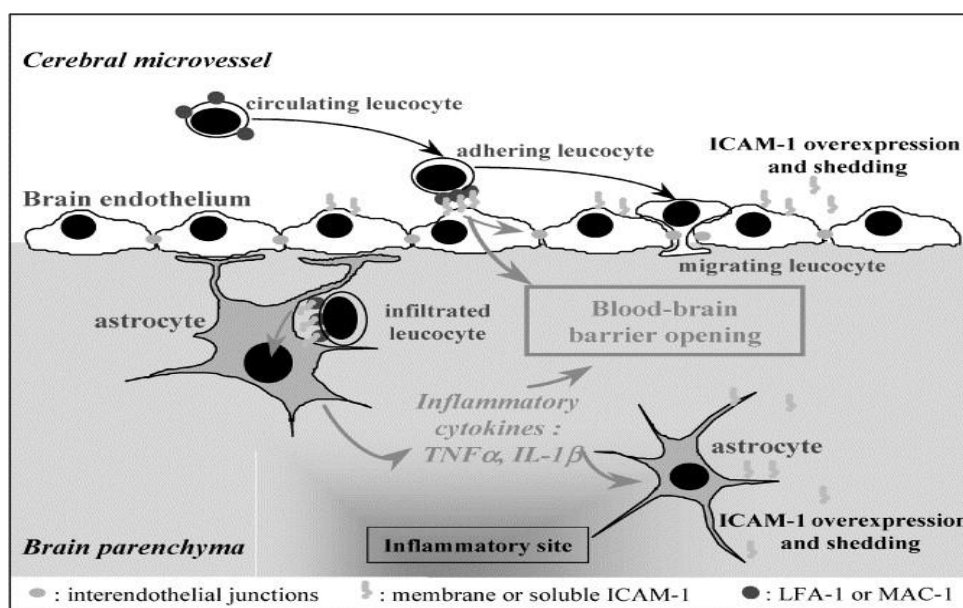


Figura 1.12: Proteína ICAM-1 envolvida na adesão e migração de leucócitos no cérebro [105].

Esta proteína liga-se a integrinas, o que provoca a agregação de células leucocitárias (principalmente neutrófilos que contêm integrinas na sua superfície) às células epiteliais do endotélio, ocorrendo leucostase retinal [13, 29, 74, 103]. A leucostase nos capilares da retina, associada ao desenvolvimento da RD numa fase inicial, conduz posteriormente ao vazamento vascular retinal (ruptura da barreira hemato-retiniana) devido à disrupção das junções (“tight junctions”) entre as células endoteliais [13, 74].

1.3.1.11. Gene TNF- α

O gene TNF- α – “Tumor Necrosis Factor Alpha”, localizado no cromossoma 6p21.33, codifica uma proteína transmembranar pro-inflamatória que é secretada por vários tipos de células, mas principalmente por macrófagos [13, 14, 106-108].

Esta citocina está envolvida na regulação de uma grande gama de processos biológicos, nomeadamente na proliferação celular, na diferenciação, na apoptose (mediada diretamente pelo recetor ou indiretamente pelo aumento da leucostase), no metabolismo lipídico e na coagulação [14, 107, 108]. Esta proteína promove ainda vários processos inflamatórios, como a regulação positiva de moléculas de adesão e o recrutamento de leucócitos [13].

A ativação das células da glia leva à produção de TNF- α e de NO, entre outros, que conseqüentemente levam à indução de apoptose das células ganglionares da retina (Figura 1.1) [109]. O NO leva à apoptose pela ativação da caspase 3 (Figura 1.13) [109].

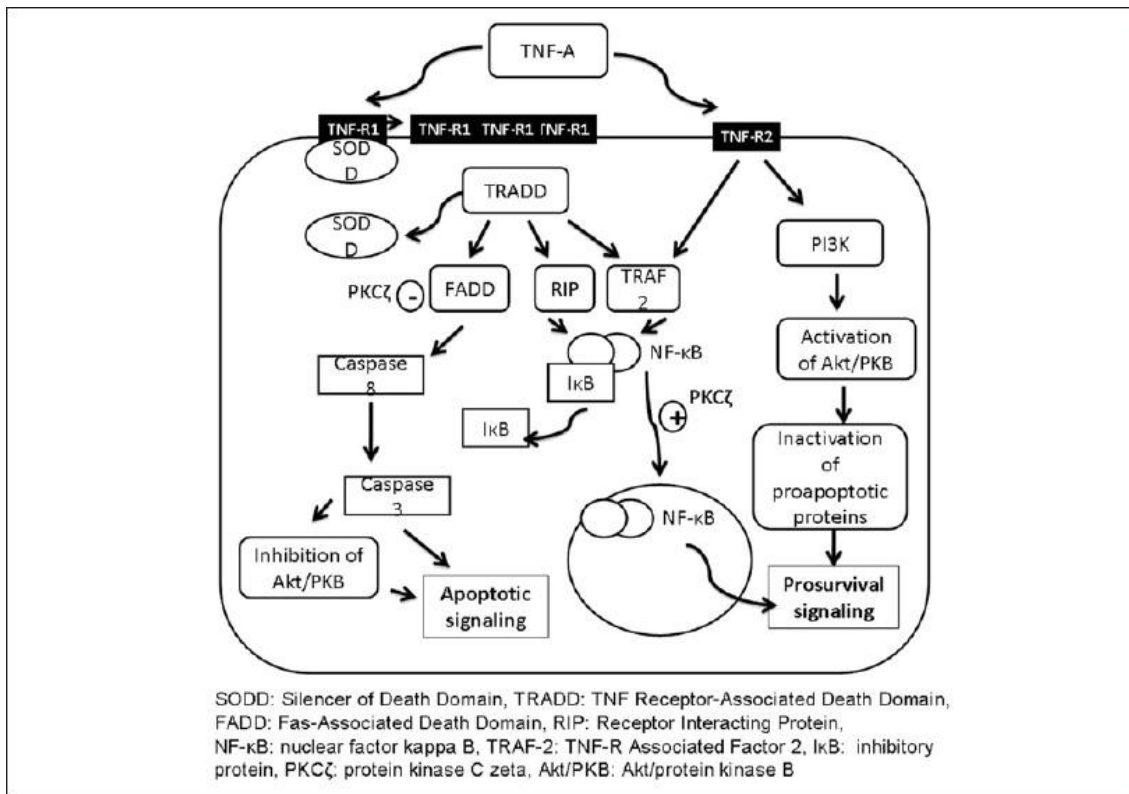


Figura 1.13: Cascata de eventos que levam à sinalização apoptótica e da pro-sobrevivência induzidas por TNF- α . Imagem adaptada da referência 109.

Pensa-se que o aumento dos níveis de TNF- α , e dos seus recetores, esteja associado com a diabetes e a resistência à insulina [13]. Uma elevada concentração de TNF- α é encontrada no vítreo do olho em doentes com estas complicações [14, 110]. A expressão de TNF- α pode ser induzida por processos que ocorrem durante a diabetes, como a hiperglicémia, o stress oxidativo e o aumento de VEGF [14].

Após a descrição de cada um dos 11 genes, é possível perceber que existe uma interligação entre os mesmos, não sendo o gene MTHFR associável, de forma direta, com os restantes. Desse modo, para mais fácil compreensão, a Figura 1.14 apresenta esquematicamente a relação possível entre os genes através das proteínas que cada um codifica (Figura 1.14, a laranja). A aldose redutase, AKR1B1, catalisa a redução da glucose em sorbitol que, de uma forma indireta, leva à produção de AGEs. O receptor AGER liga os AGEs, que também são formados por açúcares redutores (ex: glucose), e proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos, e posteriormente dá-se o aumento intracelular do stress oxidativo que, por intermédio da estimulação da produção das cinases PKC e ERK1/2, leva à ativação do fator NF- κ B. Este fator regula genes que conduzem à produção de VEGF, TNF- α , TGF- β e ICAM-1, entre outros. A proteína VEGF é sobreexpressa por hipóxia e hiperglicémia conduzindo ao aumento da permeabilidade vascular, à indução de angiogénese, à neovascularização, à proliferação e migração de células endoteliais e à adesão de leucócitos na retina através do aumento de ICAM-1. Por sua vez os leucócitos são responsáveis pelo aumento local, no corpo vítreo, de VEGF, que é capaz de induzir também a expressão de TNF- α . A citocina TNF- α está envolvida também na proliferação celular e na regulação de ICAM-1, na diferenciação, na apoptose, entre outras. O TGF- β 1 está envolvido na regulação da proliferação e migração celular em vários tipos de células, na produção de citocinas e também no espessamento da membrana basal dos capilares da retina. A ICAM-1 promove a adesão de leucócitos nas células endoteliais em locais de inflamação que provoca, posteriormente, a rutura da barreira hemato-retiniana. A PPARGC1A é regulada em resposta ao stress oxidativo e, portanto o seu aumento leva ao aumento da sua expressão com o conseqüente aumento de fatores, por exemplo, o VEGF, que levam à angiogénese dos vasos. A ACE, no RAS, converte o peptídeo Ang-I em Ang-II, um peptídeo fisiologicamente ativo que atua como vasoconstritor e fator angiogénico, uma das conseqüências da RD. As NOS1 e NOS3 sintetizam NO que medeia a ICAM-1 e é também responsável por apoptose e pela angiogénese nos vasos coronários, induzida por fatores de crescimento. A reductase MTHFR está envolvida no metabolismo de homocisteína e na biossíntese de metionina, entre outros. Elevadas concentrações de homocisteína no plasma levam à hiperhomocisteinémia, uma doença relacionada com doenças microvasculares e, conseqüentemente, com a RD.

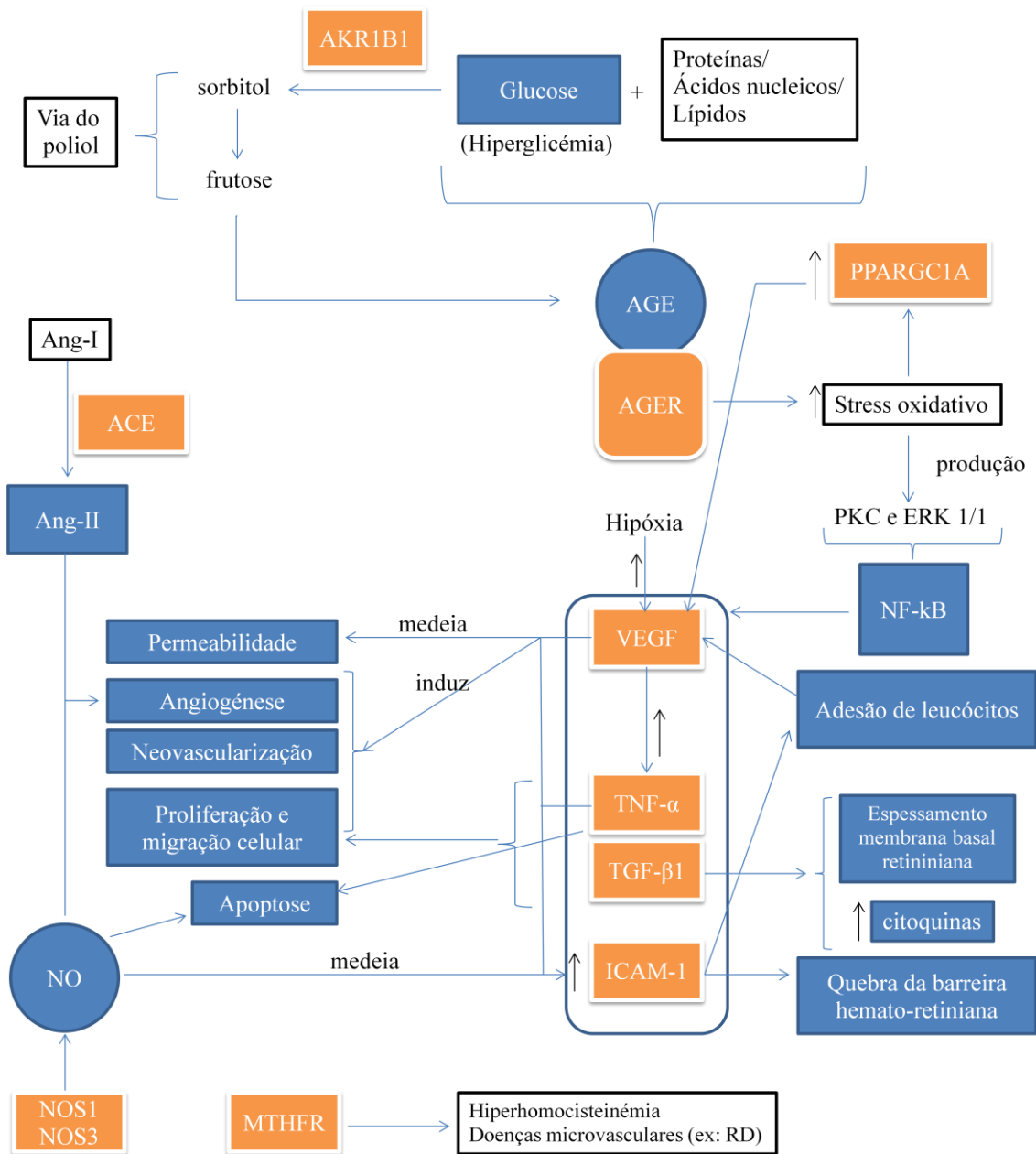


Figura 1.14: Representação esquemática da relação entre os 11 genes apresentados. A laranja: proteínas codificadas pelos genes que possuem a mesma designação; seta preta para cima: aumento; setas azuis: levam ao passo seguinte. A presença do aumento de glucose leva à produção de AGEs pela via do poliol (AKR1B1), indiretamente, ou pela combinação com proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. A interação de AGEs com o recetor AGER provoca aumento de stress oxidativo desencadeando a produção de NF-kB por intermédio da produção de PKC e ERK1/2. O NF-kB regula genes que codificam VEGF, TNF- α , TGF- β e ICAM-1. Estas proteínas medeiam a permeabilidade, induzem angiogênese, neovascularização, proliferação e migração celular, apoptose, quebra da barreira hemato-retiniana, aumento de citoquinas, espessamento da membrana basal retiniana e adesão de leucócitos. A expressão de PPARGC1A aumenta em resposta ao stress oxidativo desencadeando todos os processos descritos. A ACE no RAS ao produzir Ang-II a partir de Ang-I conduz a fenómenos como angiogênese. O NO sintetizado pelas NOS1 e NOS3 medeia a ICAM-1, desencadeia angiogênese e apoptose. A MTHFR está presente no metabolismo de homocisteína que, por aumento da sua expressão pode levar à hiperhomocisteinemia que se relaciona com doenças como a RD.

1.4. Estudos de associação do tipo caso-controlo

Os estudos de associação do genoma (em inglês, Genome-wide association studies (GWAS)) possibilitam a identificação de variantes genéticas em doenças complexas e permitem também perceber de que forma essas variantes se relacionam entre si [111]. O estudo de associação do tipo caso-controlo é o mais utilizado para clarificar os fatores genéticos envolvidos numa doença [112]. Este tipo de estudo baseia-se na pesquisa de variantes genéticas, em genes candidatos, num grupo de indivíduos com um determinado fenótipo e num grupo controlo (que não expresse o fenótipo sob estudo) [112]. Para além disso, também permite a identificação de variantes de DNA não associadas com a doença [112]. O grande desafio na realização de um estudo caso-controlo é a seleção do grupo controlo, pois é necessário que existam diferenças nas frequências alélicas entre este grupo e o dos indivíduos com um determinado fenótipo, de forma a se poderem associar com a doença [112]. Os GWAS estudam essencialmente SNPs, as alterações genéticas mais frequentes que, por definição, correspondem à variação de uma única base nucleotídica e ocorrem em mais de 1% da população geral [113, 114]. Estas alterações podem estar dispersas ao longo de todo o genoma; as que se encontram nos genes, em particular, nas sequências codificantes (exões), são mais fáceis de interpretar em termos de potencial patogénico e eventual associação com doenças [113-115].

O estudo desenvolvido neste trabalho inseriu-se num projeto de investigação em curso de correlação entre o fenótipo e o genótipo na progressão da retinopatia diabética. Este estudo envolveu a genotipagem de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em 11 genes candidatos que foram identificados, com base na literatura, como potencialmente envolvidos no desenvolvimento e progressão da RD. A população sob estudo englobou um total de 307 diabéticos do tipo 2 com RD e classificados em 3 fenótipos distintos: A - indivíduos com RD não progressiva (grupo controlo), B - indivíduos com RD intermédia entre os fenótipos A e C, e C - indivíduos com RD agressiva e de progressão rápida.

Com este estudo pretendeu-se identificar alelos de risco, ou seja, alelos que ocorrem com maior frequência nos doentes com fenótipo agressivo (fenótipo C) do que no do grupo controlo (fenótipo A), de modo a caracterizar geneticamente o fenótipo agressivo. A identificação destes marcadores genéticos poderá contribuir para delinear os diabéticos com suscetibilidade genética para o desenvolvimento de RD agressiva e de

progressão rápida, ou seja, aqueles que necessitam de um acompanhamento clínico mais “apertado”. A identificação destes fatores de risco poderá ainda contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

1.4.1. Trabalho preliminar

No início foi feita uma seleção de SNPs potencialmente patogênicos nos genes candidatos. Essa seleção foi realizada de forma manual através de uma pesquisa em bases de dados internacionais, fidedignas, e posteriormente com o auxílio de ferramentas bioinformáticas. Seguidamente alguns SNPs identificados foram genotipados pelo sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®].

1.4.1.1. Seleção de SNPs

Para efetuar o presente estudo foi necessário selecionar um conjunto de SNPs nos 11 genes descritos. Em média, foram obtidas aproximadamente 1.500 alterações (SNPs) por gene, cerca de 16.500 SNPs disponíveis para análise nos 11 genes. Atendendo a que o número total de indivíduos é 307, poderíamos chegar a um número total de 5.065.500 genotipagens. Um estudo desta dimensão é incomportável a vários níveis, nomeadamente recursos humanos, monetários e tempo. Assim, a seleção dos SNPs para o estudo, com maior potencial patogénico foi efetuada com várias metodologias. Inicialmente essa seleção ocorreu manualmente com a utilização do *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org) que é uma base de dados com diversa informação associada a genomas. Foram utilizados vários critérios nessa seleção como a frequência nos SNPs em estudos na população europeia, a localização no gene ou a sua associação já descrita com algumas doenças, entre outros. De forma a complementar o método manual foram utilizadas duas ferramentas bioinformáticas com o intuito de reduzir drasticamente o número de alterações a estudar: o ANNOVAR (*Annotate Variation*) e o SYSNPs (*Select Your SNPs*).

O ANNOVAR é um *software* de anotação e prioritização de variantes genéticas a partir de grandes quantidades de dados sequenciados [116, 117]. Para iniciar este *software* é realizada uma automação do processo de redução de variantes que filtra então as alterações com maior probabilidade de estarem associadas com doenças [118].

O ANNOVAR gera informação relativa às variantes genéticas baseada em diferentes sistemas e da seguinte forma sequencial: 1 – identificação da posição de SNPs no gene e anotação da alteração, identificando se os SNPs estão em regiões codificantes (exônicas), causam alteração da proteína e que aminoácidos são afetados, e de anotação com base em regiões, que identifica variações em regiões genômicas específicas como, por exemplo, regiões de *splicing*; 2 – remoção de alterações sinónimas, ou seja, que correspondem ao mesmo aminoácido não provocando alterações na funcionalidade normal das proteínas, e 3 – identificação de variantes em regiões genômicas que são anotadas como elementos conservados, por alinhamento de sequências de bases de dados [116, 117, 119]. Este alinhamento envolve os genomas de 44 espécies diferentes e essas regiões representam elementos com maior potencial em termos funcionais, sendo aplicados neste passo os programas SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) e PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) que classificam as alterações em diferentes graus de patogenicidade (benigno, tolerante, entre outros) [116, 117, 119]. O passo 4 corresponde à remoção de variantes em regiões de duplicação e os passos 5 e 6 dizem respeito à anotação com base em filtros que possibilitam a remoção de alterações menos prováveis de causar doenças, por serem relativamente comuns e de SNPs não sinónimos (nsSNPs, SNPs localizados numa região codificante que resultam na substituição de um aminoácido por outro), que estão presentes no Projeto dos 1000 genomas (“1000 Genome Project”) de acordo com a população em estudo (população europeia identificada com as siglas “EUR” ou “CEU”) (passo 5) e nas bases de dados de SNPs (dbSNP) (passo 6) [115-117, 119]. A filtragem é terminada após o sumário das variantes obtidas, ou seja, uma análise às restantes variações como forma de eliminar mais alguma. Desta forma, através deste *software* foi possível obter em poucos minutos, um reduzido número de SNPs com maior potencial patogénico partindo de milhares [118].

A seleção dos SNPs, realizada pelo *software* ANNOVAR, foi ainda complementada com outros programas, nomeadamente o SIFT e o PolyPhen. O SIFT utiliza a homologia das sequências de proteínas para prever quando a substituição de um aminoácido afeta a função da proteína [115, 119]. O PolyPhen é um *software* dedicado à anotação automática de nsSNPs, que tem a capacidade de avaliar e explicar o efeito de um nsSNP na função e estrutura da proteína humana envolvida, através da combinação das características da sequência de aminoácidos, alinhamentos múltiplos com proteínas homólogas e parâmetros estruturais [115]. A associação destes programas ao

ANNOVAR permite uma pesquisa ainda mais restrita, aumentando o potencial patogénico dos SNPs selecionados.

O SYSNPs possibilita a seleção de *tag*-SNPs, ou seja, SNPs que ao serem analisados fornecem informação sobre outros SNPs (*tagged*-SNPs) [120]. O *software* identifica subconjuntos de SNPs que estão em associação (*linkage*), uma lógica que assenta no princípio de que SNPs próximos são herdados em bloco (*linkage disequilibrium* (LD)) [121]. Os subconjuntos de SNPs contêm a mesma informação que o *tag*-SNP que os representa [121]. O SYSNPs é, portanto, utilizado para filtrar SNPs que representam outros, realizando uma pesquisa independente e diferente da dos *softwares* ANNOVAR, SIFT e PolyPhen.

Em resumo, manualmente foram selecionados 51 SNPs que foram analisados numa primeira fase. O *software* ANNOVAR (SIFT e PolyPhen) permitiu a identificação de mais 52 SNPs e o SYSNPs de 56 *tag*-SNPs (que representam mais 123 *tagged*-SNPs). Adicionalmente, 19 *tagged*-SNPs (associados a alguns dos 56 *tag*-SNPs) foram selecionados com o objetivo de validar o SYSNPs. No total obtiveram-se 127 (52+56+19) SNPs que foram genotipados, numa 2ª fase, nos 307 doentes. De todos os SNPs selecionados (178=51+52+56+19) nos 11 genes, foram genotipados com sucesso 172 (Tabela 1.2). Ainda foram selecionados mais 28 SNPs pelas ferramentas bioinformáticas, que ficaram por genotipar nestas fases.

Tabela 1.2: Distribuição por gene do número de SNPs selecionados pelos métodos manual, ANNOVAR (SIFT e PolyPhen) e SYSNPs.

Gene	SNPs (nr)	
	Genotipados com sucesso	Não genotipados
ACE	32	5
AGER	13	0
AKR1B1	9	0
ICAM1	12	1
MTHFR	23	4
NOS1	24	4
NOS3	14	3
PPARGC1A	23	2
TGF-β1	4	9
TNF	6	0
VEGF-α	12	0
Total	172	28

1.4.2. Genotipagem de SNPs

Os SNPs selecionados foram genotipados no conjunto dos 307 indivíduos. Para tal, foi utilizada uma tecnologia específica que se baseia em reações de polimerização em cadeia (PCR): o sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®]. As reações de PCR foram realizadas em aparelhos em tempo real que possuem vantagens em relação à PCR “convencional”, nomeadamente: rapidez na obtenção de resultados, facilidade na sua interpretação, maior sensibilidade e precisão e menor risco de contaminação [122].

O sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] permite a análise de centenas de SNPs em milhares de amostras e é ideal para a validação de estudos de associação de genes a doenças complexas e de outros que requerem um grande número de amostras [123, 124]. Estes ensaios de genotipagem envolvem duas sondas *TaqMan*[®], marcadas com fluoróforos diferentes (fluoróforo VIC[®] e FAM[™]), específicas para cada um dos alelos do SNP alvo e ainda um conjunto de *primers* para a reação de PCR [113, 123]. Para além do fluoróforo (também designado por *reporter*) localizado no terminal 5' das sondas, existe uma molécula, *quencher*, não fluorescente no terminal 3' e ainda a molécula MGB (*Minor Groove Binder*) associada a este que se liga ao sulco menor da dupla hélice do DNA [125-128].

Durante a reação da PCR, ocorre hibridização específica das sondas, entre os *primers*, com a sequência complementar do DNA alvo (*match*) [123]. Na etapa de extensão, a DNA polimerase cliva esta sonda (atividade de exonuclease 5'), dá-se a separação das moléculas *reporter* e *quencher* e emissão de fluorescência (transferência de energia de ressonância por fluorescência – FRET), de acordo com os alelos presentes na amostra (Figura 1.15) [123, 129].

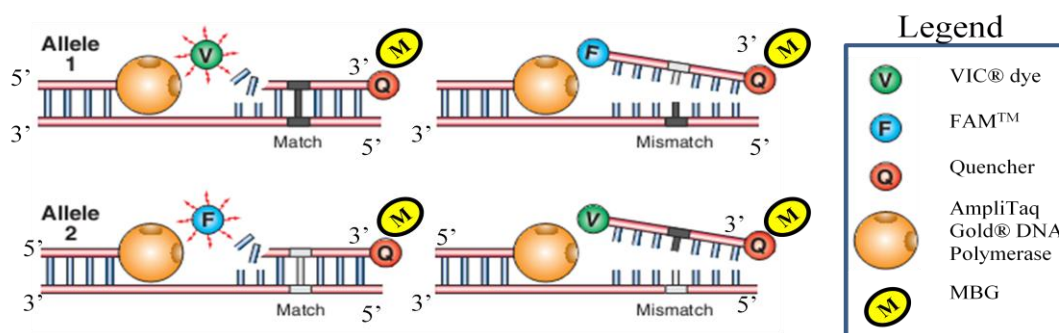


Figura 1.15: Ensaio de genotipagem *TaqMan*[®]. Resultados da hibridização perfeita (*match*) (emissão de fluorescência) e não perfeita (*mismatch*) (não emissão de fluorescência) entre a sequência de DNA alvo e as sondas *TaqMan*[®]. Imagem adaptada da referência 123.

Nos casos em que a sonda não é complementar ao alvo, o *mismatch* entre a sonda e o SNP diminui a eficiência de hibridização e a DNA polimerase tem a capacidade de afastar a sonda *mismatch* em vez de a clivar [123, 129].

As reações efetuam-se em placas de genotipagem que existem em diferentes formatos. No estudo referido utilizaram-se dois formatos: placas para 64 e 128 ensaios, onde se genotiparam 51 SNPs (1.º array) e 127 SNPs (2.º array), respetivamente. Por esta técnica foram então genotipados um total de 178 SNPs, 172 dos quais com sucesso.

Os resultados são observados num gráfico de dispersão cujos diferentes alelos são representados por *clusters* distribuídos no gráfico, de acordo com a intensidade da fluorescência [123].

Este sistema possui uma série de vantagens como: rapidez, simplificação do procedimento, diminuição dos custos por genótipo e reprodutibilidade dos ensaios [113, 124]. Contudo, também apresenta algumas desvantagens como a impossibilidade de desenhar este tipo de ensaios em zonas com elevada homologia para outras do mesmo genoma, zonas altamente repetitivas ou polimórficas [130].

1.4.2.1. Resultados (*Openarray*)

Os genótipos identificados para os diferentes SNPs pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] foram analisados, em termos de distribuição, para os diferentes fenótipos, tendo como referência o fenótipo A (indivíduos com RD não progressiva), usando o teste de *Pearson* ou o de *Fisher*. Diferenças estatisticamente significativas entre o fenótipo A e os B e/ou C foram encontradas para SNPs nos genes ACE, AGER, MTHFR e NOS1.

1.4.3. Trabalho presente

O trabalho desenvolvido e descrito nas secções seguintes incidiu no estudo de algumas das 28 alterações identificadas como potencialmente interessantes mas que não foram genotipadas pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] devido à incapacidade de desenhar ensaios para estes SNPs, pois situavam-se em zonas complexas, ou seja, zonas muitas vezes com a repetição do mesmo nucleótido, consecutivamente. Para tal, foram selecionadas as alterações nos genes ACE, MTHFR e NOS, associados à progressão da

RD e estabelecidos os ensaios de genotipagem com a técnica *Allele-Specific* PCR (AS-PCR) com detecção por desnaturação de alta resolução (*MeltDoctor*). O gene *AGER* foi excluído, porque todos os SNPs selecionados já tinham sido genotipados anteriormente (Tabela 1.2). As alterações foram genotipadas nos 307 doentes e confirmadas por sequenciação de Sanger.

1.5. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi encontrar perfis genéticos associados ao desenvolvimento do fenótipo agressivo da RD, isto é, identificar quais os genótipos, e quais os genes, que estão associados com uma evolução rápida e agressiva da RD em indivíduos com DM do tipo 2. A caracterização genética deste fenótipo possibilita o desenvolvimento de testes que permitam determinar se o doente tem uma suscetibilidade genética que potencie o desenvolvimento de tal fenótipo, permitindo um seguimento clínico com vista à identificação precoce das características associadas ao fenótipo e intervenção atempada. Pretendeu-se compreender ainda melhor os mecanismos genéticos/moleculares envolvidos na doença que podem servir de base para a criação de novos métodos de diagnóstico, prognóstico e terapêuticos. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Selecionar os SNPS mais informativos de entre os 28 SNPS não genotipados pela tecnologia *TaqMan*[®] *OpenArray*[®].
2. Otimizar a técnica *Allele-Specific* PCR por *MeltDoctor* numa plataforma de PCR em tempo real para cada um dos SNPs selecionados.
3. Genotipar com esta abordagem os 307 indivíduos em estudo.
4. Analisar a associação destes SNPs à progressão da retinopatia diabética.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Indivíduos selecionados para estudo

Um grupo de 307 indivíduos com diabetes do tipo 2 e RD foi selecionado de entre os doentes das consultas de acompanhamento oftalmológico no AIBILI (Associação para Investigação Biomédica e Inovação em Luz e Imagem), localizado em Coimbra. A população foi clinicamente caracterizada para o tipo de RD e dividida em 3 grupos: fenótipo A, B e C (Tabela 2.1). O fenótipo A compreendeu 79 diabéticos com RD latente, ou seja, não progressiva (grupo controlo). Do fenótipo B fizeram parte 79 diabéticos com RD numa fase intermédia entre os fenótipos A e C. Por último, o fenótipo C compreendeu 149 diabéticos com RD agressiva, que evolui rapidamente e pode ter consequências irreversíveis para a visão.

Tabela 2.1: Representação do número de indivíduos em estudo de acordo com os fenótipos A, B e C para as seguintes características: Olho (“OD” - olho direito / “OS” - olho esquerdo), Situação ocular (“CSME” - apresenta edema macular clinicamente significativo / “non-CSME” – não apresenta edema macular e “/” – sem dados) e Sexo (“Feminino” / “Masculino”). Os dados relativos à idade correspondem à idade do indivíduo mais novo (“Mínimo”) e à idade do indivíduo mais velho (“Máximo”) presente no estudo. Média±DP: média com desvio padrão (DP).

Fenótipo		A	B	C	Total (nº indivíduos e %)
Características		79	79	149	307
Olho	OD	43	43	78	164 (53,4%)
	OS	36	36	71	143 (46,6%)
Situação ocular	CSME	2	4	23	29 (9,4%)
	non-CSME	77	75	122	274 (89,3%)
	/	0	0	4	4 (1,3%)
Sexo	Feminino	43	22	52	117 (38,1%)
	Masculino	36	57	97	190 (61,9%)
Idade	Mínimo	43	41	40	média±DP= 60.7± 8.2
	Máximo	78	75	78	
Diabetes	Duração (em anos)	Min-máx: 1-21 média±DP: 10.0 ±5.1			

2.2. Extração do DNA genómico

A extração do DNA genómico a partir das amostras de sangue periférico foi realizada com o kit “DNeasy[®] Blood & Tissue” da Qiagen[®] [131], com algumas alterações em relação ao procedimento indicado no protocolo. Estas alterações consistiram: no passo 1, adição de 300µL de sangue a 60µL de proteinase K e ajuste do volume para 660µL com 300µL de PBS 1X; no passo 2, adição de 600µL de tampão de lise (AL) e incubação das amostras durante 1h a 56°C; no passo 3, adição de 600µL de etanol absoluto após a incubação; no passo 6, realização de uma centrifugação adicional, durante 3 minutos à velocidade máxima, antes da eluição do DNA e, por último, no passo 7, eluição do DNA com 50µL de tampão de eluição (AE) [131].

2.2.1. Quantificação e avaliação da qualidade do DNA

Após realização da extração do DNA procedeu-se à quantificação do DNA das amostras por dois métodos: espectrofotometria (avalia a quantidade e qualidade de ácidos nucleicos) e fluorimetria (avalia a quantidade de DNA de cadeia dupla).

2.2.1.1. Quantificação e determinação do grau de pureza por espectrofotometria

A quantificação e determinação do grau de pureza por espectrofotometria foram realizadas com o aparelho “NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer” (NanoDrop Technologies, Wilmington-EUA).

Para determinar a concentração de ácidos nucleicos, quer de cadeia simples como dupla, esta técnica baseia-se na determinação da absorvância a 260 nanómetros (nm) (pico máximo de absorvância de ácidos nucleicos). A concentração de DNA foi determinada recorrendo à seguinte fórmula: $[\text{DNA}] \text{ (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 50\text{ug/mL} \times \text{fator de diluição}$, em que A_{260} representa a absorvância a 260nm [131].

Esta técnica permite avaliar também o grau de pureza da amostra, através do cálculo do rácio entre o valor da leitura da absorvância a 260nm sobre o valor obtido a 280nm e a 230nm.

2.2.1.2. Quantificação por fluorimetria

A quantificação por fluorimetria foi efetuada com o kit “Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay kit” (Invitrogen, Oregon-EUA) com o fluorímetro “Molecular Devices SpectraMax Gemini EM Microplate Reader” (Molecular Devices, Sunnyvale-EUA). Este ensaio utiliza uma sonda fluorescente ultrasensível que se liga apenas a DNA de cadeia dupla [132]. Este método de quantificação foi utilizado para contornar as desvantagens do método anterior, sendo realizado apenas em amostras que apresentavam uma concentração e grau de pureza considerados aceitáveis pelo método de espectrofotometria.

2.2.2. Parâmetros de qualidade das amostras

De forma a garantir a posterior qualidade dos resultados de genotipagem, foram estabelecidos dois critérios de elegibilidade das amostras para análise: a concentração de DNA deve ser igual ou superior a 10ng/μL, pela técnica de fluorimetria, e as razões 260/280 e 260/230, por espectrofotometria, devem ser iguais ou superiores a 1,8.

Para as amostras com razões de absorvância, 260/280 e 260/230, inferiores a 1,7 foi efetuada uma purificação por precipitação com isopropanol; de acordo, com o seguinte protocolo: adição de 10 volumes de isopropanol à amostra e agitação por inversão; incubação a 37°C durante 5 minutos; centrifugação à velocidade máxima durante 15 minutos e rejeição do sobrenadante; lavagem do precipitado duas vezes com 500μL de etanol frio a 75%; centrifugação durante 15 minutos à velocidade máxima; secagem total do *pellet* (mínimo 20 minutos), e ressuspensão do DNA em 20μL de água Milli-Q ou tampão de eluição.

2.3. Método de genotipagem

Allele-specific PCR com MeltDoctor por PCR em tempo real

O AS-PCR, também denominado “Mismatch Amplification Mutation Assay ou Melt-MAMA”, caracteriza-se por uma alteração da PCR convencional, nomeadamente no que diz respeito ao desenho dos *primers* que funcionam como um género de sonda

na genotipagem dos SNPs [133, 134]. Assim, a técnica AS-PCR baseia-se na utilização de uma *master mix (Meltdoctor)*, o método químico de detecção e apenas é necessário desenhar *primers* específicos, ou seja, que contêm no terminal 3' o nucleótido que vai hibridizar com os alelos do SNP sob estudo [135]. É também desenhado um outro *primer* comum aos *primers* específicos que atua em conjunto com estes na amplificação do molde de DNA [135]. O aumento da especificidade dos *primers* dá-se pela substituição de um nucleótido na penúltima ou antepenúltima base, originando um *mismatch* e pela introdução de uma cauda GC num dos *primers* específicos [135-137]. Os ensaios de genotipagem podem-se realizar num único tubo/poço de reação de PCR [137]. A ocorrência de amplificação é comprovada pela emissão de fluorescência pelas moléculas de “*Meltdoctor*” sendo o resultado representado em curvas de dissociação e identificado pela T_m (Temperatura de *melting*) do produto [137, 138].

2.3.1. Desenho de *primers*

Para o desenho dos *primers* começou por se obter as sequências dos genes em estudo a partir do *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org). Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa “Oligo Explorer 1.2”, sendo também utilizado o “Oligo Analyser 1.2” que determina as propriedades dos *primers* (sequência, comprimento desta e valores de: T_m , % GC e dG). Os *primers* específicos foram desenhados de modo a conter na extremidade 3' o nucleótido que hibridiza com cada um dos alelos do SNP em estudo (esses nucleótidos encontram-se a vermelho na Tabela 2.2). Assim, para a genotipagem de cada SNP, foram desenhados 2 *primers* específicos (*forward* para os SNPs dos genes ACE e NOS1 e *reverse* no caso do SNP do gene MTHFR) e um *primer* comum que irá funcionar com esses específicos (*reverse* no caso dos SNPs dos genes ACE e NOS1 e *forward* no caso do SNP do gene MTHFR) (Tabela 2.2) [134]. De modo a aumentar a especificidade dos *primers* foram feitas substituições de nucleótidos na penúltima ou antepenúltima base da extremidade 3' dos *primers* específicos, originando um *mismatch* (Figura 2.1), ou seja, se a cadeia molde tinha um A ou um T este foi substituído por um C ou G e vice-versa [133, 135, 136]. O *mismatch* foi introduzido em diferentes posições dos *primers*, para diferentes SNPs, porque não sendo a literatura concordante na melhor posição do *mismatch* e visto que em determinada posição houve inespecificidade para alguns SNPs, foi decidido testar e

avaliar qual a melhor opção (explicação pormenorizada de cada SNP no Anexo IV – Otimização da técnica AS-PCR). Os nucleótidos substituídos na penúltima e antepenúltima base do terminal 3' dos *primers* encontram-se assinalados a azul e verde, respetivamente, na Tabela 2.2. A eficiência de extensão da *Taq polymerase* é diminuída, devido ao *mismatch*, entre 15% a 50% por ciclo ocorrendo uma baixa eficiência dos *primers* que possuem, simultaneamente, o *mismatch* na penúltima ou antepenúltima base e ainda a última base não complementar à sequência do DNA molde (“2.º *mismatch*”) [133].

Tabela 2.2: Pares de *primers* (F = *forward* e R = *reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica *Allele-specific PCR*. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplificação e respetivo tamanho do amplificação em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda GC encontra-se representada por letras minúsculas. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a azul – *mismatch* na penúltima base e nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

Gene	ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T _m	T _m	Tamanho amplificações
				(°C)		
NOS1	rs77074921	F	5'-ggcgccgcgcgcggcGGAGCTGATGGAATAGTAACG-3'	62	87	142/157 pb
		F	5'-GGAGCTGATGGAATAGTATCA-3'	60	84	
		R	5'-GCAGGAGTACGAGGAATGGA-3'	62	-	
	rs76839820	F	5'-ggcgccgcgcgcggcAAGGTGGTCTCCAGGTACG-3'	60	84	89/104 pb
		F	5'-AAGGTGGTCTCCAGGTCA-3'	58	80	
		R	5'-GAGGTACTCAGAGGCATTG-3'	58	-	
MTHFR	rs72552099	F	5'-CCAGCATCACTCACTTTGTGA-3'	62	-	93/108 pb
		R	5'-ggcgccgcgcgcggcGGAGCTGACCAGTGAAGAGC-3'	64	82	
		R	5'-GGAGCTGACCAGTGAAGACA-3'	62	78	
ACE	rs8075924	F	5'-ggcgccgcgcgcggcGAATCATGGAGGCAGACTTTC-3'	62	83	125/140 pb
		F	5'-GAATCATGGAGGCAGACTTAT-3'	60	80	
		R	5'-ACATCTTCACATGGTGGCAG-3'	60	-	
	rs4357	F	5'-ggcgccgcgcgcggcCGCAGGAGAATGGGGTGTTC-3'	62	85	135/149 pb
		F	5'-ACGCAGGAGAATGGGGTACT-3'	62	82	
		R	5'-CTGGTACTTCAGCCTGTCTGA-3'	62	-	

Uma cauda de 15 GC foi adicionada na extremidade 5' do *primer* específico com T_m superior (sempre que havia diferença entre as T_m, pois caso contrário o *primer* era escolhido ao acaso), de modo a que a amplificação de cada um dos alelos sob estudo gere curvas de *melting* com picos a diferentes T_m para serem discriminados. A T_m é a temperatura à qual metade das cadeias de DNA se encontram desnaturadas [139]. As bases GC foram distribuídas na cauda de forma aleatória, tentando colocar igual

percentagem de resíduos G e C. A diferença do número de nucleótidos na cauda para os diferentes SNPs, neste caso 20 bases apenas para um *primer* específico (rs77074921) e 15 bases para os restantes SNPs, deve-se ao facto de que a diferença entre as T_m dos fragmentos gerados para cada um dos alelos do SNP sob estudo necessita de ser igual ou superior a 3°C para facilitar a interpretação dos resultados [133, 138]. A T_m dos fragmentos compreendidos entre cada *primer forward* e respetivo *reverse* foi estimada com o programa “BioMath Calculators” acedido pelo link: <http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>.

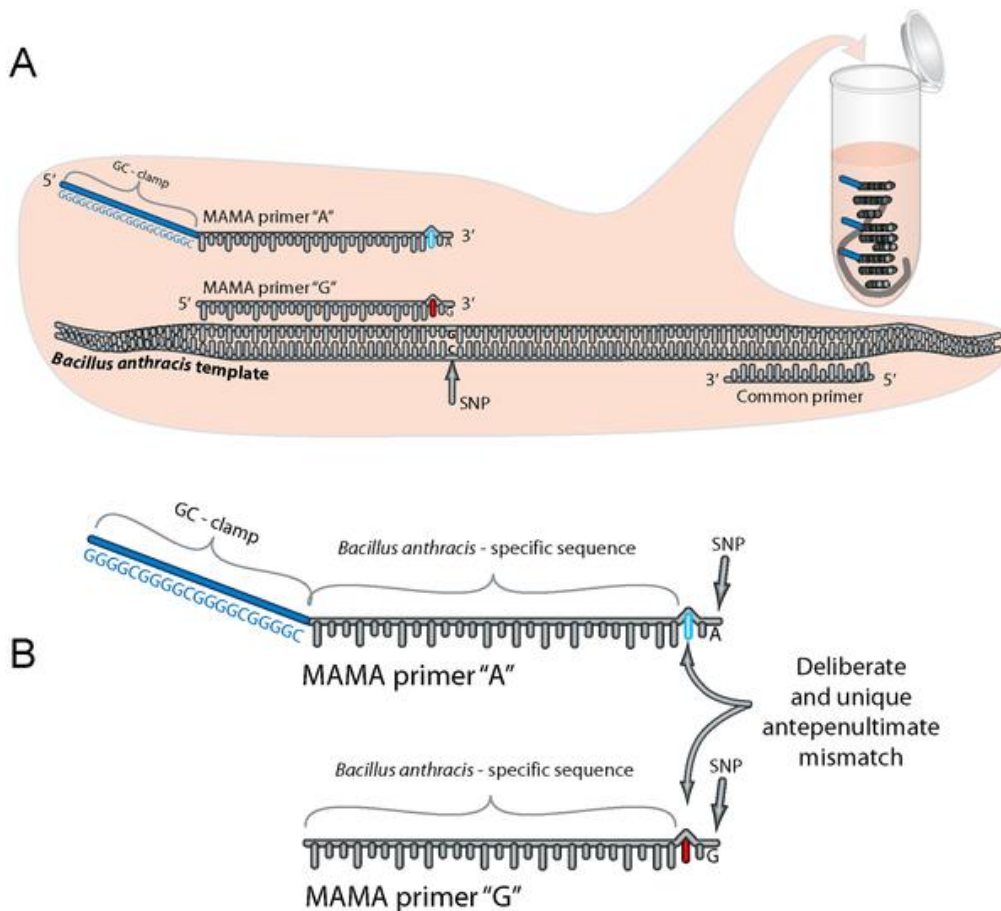


Figura 2.1: Representação esquemática da técnica Melt-MAMA. A) *Primers* específicos para cada um dos dois alelos (A e G) do SNP e *primer* comum para amplificação do molde. Cauda GC no terminal 5' de um dos *primers* específicos para diferenciação do(s) amplicões gerados, através da(s) temperatura(s) de *melting* (T_m) obtida(s). B) Imagem mais ampliada dos *primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base do terminal 3' e cauda de resíduos GC no terminal 5' de um dos *primers*. Imagem retirada da referência 134.

Os *primers* foram desenhados tendo em conta ainda as seguintes características: comprimento de aproximadamente 20 nucleótidos; 30-80% em conteúdo GC; evitar nucleótidos idênticos em posições consecutivas; inexistência de outros SNPs na zona de hibridização dos *primers*; $dG > -6$ Kcal/mol, dG = energia livre de Gibbs, energia de

ligação dos duplexes resultantes da dimerização dos *primers* (*forward-forward*, *forward-reverse* e *reverse-reverse*) que mede, portanto, a estabilidade dessas ligações que é dependente do conteúdo em GC [140, 141]; T_m entre 58°C e 62°C, sendo a T_m ótima de 60°C e T_a (temperatura de *annealing* – temperatura de hibridização dos *primers* ao DNA) de 60°C (programa *standard*); T_m entre *primers* específicos para cada SNP com diferença máxima de 2°C; comprimento do amplicão entre 50 a 250 pares de bases, sendo o ideal entre 100 e 150bp, e diferença de T_m entre amplicões maior ou igual que 3°C.

2.3.2. Condições experimentais e análise dos resultados

As reações de PCR, para genotipagem dos SNPs sob estudo, foram realizadas com ambos os *primers* específicos e o *primer* comum no mesmo poço de reação. Para além dos *primers* e do DNA, foi utilizada a mix “MeltDoctor™ HRM Master Mix”, da Applied Biosystems (Foster city-EUA), que contém os restantes reagentes necessários à PCR: cloreto de magnésio, dNTPs, “AmpliTaq Gold®360 DNA Polymerase” 2X concentrada e “MeltDoctor™ HRM Dye”, uma forma estabilizada da molécula fluorescente “SYTO® 9” que se intercala nos ácidos nucleicos [142-144]. Esta *master mix* é geralmente utilizada para análises de *melting* de elevada resolução pelo que foi selecionada para a realização deste trabalho [143, 144].

As reações e condições para genotipagem dos SNPs foram otimizadas individualmente, de acordo com o descrito em detalhe no Anexo IV – Otimização da técnica AS-PCR. As condições finais das reações de genotipagem para cada um dos SNPs, num volume final de 10µL, encontram-se descritas na Tabela 2.3.

Os controlos negativos consistiram nas reações anteriores sem DNA genómico. Como controlos positivos foram desenhadas e encomendadas sequências de DNA correspondentes aos moldes esperados (Tabela 2.4).

Os controlos positivos para os génotipos heterozigóticos foram gerados pela adição, numa proporção de 1:1, dos fragmentos correspondentes a cada um dos alelos alternativos do SNP (Tabela 2.4).

Para realizar as reações de PCR foi utilizado o aparelho “7500 Fast Real-Time PCR System” da Applied Biosystems, com o programa “7500 Software v2.0”. O programa de PCR foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos,

seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e extensão a 60°C durante 1 min. Para as curvas de *melting*: desnaturação a 95°C durante 15 segundos, extensão a 60°C durante 1 minuto, “*High resolution melting*” a 95°C durante 30 segundos e, por fim, extensão a 60°C durante 15 segundos.

Os resultados obtidos foram analisados com o programa “HRM Analysis Software v2.0.1, HRM Life Tech”, da Applied Biosystems [144]. Os resultados da amplificação do fragmento de DNA sob estudo, que engloba o SNP alvo, são representados pelas curvas de *melting* que apresentam diferentes Tm de acordo com os alelos presentes na amostra. Se o DNA for heterozigótico para o SNP em análise, o resultado da genotipagem é apresentado em duas curvas com diferentes Tm (Figura 2.2, a) [138]. Nos casos de homozigotias, aparece apenas uma curva cuja Tm indica quais os alelos presentes na amostra (Figura 2.2, b) [138].

Tabela 2.3: Concentrações finais dos reagentes (*primers*, DNA e *master mix*) utilizados nas reações de genotipagem de cada um dos SNPs (ID SNP).

Gene	ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		Concentração final		
				<i>Primers</i> (µM)	DNA (ng/µL)	MeltDoctor
NOS1	rs77074921	F	5'-ggcgccgcgcgggcGGAGCTGATGGAATAGTAACG-3'	0,10	1	1X
		F	5'-GGAGCTGATGGAATAGTATCA-3'	0,10		
		R	5'-GCAGGAGTACGAGGAATGGA-3'	0,20		
	rs76839820	F	5'-ggcgccgcgcgggcAAGGTGGTCTCCAGGTACG-3'	0,20	0,6	
		F	5'-AAGGTGGTCTCCAGGTTC-3'	0,20		
		R	5'-GAGGTACTCAGAGGCATTG-3'	0,30		
MTHFR	rs72552099	F	5'-CCAGCATCACTCACTTTGTGA-3'	0,20	1	
		R	5'-ggcgccgcgcgggcGGAGCTGACCAGTGAAGAGC-3'	0,10		
		R	5'-GGAGCTGACCAGTGAAGACA-3'	0,15		
ACE	rs8075924	F	5'-ggcgccgcgcgggcGAATCATGGAGGCAGACTTTC-3'	0,20	1	
		F	5'-GAATCATGGAGGCAGACTTAT-3'	0,10		
		R	5'-ACATCTTCACATGGTGGCAG -3'	0,20		
	rs4357	F	5'-ggcgccgcgcgggcCGCAGGAGAATGGGGTGTTC-3'	0,10	1	
		F	5'-ACGCAGGAGAATGGGGTACT-3'	0,10		
		R	5'-CTGGTACTTCAGCCTGTCTGA-3'	0,20		

Tabela 2.4: Sequências de DNA utilizadas como controlos positivos das reações de genotipagem. As sequências representam cada um dos alelos esperados para cada SNP em estudo. O tamanho do amplicão está indicado em pares de bases (pb). Nucleótidos a vermelho: possíveis alelos para cada SNP.

Gene	ID SNP	Sequência dos fragmentos	Tamanho amplicão
NOS1	rs77074921	5'-CTTCATCAGGGTACATGTCTGGGGAGGAGCTGATGGAA TAGTAGC G GGGCTGCAGCAGGGACAGCTGGGTGAGGAGC AGGGTGGCCGGCATCTGGATAGATGGGAATCCTCCAGC ACCTCCACGATGGTGGGGTTCTTGCCCCATTTCCATTCTC GTACTCCTGCAAACCCTGTGCCAAGGAGATGGACA-3'	192 pb
		5'-CTTCATCAGGGTACATGTCTGGGGAGGAGCTGATGGAA TAGTAGC A GGGCTGCAGCAGGGACAGCTGGGTGAGGAGC AGGGTGGCCGGCATCTGGATAGATGGGAATCCTCCAGC ACCTCCACGATGGTGGGGTTCTTGCCCCATTTCCATTCTC GTACTCCTGCAAACCCTGTGCCAAGGAGATGGACA-3'	192 pb
	rs76839820	5'-GGTCTTGGGGGTCCCATCACCTGTAAAGGTGGTCTCCA GGTGC G TGGTGAAACCTTCAGGGCCCCTCAGAATGAGGA CCACGTGGGTCTCAGAGGCAATGCCTCTGAGTACCTCCAG GCGCTGTCATAGCTCAGGTCC-3'	139 pb
		5'-GGTCTTGGGGGTCCCATCACCTGTAAAGGTGGTCTCCA GGTGC A TGGTGAAACCTTCAGGGCCCCTCAGAATGAGGA CCACGTGGGTCTCAGAGGCAATGCCTCTGAGTACCTCCAG GCGCTGTCATAGCTCAGGTCC-3'	139 pb
MTHFR	rs72552099	5'-CCAGCATCACTCACTTTGTGACCATTCCGGTTTGGTTCT CCCGAGAGGTAAGAACAAGACTTCAAAGACACT T TCTT CACTGGTCAGTCC-3'	93 pb
		5'-CCAGCATCACTCACTTTGTGACCATTCCGGTTTGGTTCT CCCGAGAGGTAAGAACAAGACTTCAAAGACAC G TCTT TCACTGGTCAGTCC-3'	93 pb
ACE	rs8075924	5'-GTGTTAGAGGAGAGGTGGGCGTGTGAATCATGGAGGC AGACTT C CCTTTGCCGTTCTCGTGATAGTACTGAGTTCT CAGGATCTGGTTGTTTAAAGTGTGTAGCGCCTCCCCCTT CTCTCTCTCTCCTGCCACCATGTGAAGATGTGCCTGCTTCC CTTTCGCCTTCCACC-3'	176 pb
		5'-GTGTTAGAGGAGAGGTGGGCGTGTGAATCATGGAGGC AGACTT T CCTTTGCCGTTCTCGTGATAGTACTGAGTTCT CAGGATCTGGTTGTTTAAAGTGTGTAGCGCCTCCCCCTT CTCTCTCTCTCCTGCCACCATGTGAAGATGTGCCTGCTTCC CTTTCGCCTTCCACC-3'	176 pb
	rs4357	5'-GGTGATTGTGCACAGAGGCCAGCACGCAGGAGAATG GGGTGC C CAGTATAGCCCCAAGTGCAGGGACCCTCCCTCA AGTCAAAAATGCCACCCCCAGCCTGGTTCTCCCCAACTC ATCTTCCAACATATATTCCCACTCGACAGGCTGAAGTACC AGGGCCTCTGCCCCCAGTGCCCAGGA-3'	184 pb
		5'-GGTGATTGTGCACAGAGGCCAGCACGCAGGAGAATG GGGTGC T CAGTATAGCCCCAAGTGCAGGGACCCTCCCTCA AGTCAAAAATGCCACCCCCAGCCTGGTTCTCCCCAACTC ATCTTCCAACATATATTCCCACTCGACAGGCTGAAGTACC AGGGCCTCTGCCCCCAGTGCCCAGGA-3'	184 pb

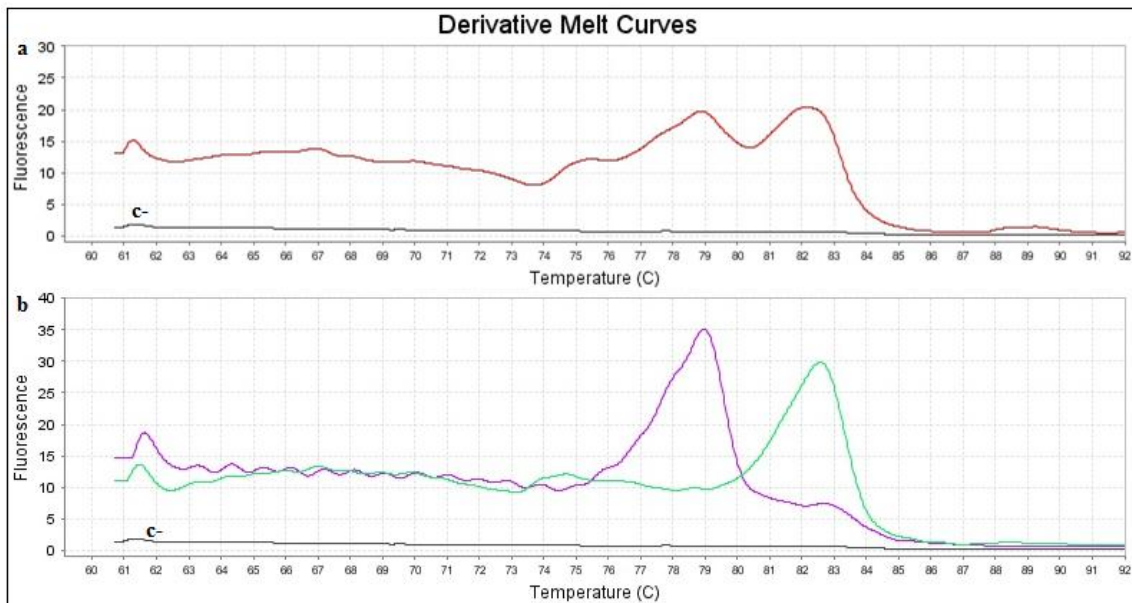


Figura 2.2: Curvas das derivadas de *melting*. a - Curva específica para o genótipo GT ($T_m=79^\circ\text{C}$ e $82,5^\circ\text{C}$). b - Sobreposição das curvas específicas para o genótipo TT ($T_m=79^\circ\text{C}$) e GG ($T_m=82,5^\circ\text{C}$). Controle negativo representado por “c”.

2.4. Sequenciação de Sanger

Para comprovar os resultados obtidos pela técnica de AS-PCR, algumas amostras de DNA foram sequenciadas pelo método de Sanger utilizando o sequenciador “3500 Genetic Analyzer” da Applied Biosystems, HITACHI.

2.4.1. Amplificação do DNA por PCR para sequenciação

Fragmentos específicos do DNA genômico, englobando os SNPs alvo, foram amplificados por PCR no termociclador “DNA Thermal Cycler” (Bio-Rad, EUA), utilizando os *primers* da Tabela 2.5. As PCRs foram realizadas, num volume total de $25\mu\text{L}$, com: 25ng de DNA genômico, 1X “Advantage SA Buffer”, 1X “Advantage 2 Polymerase Mix” (Clontech, Mountain View-EUA), 0,20mM de dNTPs, 0,20 μM de *primer forward* e 0,20 μM de *primer reverse* e as condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos (rs77074921, rs76839820, rs72552099, rs8075924, rs4357) ou 35 ciclos (rs121912703/rs12720744) de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, T_a dependente do SNP (consultar T_a na

Tabela 2.5) durante 45 segundos e extensão a 68°C durante 1 minuto, seguidos de extensão final a 68°C durante 10 minutos. Os produtos da PCR (5µL) foram posteriormente visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, num transiluminador por iluminação ultravioleta e fotografadas no GelDoc (BioRad laboratories, Segrate-Itália).

Tabela 2.5: Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA dos genes indicados para posterior sequenciação. O tamanho do amplicão em pares de bases (pb) e a temperatura de *annealing* (T_a) para cada fragmento estão indicados.

Gene	ID SNP	Primer forward	Primer reverse	Tamanho amplicão	T_a
NOS1	rs77074921	5'-CAGAGCTTGGGTTATCTGAC-3'	5'-GCAGGAGTACGAGGAATGGA-3'	423 pb	60°C
	rs76839820	5'-GACTCTGGTTGCTTTCTTCG-3'	5'-CTCTCCGTGTAGCCTGAAG-3'	269 pb	60°C
MTHFR	rs72552099	5'-CAAGTCACCTGGGAGAGAC-3'	5'-CTGAAGGACTACTACCTCTTC-3'	426 pb	62°C
ACE	rs8075924	5'-GGATTGCTCTGCTACTTGTC-3'	5'-CAACCAGATCCTGAGAACTC-3'	556 pb	62°C
	rs4357	5'-GATGGAAGCATCACCAAGGA-3'	5'-CTGGTACTTCAGCCTGTCGA-3'	253 pb	60°C
	rs121912703/ rs12720744	5'-CATGTTGAGCTACTTCAAGC-3'	5'-CACCTCAGGAGTGTCTCAG-3'	489 pb	62°C

2.4.2. Purificação do produto PCR

O produto da PCR (3,5µL) foi purificado utilizando o protocolo de “Ilustra™ ExoStar”, da Life Sciences, com as seguintes alterações: no passo 2, utilização de 3,5µL de produto da PCR; no passo 3, adição de 0,7µL de fosfatase alcalina, e no passo 4, adição de 0,7µL da exonuclease [145].

2.4.3. Reações de sequenciação e análise dos resultados

As reações de sequenciação, num volume final de 10µL, compreenderam 4,9µL do DNA purificado, 1X “BigDye Terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems)”, 1X de “Sequencing Buffer (5X)” e 0,50µM de *primer*.

O programa para amplificação do fragmento de DNA a sequenciar correspondeu a: desnaturação a 96°C durante 3 minutos, 25 ciclos com desnaturação a 96°C durante 10 segundos, *annealing* cuja temperatura varia consoante o SNP (Tabela 2.5) durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos. Os produtos foram armazenados a 4°C até sequenciação.

Os resultados foram visualizados no programa “ContigExpress” (Nova Iorque-EUA).

Capítulo 3

Resultados

3.1 Seleção dos SNPs

No presente trabalho procedeu-se à tentativa de identificação de alelos de risco, ou seja, alelos que ocorrem com maior frequência nos doentes com fenótipo agressivo (fenótipo C, 149 diabéticos) do que no do grupo controlo (fenótipo A, 79 diabéticos), de modo a caracterizar geneticamente o fenótipo agressivo da RD. O fenótipo B (79 diabéticos), que possuía indivíduos com progressão intermédia da RD, também participou neste estudo pois foi necessário combiná-lo com o fenótipo C para uma comparação mais real entre os fenótipos de progressão da RD (B e C) e o fenótipo controlo (A). Este estudo caso-controlo foi iniciado com a seleção de SNPs em 11 genes candidatos referidos na literatura. De forma manual e com o auxílio de ferramentas bioinformáticas resultou a seleção de 178 SNPs que foram genotipados pelo sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] (172 dos quais com sucesso) e mais 28 SNPs que não foram possíveis de genotipar por esta técnica. Para ultrapassar as desvantagens do sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], foi apontada a técnica de *Allele-Specific* PCR para realizar essa genotipagem. Dos 28 SNPs apenas foram selecionados os que estavam presentes nos genes ACE, MTHFR e NOS1 que foram identificados como estatisticamente relevantes, no desenvolvimento da RD, pela análise dos resultados do sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®]. A seleção dos SNPs foi feita com base no *Ensembl Genome* Browser atendendo aos seguintes critérios: 1) estado de validação do SNP, isto é, se este foi submetido no *browser* por uma entidade reconhecida, como, por exemplo o Projeto dos 1000 Genomas ou o Projeto Internacional HapMap ou se existem estudos realizados por outras entidades com um número também considerável de indivíduos; informação clínica relevante; localização do SNP no gene; tipo de mutação; grau de previsão de patogenicidade de acordo com os *softwares* SIFT e PolyPhen (*Tolerated* e *Deleterious*; *Probably* ou *Possibly damaging* e *Benign*, respetivamente); frequência na população europeia e MAF (*Minor Allele Frequency*), que permite determinar a probabilidade de identificar indivíduos com essa alteração, isto é, o valor da MAF indica a frequência do alelo menos frequente (exemplo: se MAF=0.01, existe a probabilidade de detetar 1 alelo em cada 100 indivíduos). De acordo com estes critérios, no total foram selecionados 8 SNPs para genotipar por AS-PCR: 5 do gene ACE, 2 do gene NOS1 e 1 do gene MTHFR. As características destes SNPs encontram-se discriminadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Descrição dos SNPs selecionados para genotipagem por *Allele-Specific* PCR com a plataforma de PCR em tempo real. Retirado de www.ensembl.org.

Gene	ID SNP	Alteração Transcripto	Frequência Europa	Características	
NOS 1	rs77074921	Arg1178Cys (CGC/TGC) ENST00000317775	Sem dados	→ Mutação não sinónima	→ Não validado → SIFT: <i>Deleterious</i> → PolyPhen: <i>Probably damaging</i>
	rs76839820	Thr105Met (ACG/ATG) ENST00000317775	Sem dados	→ Mutação não sinónima	→ Não validado → SIFT: <i>Deleterious</i> → PolyPhen: <i>Probably damaging</i>
MTHFR	rs72552099	Ser430Arg (AGT/CGT) ENST00000376592	Sem dados	→ Mutação não sinónima	→ Validado por: Frequency → SIFT: <i>Deleterious</i> → Polyphen: <i>Benign</i>
ACE	rs8075924	c.1970-1525C>T ENST00000490216	1000 Genomas: C: 0,850 (644) T: 0,150 (114) CC: 0,720 (273) CT: 0,259 (98) TT: 0,021 (8)	→ Intrónico	→ Validado por: 1000 Genomas, HapMap
	rs4357	c.3282-103C>T ENST00000290866	1000 Genomas: C: 0,997 (756) T: 0,003 (2) CC: 0,995 (377) CT: 0,005 (2)	→ Intrónico	→ Validado por: 1000 Genomas, HapMap
	rs121912703	Pro1228Leu (CCG/CTG) ENST00000290866	Sem dados	→ Mutação não sinónima, patogénica (aumento de ACE no soro)	→ Não validado → SIFT: <i>Tolerated</i> → PolyPhen: <i>Probably damaging</i>

Tabela 3.1: Descrição dos SNPs selecionados para genotipagem por *Allele-Specific* PCR com a plataforma de PCR em tempo real. Retirado de www.ensembl.org. (Continuação)

Gene	ID SNP	Alteração Transcripto	Frequência Europa	Características	
ACE	rs113110741	c.3691+1G>C ENST00000290866	Sem dados	→Intrónico, local de <i>splicing</i> essencial	→Não validado
	rs12720744	c.3691+5C>T ENST00000290866	1000 Genomas: C: 0,995 (754) T: 0,005 (4) CC: 0,989 (375) CT: 0,011 (4)	→Intrónico, local de <i>splicing</i>	→Validado por: 1000 Genomas

Do gene NOS1, dos 4 SNPs foram estudados 2 SNPs (Tabela 1.2, Capítulo 1 – Introdução) porque, de acordo com as previsões do SIFT e PolyPhen, apresentam um forte potencial patogénico. No entanto, estes 2 SNPs não foram ainda validados, não apresentam estudos relevantes na população europeia. Os outros 2 não possuíam dados que justificassem a sua análise.

O SNP rs72552099, do gene MTHFR, embora não apresente estudos relevantes na população europeia foi considerado porque há referências de que entrou num estudo registado por PharmGKB (The Pharmacogenomics Knowledgebase – Universidade de Stanford). Neste gene ainda foram deixados por estudar mais 3 genes por não possuírem dados no *Ensemble Genome Browser* que justificassem a sua análise.

No caso do gene ACE, foram considerados todos os SNPs (5) uma vez que este gene está fortemente envolvido no desenvolvimento da RD, apesar do SNP rs113110741 não apresentar estudos na população europeia, nem outros dados relevantes, e do rs12720744 apresentar frequência muito baixa nessa população.

3.2. Genotipagem por AS-PCR

As amostras de DNA sob estudo (307 indivíduos distribuídos em 3 grupos: fenótipo A-79, fenótipo B-79 e fenótipo C-149) foram genotipadas para os SNPs selecionados (NOS1_rs77074921 e rs76839820, MTHFR_rs72552099 e ACE_

rs8075924 e rs4357) por AS-PCR. Nesta técnica de genotipagem, após amplificação por PCR do fragmento de DNA que engloba o SNP em análise, gera-se uma curva de *melting* específica cuja T_m depende da sequência, comprimento e conteúdo em GC do fragmento (Anexo IV – Otimização da técnica AS-PCR). Assim, com base nas curvas de *melting* geradas, é possível determinar os genótipos das amostras para os SNPs sob estudo.

Para cada SNP procedeu-se à otimização dos *primers* com relação à posição e composição do *mismatch*, condições de amplificação e comprimento da cauda GC. Para a otimização foram incluídos controlos positivos correspondendo às sequências do gene para as posições homozigóticas e heterozigóticas como está indicado no Capítulo 2 – Materiais e Métodos. Uma minoria das amostras dos doentes foi comparada com os controlos positivos de cada SNP. A sequenciação de Sanger de alguns indivíduos foi utilizada para confirmar os resultados da genotipagem antes de avançar para a genotipagem dos doentes.

3.2.1. Gene NOS1

3.2.1.1. rs77074921 (G/A)

Para o SNP NOS1_rs77074921 (G/A), a T_m teórica para o produto de PCR com a cauda GC, nesta situação correspondente ao alelo G, foi de 87°C. A T_m do produto com o alelo A foi de 84°C (Tabela 2.2, Capítulo 2 – Materiais e métodos). Teoricamente verifica-se uma diferença de 3°C entre as curvas correspondentes a cada um dos dois alelos do SNP.

3.2.1.1.1. Genótipo GG

O genótipo GG é determinado pela ocorrência de uma curva de *melting* com T_m próxima de 87°C. A Figura 3.1 mostra que os produtos amplificados correspondem ao alelo G, embora a T_m do pico da curva seja de 86°C, um pouco menor que a T_m teórica. A curva de *melting* do controlo positivo para o alelo G (Figura 3.1, p) é semelhante à amostra de DNA tomada como exemplo, número 222 (Figura 3.1, a), o que indica que o indivíduo 222 é GG para o SNP em estudo.

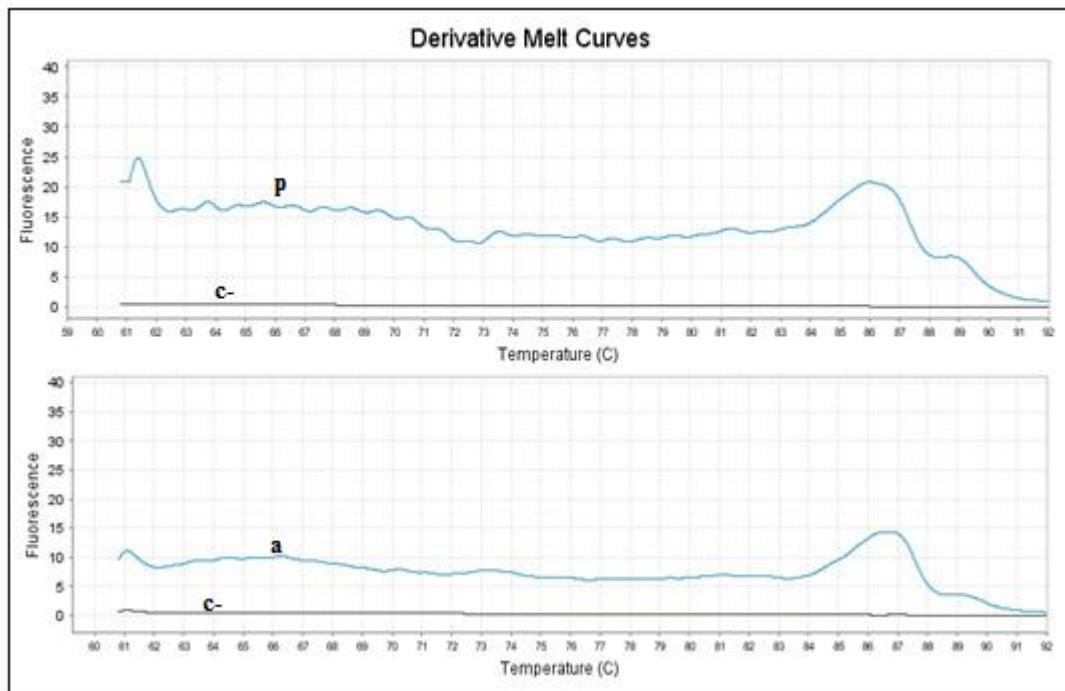


Figura 3.1: Curvas das derivadas de *melting* específicas para o genótipo GG (T_m cerca 86°C) do NOS1_rs77074921. “p”: controlo positivo, “a”: amostra DNA n.º 222 e “c-”: controlo negativo.

A amostra n.º. 222 foi sequenciada de modo a confirmar o genótipo obtido por AS-PCR. De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 3.2, o indivíduo é homocigótico para o alelo G (indicado pela seta).

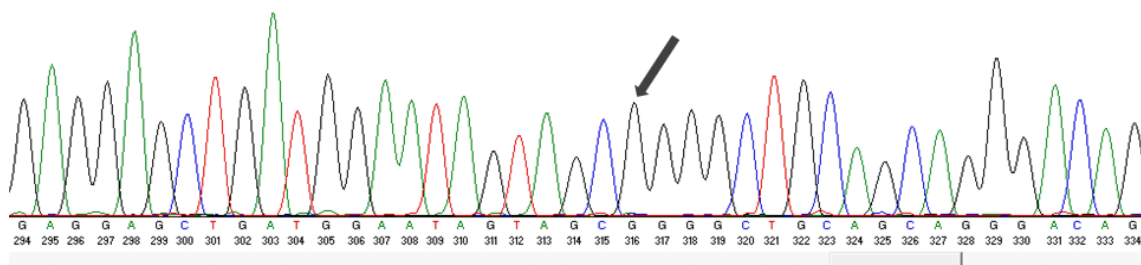


Figura 3.2: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 222 é GG para o NOS1_rs77074921.

3.2.1.1.2. Genótipo AA

Pela análise da Figura 3.3, verifica-se que o produto amplificado, correspondente ao controlo positivo para o alelo A, gera uma curva com uma T_m de 84°C (p) tal como esperado. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou genótipo AA.

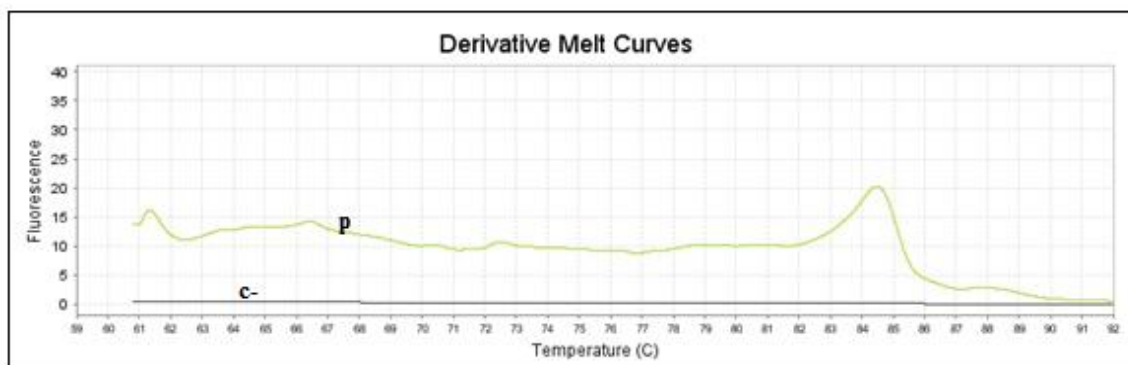


Figura 3.3: Curva da derivada de *melting* para o NOS1_rs77074921. Pico homocigótico para A, a 84°C, para o controle positivo (p). Controle negativo representado por “c-”.

3.2.1.1.3. Genótipo GA

Apesar das curvas de *melting* obtidas para os alelos G e A (pico homocigótico aproximadamente a 86°C, Figuras 3.1, e a 84°C, Figura 3.3, respetivamente), quando se tentou reproduzir um controle positivo heterocigótico, a curva obtida não permitiu identificar de forma evidente os dois alelos presentes na reação (Figura 3.4, p). No entanto, esta curva foi considerada como controle para um indivíduo heterocigótico, pois o seu perfil é muito diferente das curvas que indicam homocigotia.

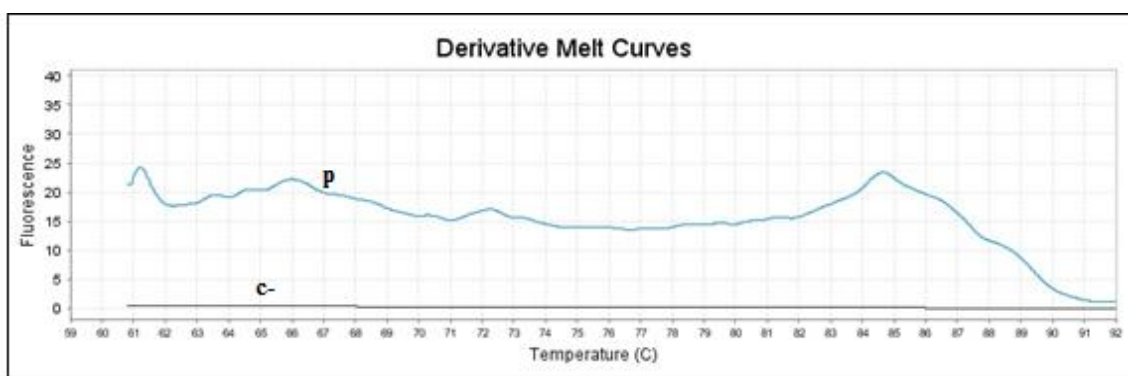


Figura 3.4: Curva da derivada de *melting* para o NOS1_rs77074921. Pico heterocigótico (GA) para o controle positivo (p). Controle negativo representado por “c-”.

Após estabelecimento das condições de genotipagem, os indivíduos do fenótipo B (79) e C (149) foram analisados para o NOS1_rs77074921 pela técnica AS-PCR. Os 228 indivíduos apresentaram genótipo GG (Anexo I), sendo G considerado o alelo ancestral segundo a base de dados Ensembl. Como todas as amostras apresentaram perfis das curvas de *melting* semelhantes entre si e entre o controle positivo para o alelo G, apenas 2 amostras de DNA (119 e 222, fenótipo C) foram sequenciadas pelo método

de Sanger. Como o objetivo do trabalho passava por identificar marcadores de risco, ficaram por genotipar os 79 indivíduos do fenótipo A (grupo controlo).

As frequências genótípicas e alélicas para cada fenótipo encontram-se descritas na Tabela 3.2 e representadas graficamente na Figura 3.5.

Tabela 3.2: Frequências genótípicas e alélicas do NOS1_rs77074921 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

Fenótipo	Freq. genótípicas (n)	Freq. alélicas (n)
B	GG: 1,0 (79)	G: 1,0 (158)
C	GG: 1,0 (149)	G: 1,0 (298)

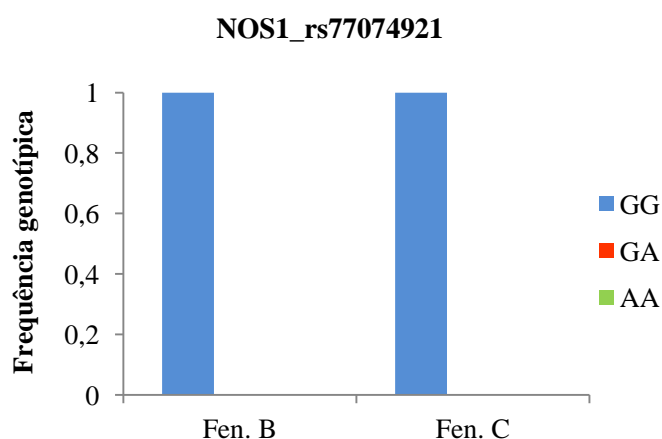


Figura 3.5: Representação gráfica da genotipagem do NOS1_rs77074921 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

3.2.1.2. rs76839820 (G/A)

O SNP NOS1_rs76839820 (G/A) possui uma T_m teórica de 84°C para o produto de PCR com a cauda GC, correspondente à deteção do alelo G, e uma T_m de 80°C para o produto do alelo A (Tabela 2.2, Capítulo 2 – Materiais e métodos), o que resulta numa diferença de 4°C entre as curvas correspondentes dos alelos.

3.2.1.2.1. Genótipo GG

O genótipo GG é determinado pela ocorrência de uma curva de *melting* com T_m próxima de 84°C, assim, pela observação da Figura 3.6, conclui-se que os produtos

amplificados correspondem ao alelo G, cuja T_m também foi de 84°C. A curva de *melting* do controlo positivo para o alelo G (Figura 3.6, p) é semelhante à amostra de DNA tomada como exemplo, número 263 (Figura 3.6, b), o que indica que o indivíduo 263 é GG para o SNP em estudo.

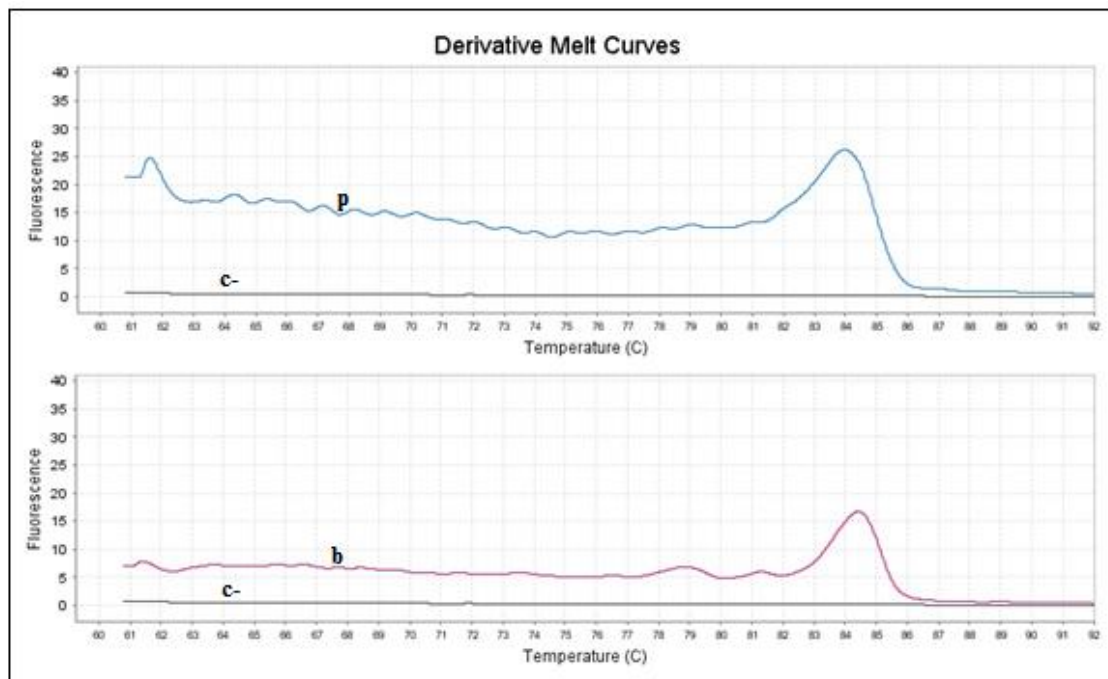


Figura 3.6: Curvas das derivadas de *melting* específicas para o genótipo GG (T_m cerca 86°C) do NOS1_rs76839820. “p”: controlo positivo, “b”: amostra DNA n.º 263 e “c-”: controlo negativo.

Foi comprovado o genótipo da amostra n.º263 por sequenciação de Sanger. Como se observa no cromatograma da Figura 3.7, o indivíduo é homozigótico para o alelo G (indicado pela seta).

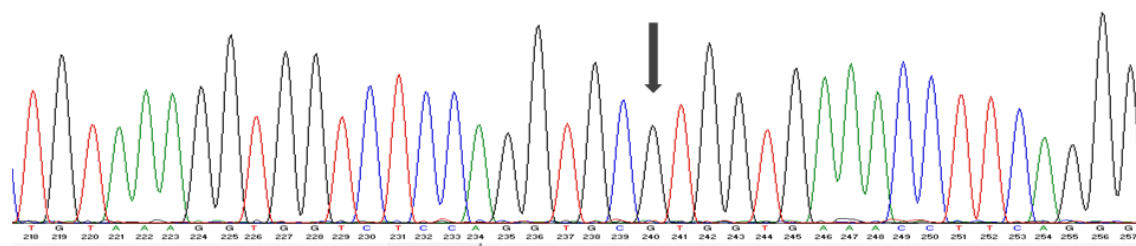


Figura 3.7: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 263 é GG para o NOS1_rs76839820.

3.2.1.2.2. Genótipo AA

A Figura 3.8 representa uma curva com uma T_m de 80°C (p), correspondente ao produto amplificado do controlo positivo para o alelo A, tal como esperado. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou genótipo AA.

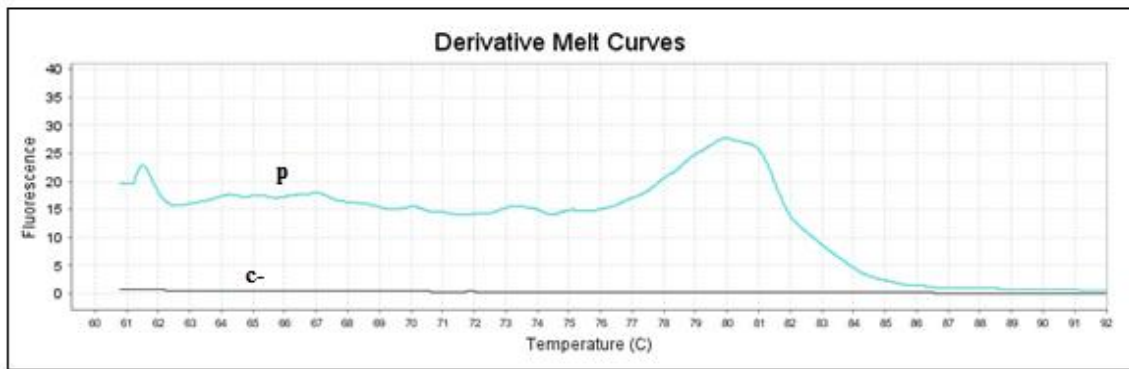


Figura 3.8: Curva da derivada de *melting* para o NOS1_rs76839820. Pico homozigótico para A, a 80°C, para o controlo positivo (p). Controlo negativo representado por “c-”.

3.2.1.2.3. Genótipo GA

Para este SNP obteve-se uma curva de *melting* para o controlo positivo G + A numa proporção de 1:1 que representa, de facto, os resultados de genotipagem esperados para um DNA heterozigótico (p). A curva possui dois picos, nas T_m esperadas para os dois alelos (Figura 3.9). Contudo, este perfil não foi identificado em nenhuma das amostras de DNA genotipadas.

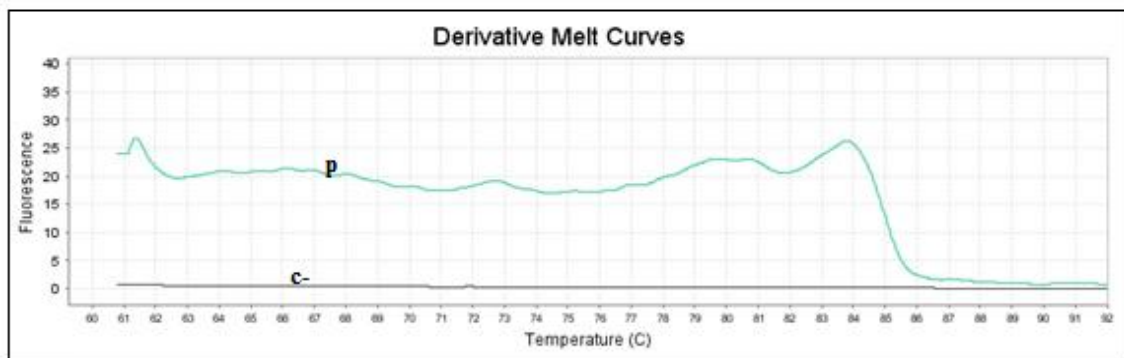


Figura 3.9: Curva da derivada de *melting* para o NOS1_rs76839820. Pico heterozigótico (GA), a 80°C e 84°C, para o controlo positivo (p). Controlo negativo representado por “c-”.

A genotipagem deste SNP, pela técnica AS-PCR, foi efetuada em 79 indivíduos do fenótipo B e 149 do fenótipo C. Algumas destas amostras geraram curvas de *melting* diferentes do esperado, de acordo com os controlos positivos, e por esta razão foram sequenciadas 3 amostras do fenótipo B (116, 223 e 274) e 11 do fenótipo C (1, 16, 18, 35, 41, 45, 67, 142, 256, 263, e 281). Os 228 indivíduos apresentaram genótipo GG para o SNP rs76839820 (Anexo I), sendo G considerado o alelo ancestral segundo a base de dados Ensembl. Deste modo, ficaram por genotipar 79 indivíduos do fenótipo A, pela mesma razão apresentada para o SNP rs77074921.

As frequências genótípicas e alélicas para cada fenótipo encontram-se descritas na Tabela 3.3 e representadas graficamente na Figura 3.10.

Tabela 3.3: Frequências genótípicas e alélicas do NOS1_rs76839820 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

Fenótipo	Freq. genótípicas (n)	Freq. alélicas (n)
B	GG: 1,0 (79)	G: 1,0 (158)
C	GG: 1,0 (149)	G: 1,0 (298)

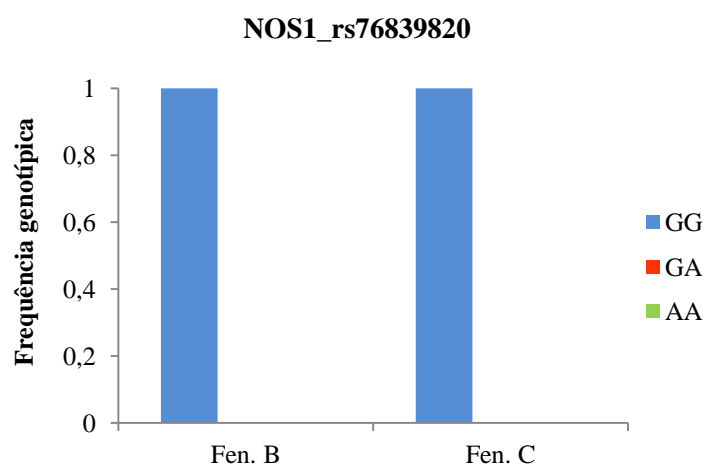


Figura 3.10: Representação gráfica da genotipagem do NOS1_rs76839820 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

3.2.2. Gene MTHFR

3.2.2.1 rs72552099 (T/G)

Para o SNP MTHFR_rs72552099 (T/G), a T_m teórica para o produto de PCR com a cauda GC, nesta situação correspondente ao alelo G, foi de 82°C. A T_m do produto com o alelo T foi de 78°C (Tabela 2.2, Capítulo 2 – Materiais e métodos). Teoricamente verifica-se uma diferença de 4°C entre as curvas correspondentes a cada um dos dois alelos do SNP.

3.2.2.1.1 Genótipo TT

O genótipo TT é determinado pela ocorrência de uma curva de *melting* com T_m próxima de 78°C, portanto a Figura 3.11 mostra que os produtos amplificados

correspondem ao alelo T. A curva de *melting* do controlo positivo para o alelo T (Figura 3.11, p) é semelhante à amostra de DNA tomada como exemplo, número 139 (Figura 3.11, c), o que indica que o indivíduo 139 é GG para o SNP em estudo.

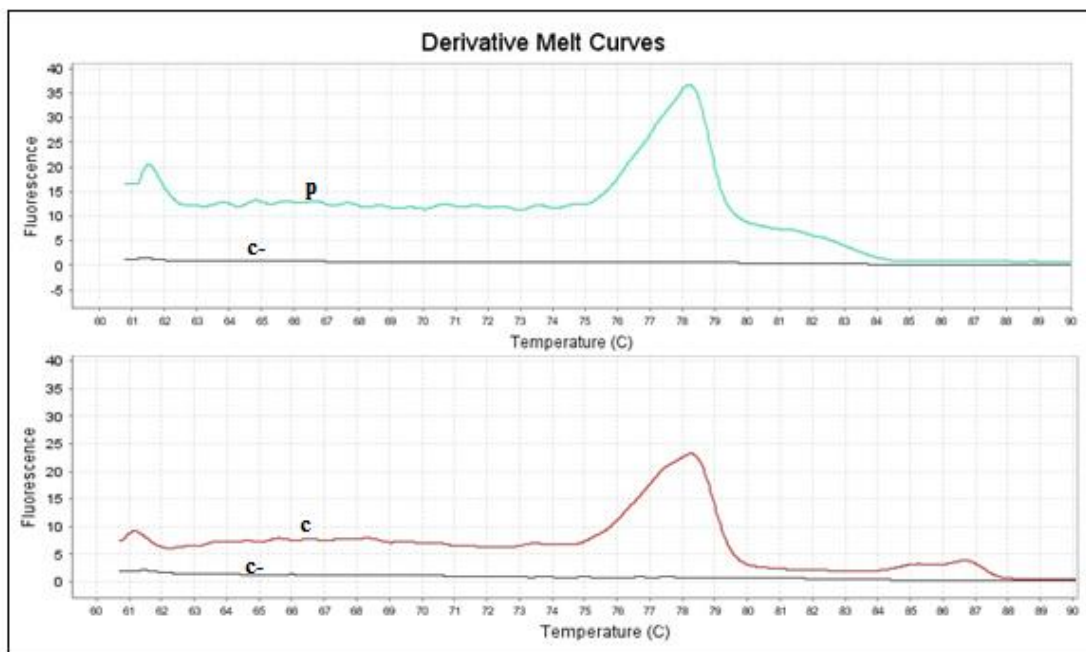


Figura 3.11: Curvas das derivadas de *melting* específicas para o genótipo TT ($T_m=78^{\circ}\text{C}$) do MTHFR_rs72552099. “p”: controlo positivo, “c”: amostra DNA n.º 139 e “c-”: controlo negativo.

A amostra n.º. 139 foi sequenciada de modo a confirmar o genótipo obtido por AS-PCR. De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 3.12, o indivíduo é homocigótico para o alelo T (indicado pela seta).

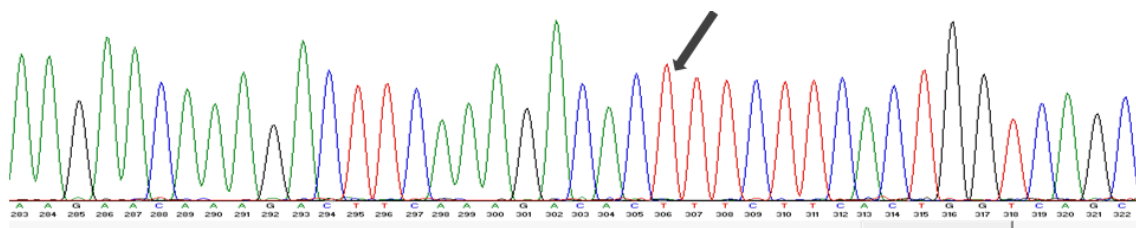


Figura 3.12: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 139 é TT para o MTHFR_rs72552099.

3.2.2.1.2. Genótipo GG

Pela análise da Figura 3.13, verifica-se que o produto amplificado, correspondente ao controlo positivo para o alelo G, gera uma curva com uma T_m cerca de 82°C (p) tal como esperado. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou genótipo AA.

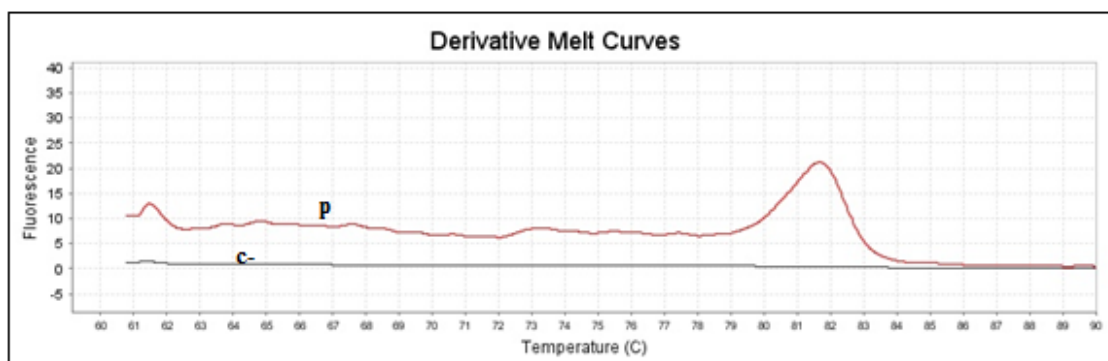


Figura 3.13: Curva da derivada de *melting* para o MTHFR_rs72552099. Pico homozigótico para G, Tm cerca de 82°C, para o controlo positivo (p). Controlo negativo representado por “c-”.

3.2.2.1.3. Genótipo GT

Para este SNP obteve-se uma curva de *melting* para o controlo positivo G + T numa proporção de 1:1 que representa, de facto, os resultados de genotipagem esperados para um DNA heterozigótico (p). A curva possui dois picos, nas Tm esperadas para os dois alelos (Figura 3.14). Contudo, este perfil não foi identificado em nenhuma das amostras de DNA genotipadas.

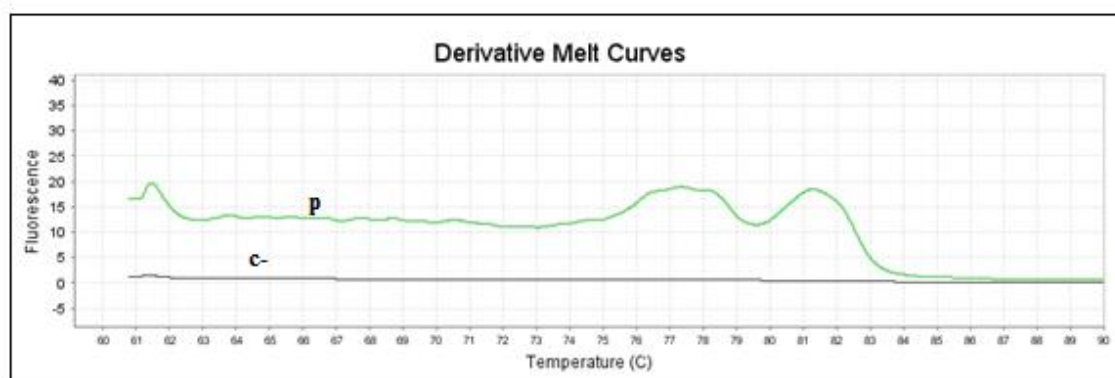


Figura 3.14: Curva da derivada de *melting* para o MTHFR_rs72552099. Pico heterozigótico (GT), a cerca de 78°C e 81°C, para o controlo positivo (p). Controlo negativo representado por “c-”.

A genotipagem deste SNP, pela técnica AS-PCR, também foi efetuada em 79 indivíduos do fenótipo B e 149 do fenótipo C. Algumas destas amostras geraram curvas de *melting* diferentes do esperado, de acordo com os controlos positivos, e por esta razão foram sequenciadas 4 amostras do fenótipo B (121, 125, 206 e 209) e 14 do fenótipo C (1, 18, 28, 29, 35, 41, 43, 45, 93, 137, 198, 220, 247, 264). Todos os 228 indivíduos apresentaram genótipo TT para o SNP rs72552099 (Anexo II), sendo T considerado o alelo ancestral segundo a base de dados Ensembl. Deste modo, ficaram

por genotipar 79 indivíduos do fenótipo A, pela mesma razão apresentada para os SNPs do gene NOS1.

As frequências genótípicas e alélicas para cada fenótipo encontram-se descritas na Tabela 3.4 e representadas graficamente na Figura 3.15.

Tabela 3.4: Frequências genótípicas e alélicas do MTHFR_rs72552099 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

Fenótipo	Freq. genótípicas (n)	Freq. alélicas (n)
B	TT: 1,0 (79)	T: 1,0 (158)
C	TT: 1,0 (149)	T: 1,0 (298)

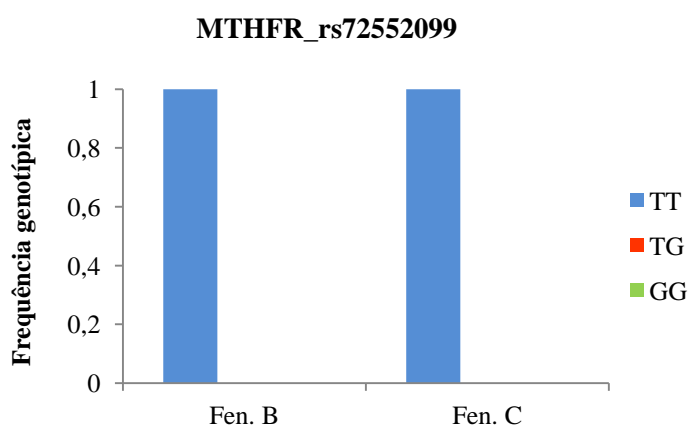


Figura 3.15: Representação gráfica da genotipagem do MTHFR_rs72552099 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos B e C.

3.2.3. Gene ACE

3.2.3.1. rs8075924 (C/T)

O SNP ACE_rs8075924 (C/T) possui uma T_m teórica de 83°C para o produto de PCR com a cauda GC, correspondente à detecção do alelo C, e uma T_m de 80°C para o produto do alelo T (Tabela 2.2, Capítulo 2 – Materiais e métodos). Neste caso, a diferença teórica de 3°C entre os fragmentos controlo não foi suficiente, na prática, para discriminar os dois alelos do SNP. No entanto, durante o processo de otimização dos controlos positivos, a par com algumas amostras de DNA, foram encontrados perfis de curvas de *melting* diferentes para cada um dos alelos (embora com T_m próximas). Estas foram posteriormente confirmadas por sequenciação de Sanger.

As curvas de *melting* das amostras a seguir apresentadas não são demonstradas a par com os seus controlos positivos, como se apresentou nos SNPs anteriores, pois não foi possível obter discriminação dos dois alelos do SNP nessas curvas, como já foi referido. As curvas de *melting* dos controlos positivos obtidas encontram-se no Anexo IV – Otimização da técnica AS-PCR.

3.2.3.1.1. Genótipo CC

Após sequenciação de Sanger constatou-se que o produto amplificado, a partir da amostra número 18 (Figura 3.16, d) que foi tomada como exemplo, corresponde ao alelo C, embora a T_m do pico da curva seja de 82°C (menor que a T_m teórica).

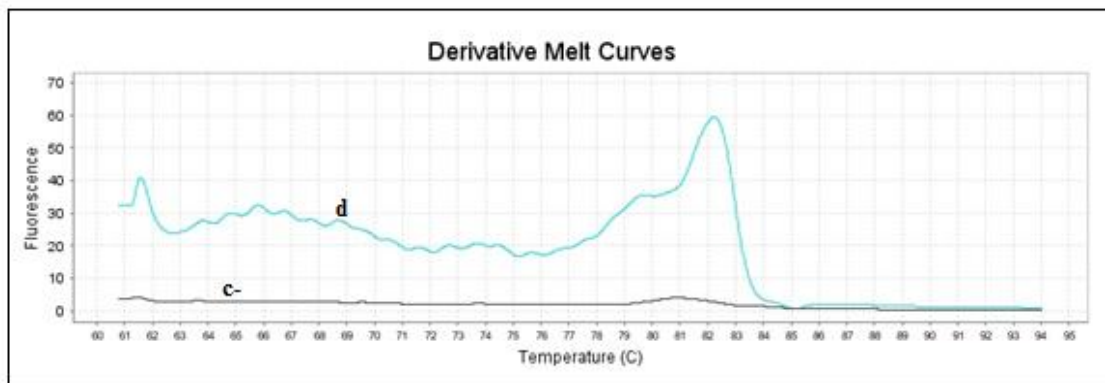


Figura 3.16: Curva da derivada de *melting* específica para o genótipo CC ($T_m=82^\circ\text{C}$) do ACE_rs8075924. “d”: amostra DNA n.º 18 e “c-”: controlo negativo.

Como se observa no cromatograma da Figura 3.17, na posição correspondente ao SNP, o indivíduo é homocigótico para o alelo C (indicado pela seta).

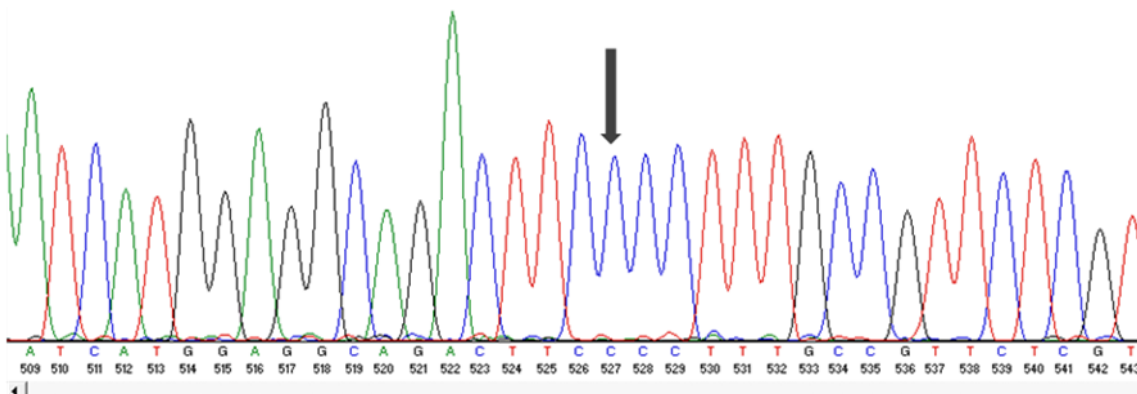


Figura 3.17: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 18 é CC para o ACE_rs8075924.

3.2.3.1.2. Genótipo TT

O produto amplificado de uma amostra de um outro doente (e), número 305, resultou na curva de *melting* da Figura 3.18, com pico à T_m de 80°C, que corresponde ao alelo T em homozigotia.

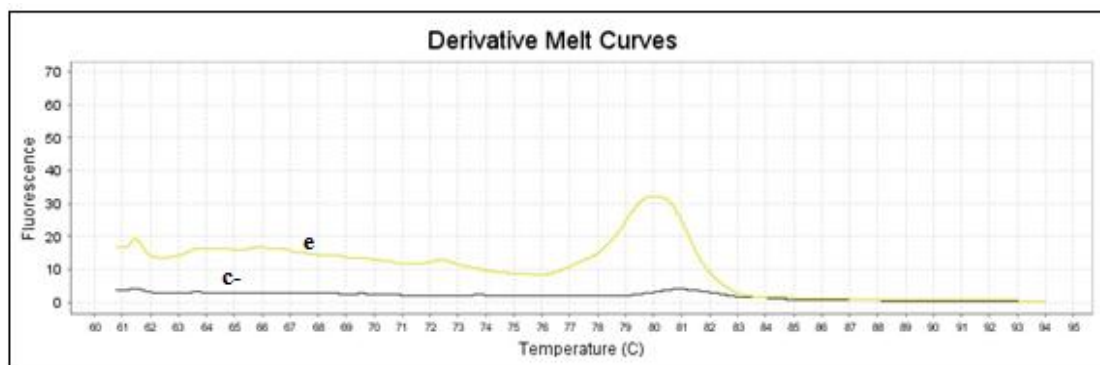


Figura 3.18: Curva da derivada de *melting* específica para o genótipo TT ($T_m=80^\circ\text{C}$) do ACE_rs8075924. “e”: amostra DNA n.º 305 e “c-”: controlo negativo.

A sequenciação de Sanger da amostra n.º305 permitiu confirmar o genótipo obtido por AS-PCR. De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 3.19, o indivíduo é homozigótico para o alelo T (indicado pela seta).

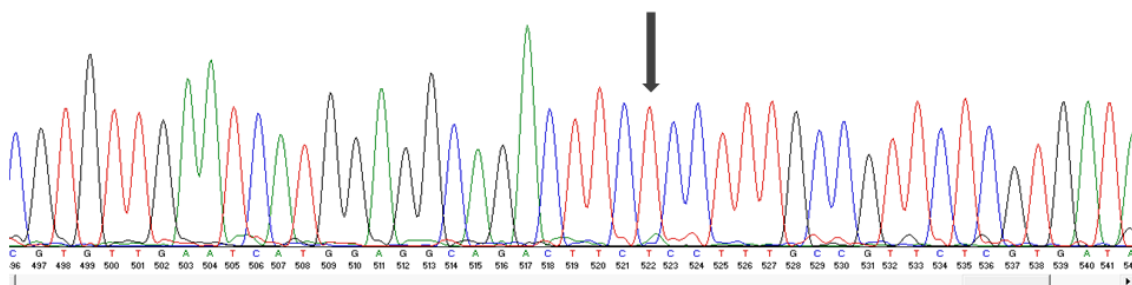


Figura 3.19: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 305 é TT para o ACE_rs8075924.

3.2.3.1.3. Genótipo CT

Neste SNP, obteve-se uma curva de *melting* que representa a amplificação de um DNA heterozigótico, que possui dois picos nas respetivas T_m de identificação dos dois alelos (alelo T - T_m de 80°C e alelo C - T_m de 82°C) (Figura 3.20, f). A amostra de DNA tomada como exemplo é a número 1.

A amostra n.º. 1 foi sequenciada de modo a confirmar o genótipo obtido por AS-PCR. De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 3.21, o indivíduo é heterozigótico (indicado pela seta).

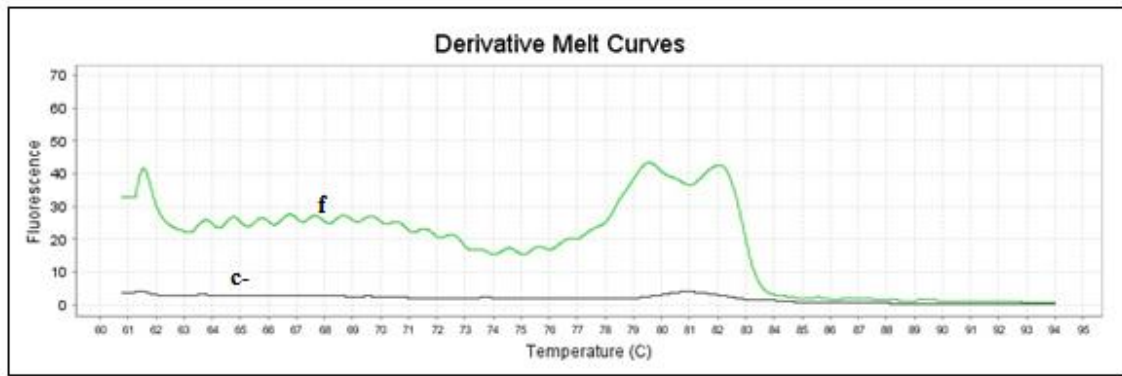


Figura 3.20: Curva da derivada de *melting* para o ACE_rs8075924. Pico heterozigótico para CT, $T_m=79,5^{\circ}\text{C}$ (T) e 82°C (G), para a amostra DNA n.º1 (f). Controlo negativo representado por “c-”.

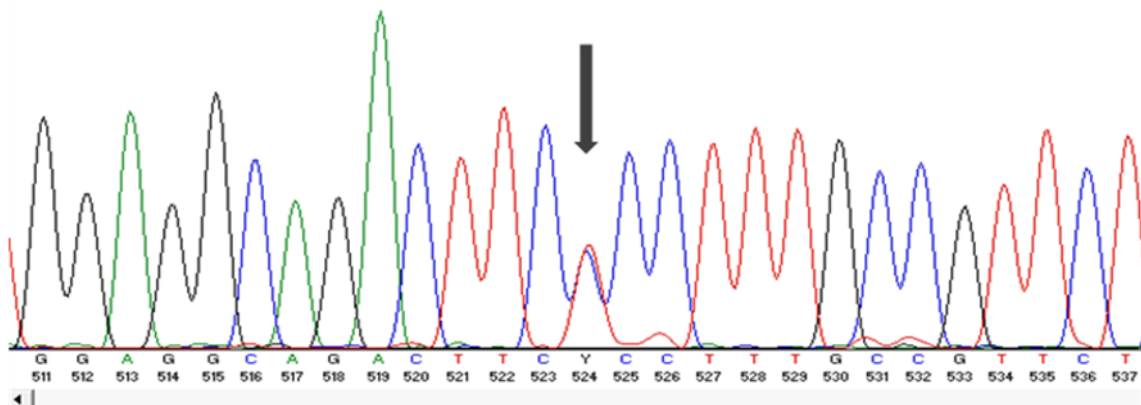


Figura 3.21: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 1 é CT para o ACE_rs8075924.

Todos os indivíduos dos 3 fenótipos foram genotipados para este SNP pela técnica AS-PCR. Os 307 indivíduos apresentaram diferentes genótipos (Anexo II). Como todas as amostras apresentaram perfis semelhantes aos das curvas de *melting* mostradas anteriormente, apenas 2 amostras do fenótipo A (284 e 307), 1 do fenótipo B (305) e 2 do fenótipo C (1 e 18) foram sequenciadas para comprovar os resultados anteriores.

Todos os indivíduos do fenótipo A (grupo controlo) foram também genotipados porque os três genótipos foram previamente identificados nos grupos de desenvolvimento progressivo da RD (fenótipo B e C).

As frequências genótípicas e alélicas para cada fenótipo encontram-se descritas na Tabela 3.5 e representadas graficamente na Figura 3.22. São também apresentadas as frequências dos fenótipo B e C em conjunto (B+C), pois ambos contribuem para o desenvolvimento progressivo da RD e, dessa forma, podem dar resultados mais próximos dos reais.

Tabela 3.5: Frequências genotípicas e alélicas do ACE_rs8075924 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

Fenótipo	Freq genotípicas (n)			Freq alélicas (n)	
	CC	CT	TT	C	T
A	0,65 (51)	0,33 (26)	0,02 (2)	0,81 (128)	0,19 (30)
B	0,64 (50)	0,30 (24)	0,06 (5)	0,78 (124)	0,22 (34)
C	0,57 (85)	0,38 (56)	0,05 (8)	0,76 (226)	0,24 (72)
B+C	0,59 (135)	0,35 (80)	0,06 (13)	0,77 (350)	0,23 (106)

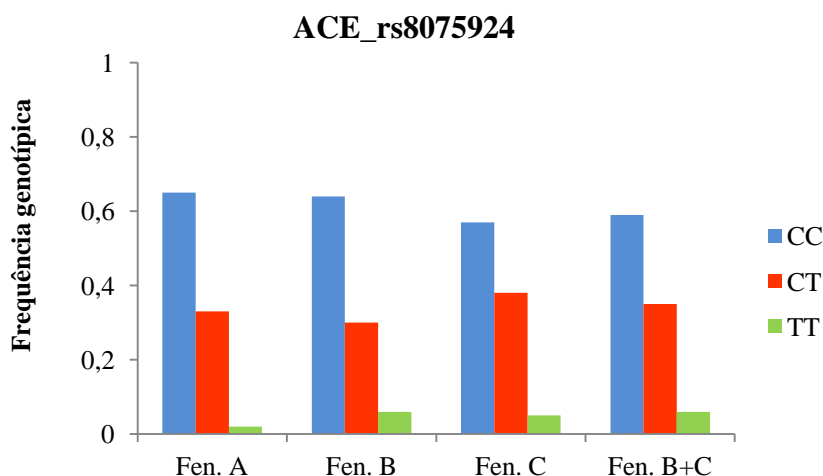


Figura 3.22: Representação gráfica da genotipagem do ACE_rs8075924 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

3.2.3.2. rs4357 (C/T)

O SNP ACE_rs4357 (C/T) possui uma T_m teórica de 85°C para o produto de PCR com a cauda GC, correspondente à detecção do alelo C, e uma T_m de 82°C para o produto do alelo T (Tabela 2.2, Capítulo 2 – Materiais e métodos), o que resulta numa diferença de 3°C entre as curvas correspondentes dos alelos.

3.2.3.2.1. Genótipo CC

O genótipo CC é determinado pela ocorrência de uma curva de *melting* com T_m próxima de 85°C, tal como os produtos amplificados representados na Figura 3.23. A curva de *melting* do controlo positivo para o alelo C (Figura 3.23, p) é semelhante à amostra de DNA tomada como exemplo, número 36 (Figura 3.23, g), o que indica que o indivíduo 36 é CC para o SNP em estudo.

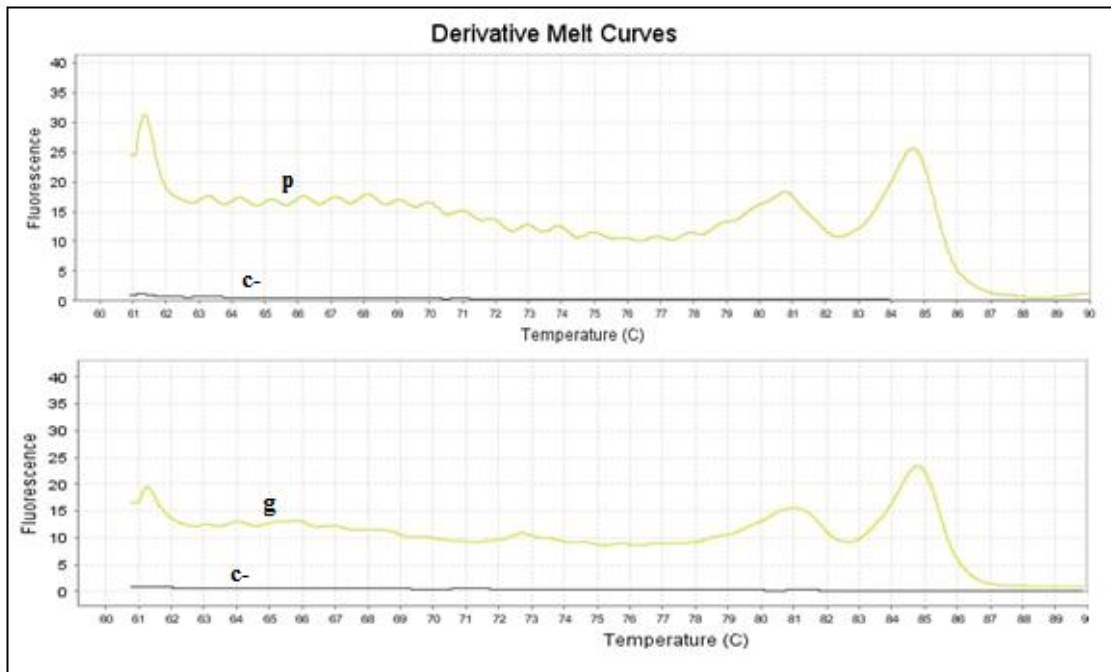


Figura 3.23: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Pico homocigótico para C, a 85°C, para a amostra DNA n.º 36 (g). Controlo negativo representado por “c-”.

As curvas das derivadas de *melting*, tanto a curva “p” como a “g”, apresentam um pico inespecífico com T_m próxima de 81°C. Esse é apresentado devido, provavelmente, à amplificação inespecífica da amostra com o *primer* que possui o nucleótido T na posição do SNP.

Foi comprovado o genótipo da amostra n.º36 por sequenciação de Sanger. Como se observa no cromatograma da Figura 3.24, o indivíduo é homocigótico para o alelo C (indicado pela seta).

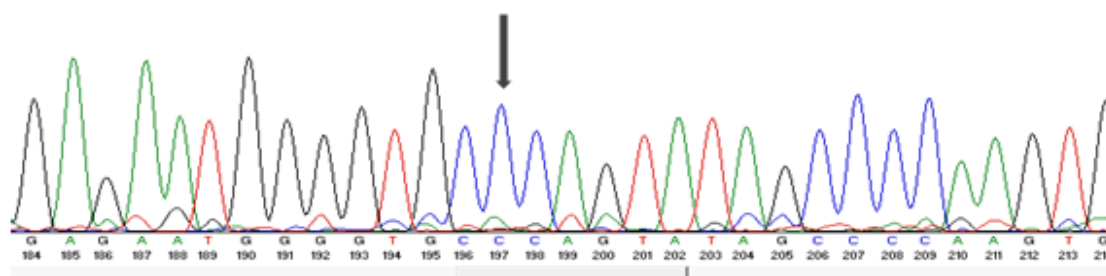


Figura 3.24: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. De acordo com os resultados da genotipagem por AS-PCR, a amostra n.º 36 é CC para o ACE_rs4357.

3.2.3.2.2. Genótipo TT

O genótipo TT é determinado pela ocorrência de uma curva de *melting* com T_m próxima de 82°C. A Figura 3.25 representa uma curva (p), correspondente ao produto amplificado do controlo positivo para o alelo T, embora a T_m do pico da curva seja de

81°C, um pouco menor que a T_m teórica. Nenhum dos indivíduos analisados apresentou genótipo TT.

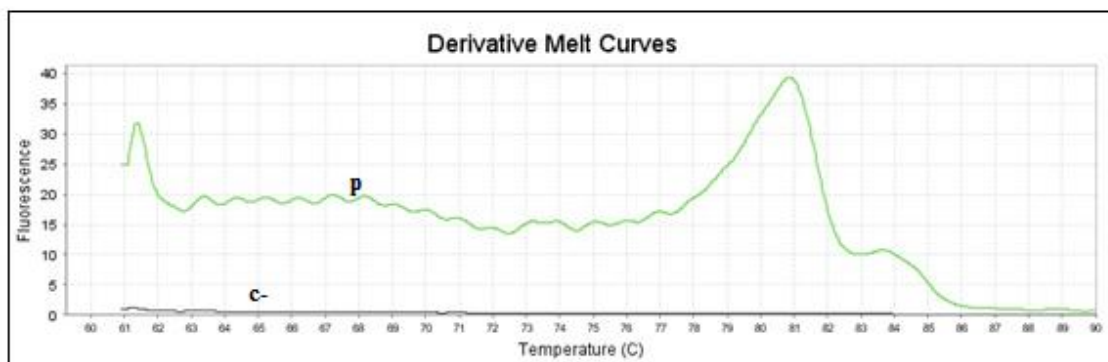


Figura 3.25: Curva da derivada de *melting* para o ACE_rs4357. Pico homocigótico para T, a 81°C, para o controlo positivo (p). Controlo negativo representado por “c-”.

3.2.3.2.3. Genótipo CT

Para este SNP obteve-se uma curva de *melting* para o controlo positivo C + T numa proporção de 1:1 que representa, de facto, os resultados de genotipagem esperados para um DNA heterocigótico (p). A curva possui dois picos, nas T_m esperadas para os dois alelos (Figura 3.26). Apenas um indivíduo, número 41, apresentou genótipo CT (Figura 3.26, h).

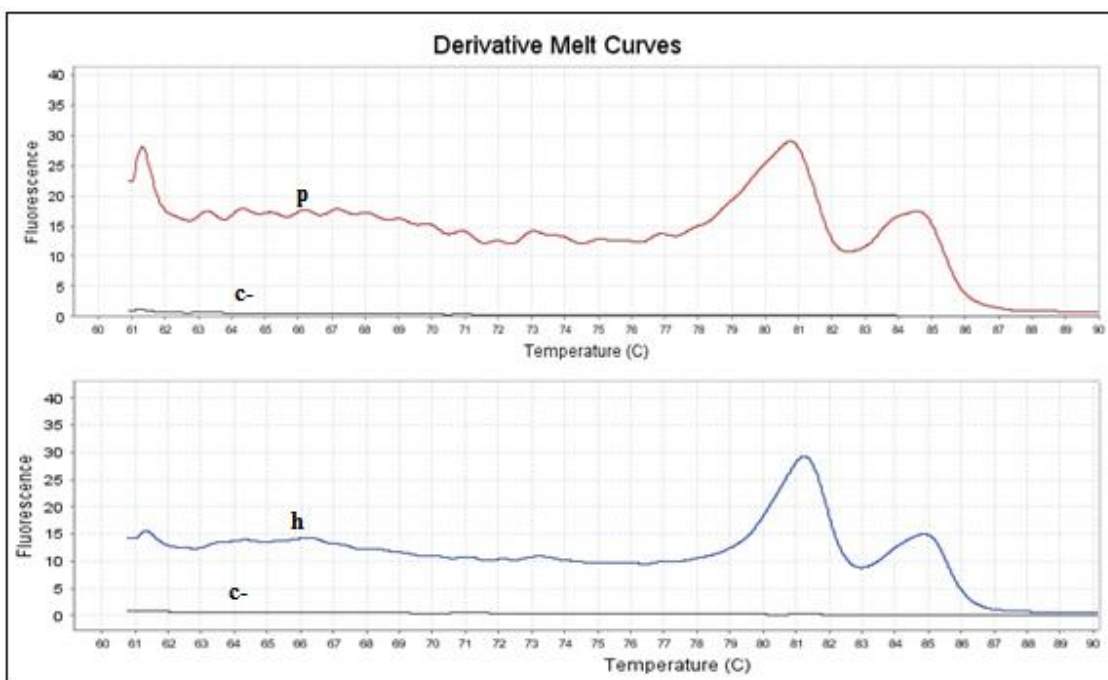


Figura 3.26: Curvas das derivadas de *melting* específicas para o genótipo CT ($T_m=81^\circ\text{C}$ (T) e 85°C (C)) do ACE_rs4357. “p”: controlo positivo, “h”: amostra DNA n.º41 e “c-”: controlo negativo.

Foi comprovado o genótipo da amostra n.º263 por sequenciação de Sanger. Como se observa no cromatograma da Figura 3.27, o indivíduo é heterozigótico (indicado pela seta).

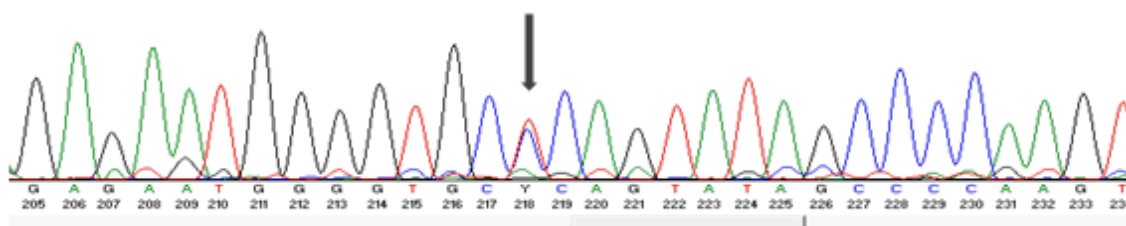


Figura 3.27: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º 41 apresenta genótipo CT para o SNP rs4357, presente no gene ACE.

Os perfis obtidos para as amostras CC e CT apesar de ambos apresentarem dois picos com T_m idênticas, as suas intensidades são completamente diferentes, pelo que foi possível distinguir os genótipos por AS-PCR. Alguns genótipos ainda foram sequenciados e o resultado foi consistente com o observado por AS-PCR.

Foram realizadas reações de PCR pela técnica AS-PCR em tempo real para os 307 indivíduos em estudo. Com exceção de um indivíduo do fenótipo C que apresentou genótipo CT, todos os restantes apresentaram genótipo CC (Anexo II).

Como todas as amostras apresentaram perfis semelhantes das curvas de *melting* mostradas anteriormente, foram sequenciadas apenas 3 amostras do fenótipo C (41, 56 e 70) para comprovar os resultados de AS-PCR.

A existência de dois genótipos no fenótipo C (grupo com RD progressiva) levou ao estudo de todos os indivíduos do fenótipo A (grupo controlo).

As frequências genotípicas e alélicas para cada fenótipo encontram-se descritas na Tabela 3.6 e representadas graficamente na Figura 3.28. Tal como no SNP anterior, agora também são apresentadas as frequências dos fenótipos B e C em conjunto (B+C).

Tabela 3.6: Frequências genotípicas e alélicas do ACE_rs4357 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

Fenótipo	Freq. genotípicas (n)		Freq. alélicas (n)	
A	CC: 1,0 (79)	CT: 0	C: 1,0 (158)	T: 0
B	CC: 1,0 (79)	CT: 0	C: 1,0 (158)	T: 0
C	CC: 0,993 (148)	CT: 0,007 (1)	C: 0,997 (297)	T: 0,003 (1)
B+C	CC: 0,996 (227)	CT: 0,004 (1)	C: 0,998 (455)	T: 0,002 (1)

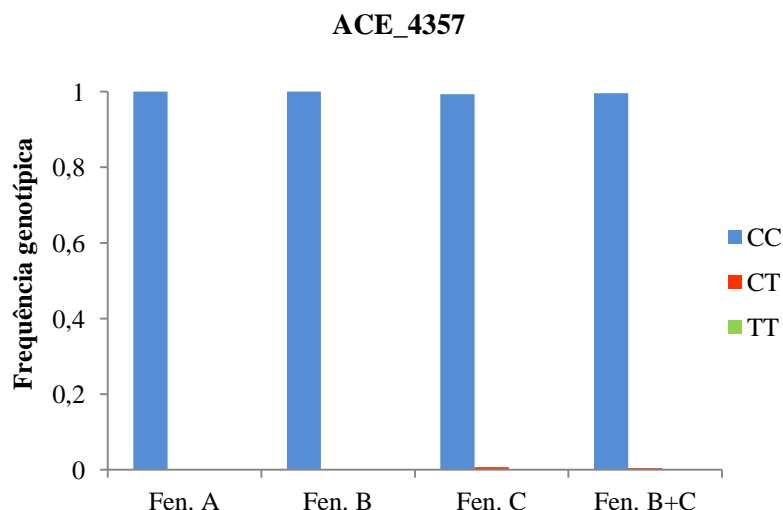


Figura 3.28: Representação gráfica da genotipagem do ACE_rs4357 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

3.2.3.3. rs121912703(C/T), rs113110741(G/C) e rs12720744(C/T)

Os SNPs rs121912703 (C/T), rs113110741 (G/C) e rs12720744 (C/T) do gene ACE não puderam ser genotipados pela técnica de AS-PCR uma vez que a otimização da reação se revelou impossível (Anexo IV – Otimização da técnica AS-PCR). Em alternativa para analisar estes SNPs, efetuou-se sequenciação de Sanger. Dada a sua proximidade espacial (Figura 3.29), estes SNPs podem ser analisados em simultâneo mediante amplificação e sequenciação de um único fragmento (Tabela 2.5). A Figura 3.29 representa a sequência de DNA que engloba estes SNPs: a sublinhado encontram-se as regiões de hibridização dos *primers* para amplificação e sequenciação do respectivo fragmento de DNA e a verde os SNPs rs121912703 (C/T), rs113110741 (G/C) e rs12720744 (C/T), por esta mesma ordem. O SNP rs121912703 (C/T) é exónico (sequência marcada a amarelo) e os outros dois intrónicos.

Na Figura 3.30 está representado o cromatograma de uma das amostras de DNA analisadas (número 18). Esta amostra é homozigótica para o alelo C no SNP rs121912703 (a), o alelo G no SNP rs113110741 (b) e o alelo C no SNP rs12720744 (c).

5'-GTCCTTCTGACTCTGCCTCCCTGTCTCATGCCTCCCCAGGACCGCCATGAAGCTGGGCTTC
 AGTAGGCCGTGGCCGGAAGCCATGCAGCTGATCACGGGCCAGCCCAACATGAGCGCCTCGG
 CCATGTTGAGCTACTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCACGGAGAACGAGCTGCATGGG
 GAGAAGCTGGGCTGGCCGAGTACAACCTGGACGC[C/T]GAACTCCG[G/C]TAC[C/T]GCCACC
 CACCCACCTCCAGCCTTGGGTCTTAACCCCTCCCCAGGCTGGGCAGCCATGCGGCTGACC
 TCGGAGCCTGGCCCTGCCCGCACCTTGCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCATGCTGTCTCC
 TTGCTTCCCGCTCAGCTCGCTCAGAAGGGCCCCTCCCAGACAGCGGCCGCGTCAGCTTCCTG
 GGCCTGGACCTGGATGCGCAGCAGGCCCGCGTGGGCCAGTGGCTGCTGCTCTTCCTGGGCAT
 CGCCCTGCTGGTAGCCACCCTGGGCCTCAGCCAGCGGCTCTTCAGCATCCGCCACCGCAGCC
 TCCACCGCACTCCACAGGGCCCCAGTTCGGCTCCGAGGTGGAGCTGAGACACTCCTGAGGT
 G-3'

Figura 3.29: Sequência nucleotídica do gene ACE que compreende os SNPs rs121912703, rs113110741 e rs12720744 (a verde). A sublinhado: *primers* para amplificação e sequenciação e a marcador amarelo: exão.

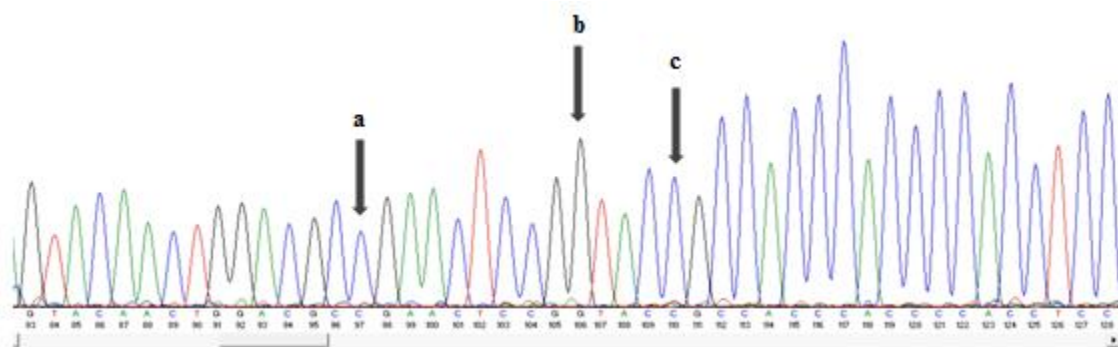


Figura 3.30: Cromatograma da região de interesse do gene ACE obtido por sequenciação de Sanger. A amostra em estudo (número 18) apresenta genótipo CC para o SNP rs121912703 (a), genótipo GG para o SNP rs113110741 (b) e genótipo CC para o SNP rs12720744 (c).

Sequenciaram-se 7 amostras do fenótipo A (88, 92, 95, 96, 101, 105 e 107), 8 do fenótipo B (10, 17, 31, 36, 44, 48, 89 e 90) e 25 do fenótipo C (1, 5, 6, 16, 18, 34, 35, 41, 43, 45, 73, 75, 76, 77, 83, 87, 94, 97, 98, 99, 100, 137, 198, 247 e 264) (Anexo III). As amostras foram selecionadas de forma aleatória entre os mesmos fenótipos, a maioria correspondem ao fenótipo C devido à sua associação com uma progressão rápida da RD. Nas amostras sequenciadas, apenas foram identificados genótipos CC e GG para os rs121912703 e rs113110741, respectivamente. De acordo com a base de dados Ensembl, o alelo C e G são os alelos ancestrais de rs121912703 e rs113110741, respectivamente. Quanto ao rs12720744, dos 40 DNAs sequenciados, 38 apresentaram genótipo CC e 2 genótipo CT (o cromatograma deste genótipo está apresentado mais à frente no ponto 3.3.2.1).

As frequências genóticas e alélicas dos rs121912703, rs113110741 e rs12720744 para cada fenótipo e para B e C em conjunto (B+C) encontram-se descritas na Tabela 3.7 e o gráfico da Figura 3.31 mostra a distribuição genotípica nos respectivos fenótipos (A, B, C e B+C) para os 3 SNPs.

Tabela 3.7: Frequências genóticas e alélicas dos SNPs rs121912703, rs113110741 e rs12720744 do gene ACE nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

ID SNP	rs121912703		rs113110741		rs12720744			
	Freq. genotípica (n)	Freq.alélica (n)	Freq. genotípica (n)	Freq.alélica (n)	Freq. genotípica (n)		Freq.alélica (n)	
A	CC: 1,0 (7)	C: 1,0 (14)	GG: 1,0 (7)	G: 1,0 (14)	CC: 0,86 (6)	CT: 0,14 (1)	C: 0,93 (13)	T: 0,07 (1)
B	CC: 1,0 (8)	C: 1,0 (16)	GG: 1,0 (8)	G: 1,0 (16)	CC: 1,0 (8)	CT: 0	C: 1,0 (16)	T: 0
C	CC: 1,0 (25)	C: 1,0 (50)	GG: 1,0 (25)	G: 1,0 (50)	CC: 0,96 (24)	CT: 0,04 (1)	C: 0,98(49)	T: 0,02 (1)
B+C	CC: 1,0 (33)	C: 1,0 (66)	GG: 1,0 (33)	G: 1,0 (66)	CC: 0,97 (32)	CT: 0,03 (1)	C: 0,98 (65)	T: 0,02 (1)

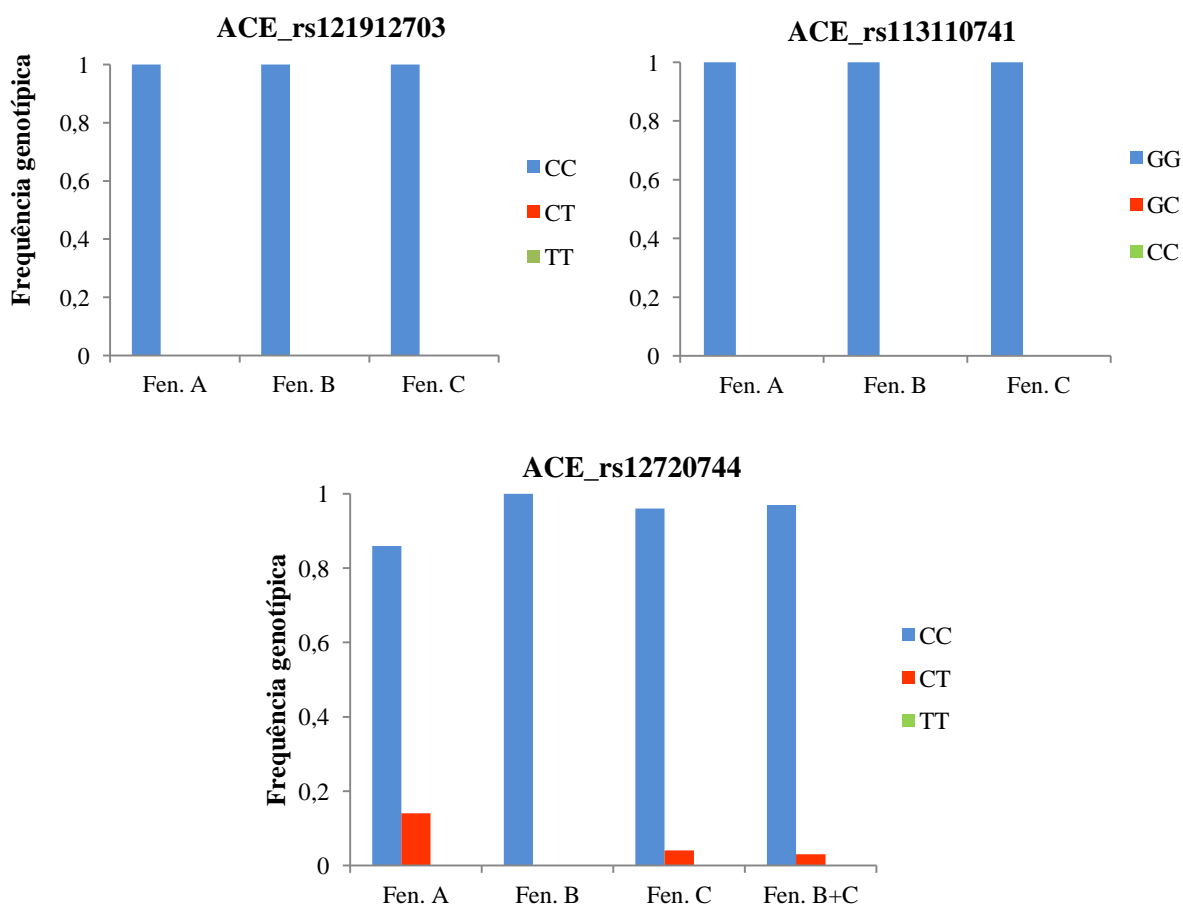


Figura 3.31: Representação gráfica da genotipagem dos SNPs rs121912703, rs113110741 e rs12720744 do gene ACE nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

3.3. Descoberta de outros SNPs nas amostras sequenciadas

Ao efetuar a análise completa do fragmento de DNA, detetou-se a presença de outros SNPs nos genes MTHFR e ACE.

3.3.1. Gene MTHFR

Todos os indivíduos genotipados para o rs72552099 (T/G), descrito em 3.1.2, apresentam genótipo TT. Após a análise pormenorizada das sequências obtidas, para confirmação dos resultados gerados por AS-PCR, foi detetada a presença da alteração rs1801131 (T/G).

A Figura 3.32 representa o fragmento de DNA em análise, do gene MTHFR, onde se encontram os SNPs descritos: a sublinhado, encontram-se as regiões de hibridização dos *primers* para amplificação e sequenciação do fragmento; a negrito, as regiões de hibridização dos *primers* utilizados na técnica de genotipagem AS-PCR; a verde, rs72552099 (T/G); e a vermelho, a nova alteração encontrada (rs1801131 (T/G)). Ambos os SNPs são exônicos (região marcada a amarelo).

5'-CAAGTCACCTGGGAGAGACGGTGAGCTGGCTGGGGCGACCATCAGGTTTGGCACCTGA
GTCCCTCTCACGGCCCCCAACAAAGACCCAGCCTGTCTTTGCCTCCCTAAGCCCTTCCAGGTG
GAGGTCTCCCAACTTACCCTTCTCCCTTTGCCATGTCCACAGCATGGAGGGGAGGGCACAGG
ATGGGGAAGTCACAGCCCCGAGCCTGGCCTGCAGCTGGGGTCAGGCCAGGGGCAGGGGAT
GAACCAGGGTCCCCACTCCAGCATCACTCAC**TTTGTGACCATTCCGGTTTGGTTCTCCCGA**
GAGGTAAAGAACGAAGACTTCAAAGACAC**[T/G]****T****[T/G]****CTTCACTGGTCAGCTCCTCCCCC**
ACATCTTCAGCAGCTCCTCCTTGGGGGACTTGCTCTTCAGGTAGAAGAGGTAGTAGTCCTTC
AG-3'

Figura 3.32: Sequência nucleotídica do gene MTHFR que compreende o SNP rs72552099 (verde) e o rs1801131 (vermelho). A sublinhado: regiões de hibridização dos *primers* para amplificação e sequenciação do fragmento, a negrito: *primers* para AS-PCR e a marcador amarelo: exão.

Apesar do SNP rs1801131 (vermelho) estar na região de hibridização do *primer* AS-PCR *reverse*, não se verificou interferência com a genotipagem e separação dos picos das curvas de *melting* do rs72552099 (T/G), como se pôde verificar nas Figuras 3.11 e 3.13.

3.3.1.1. rs1801131 (T/G)

Os cromatogramas com a identificação dos alelos obtidos para o SNP rs1801131 e também para o rs72552099 encontram-se representados em baixo.

3.3.1.1.1. Genótipo TT

Na Figura 3.33 encontra-se representado um DNA homozigótico para o alelo T do SNP rs1801131 (b) (amostra número 18, fenótipo C).

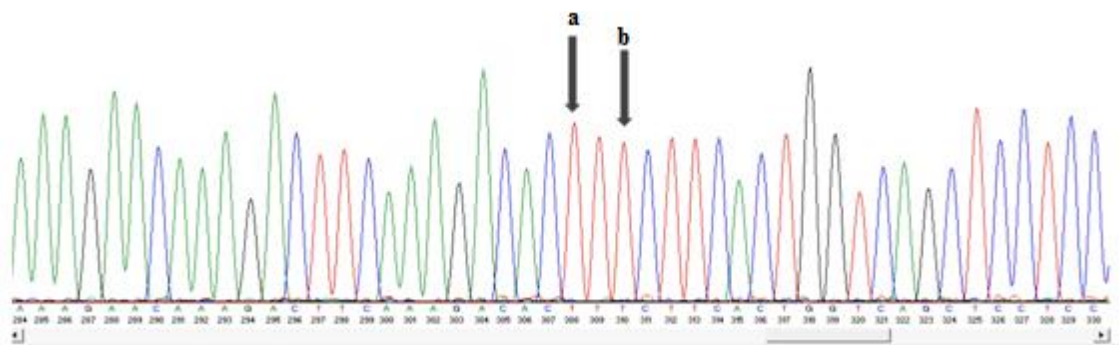


Figura 3.33: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º18 é TT para os SNPs rs72552099 (a) e rs1801131 (b) do gene MTHFR.

3.3.1.1.2. Genótipo GG

A Figura 3.34 ilustra o cromatograma obtido para um DNA homozigótico para o alelo G do SNP rs1801131 (b) (amostra número 137, fenótipo C).

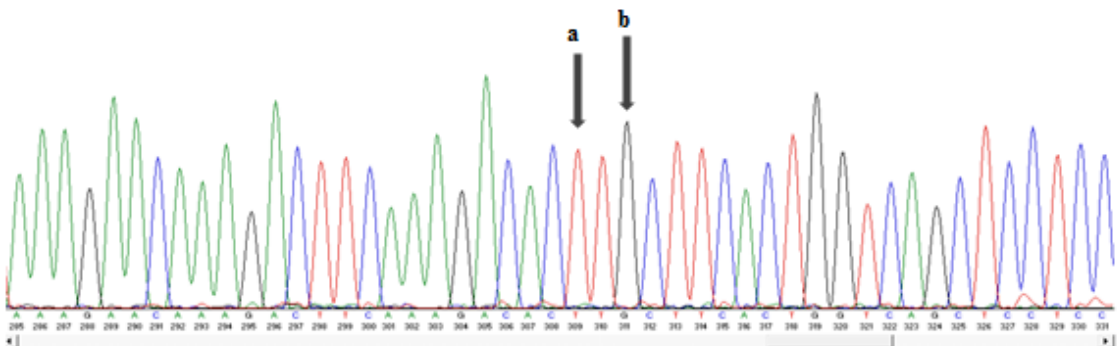


Figura 3.34: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º137 é TT e GG para os SNPs rs72552099 (a) e rs1801131 (b) do gene MTHFR, respetivamente.

3.3.1.1.3. Genótipo TG

Na Figura 3.35 observa-se o cromatograma de um DNA heterozigótico para o SNP rs1801131 (b) (amostra número 35, fenótipo C).

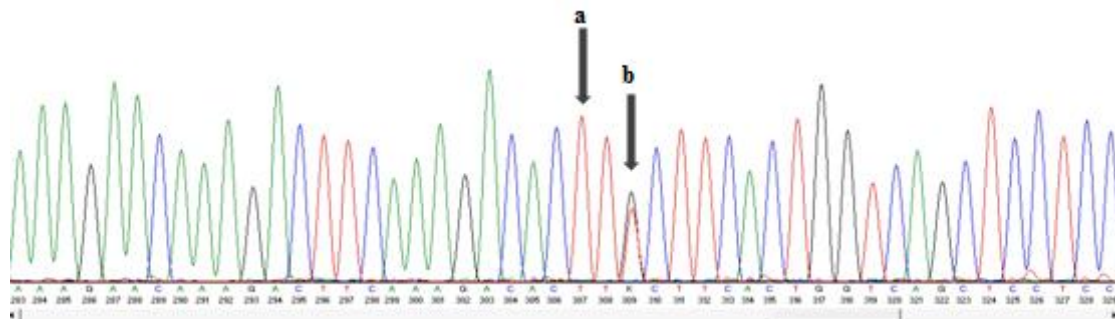


Figura 3.35: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º35 é TT e TG para os SNPs rs72552099 (a) e rs1801131 (b) do gene MTHFR, respetivamente.

Os cromatogramas das Figuras 3.33, 3.34 e 3.35 são representativos dos genótipos obtidos para as restantes amostras sequenciadas: 55, 88, 131 e 283 do fenótipo A, 121, 125, 206 e 209 do fenótipo B e 1, 28, 29, 41, 43, 45, 93, 198, 220, 247 e 264 do fenótipo C (Anexo II).

Verificou-se que o SNP MTHFR_rs1801131 não foi anteriormente genotipado pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], mas é *tagged* SNP de um outro, o MTHFR_rs4846049, estudado por esse sistema. Confirmou-se então, por comparação dos genótipos disponíveis para ambos os SNPs, que estes estão de facto em LD e de acordo com as frequências descritas para a população europeia (Tabela 3.8).

As frequências genóticas e alélicas dos SNPs rs1801131 e rs4846049 para cada fenótipo e para B e C em conjunto (B+C) encontram-se descritas na Tabela 3.9 e os gráficos da Figura 3.36 mostram a distribuição genotípica nos respetivos fenótipos (A, B, C e B+C) para os 2 SNPs.

Tabela 3.8: Descrição dos SNPs MTHFR_rs1801131, identificado por sequenciação, e do MTHFR_rs4846049, genotipado pelo sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®].

Gene	ID SNP	Alteração Transcripto	Frequência Europa	Características	
MTHFR	rs1801131	Glu429Ala (GAA/GCA) ENST00000376592	1000 Genomas: G: 0,322 (244) T: 0,678 (514) GG: 0,108 (41) TG: 0,427 (162) TT: 0,464 (176)	→Mutação não sinónima, envolvida na deficiência de MTHFR, mas não patogénica →Tagged SNP de rs4846049	→Validado por: 1000 Genomas, HapMap →SIFT: <i>Tolerated</i> →PolyPhen: <i>Benign</i>
	rs4846049	c.*372A>C ENST00000376592	1000 Genomas: T: 0,330 (250) G: 0,670 (508) TT: 0,116 (44) TG: 0,427 (162) GG: 0,456 (173)	→ Variante 3' UTR →Tagged SNP: rs1801131	→Validado por: 1000 Genomas, HapMap

Tabela 3.9: Frequências genóticas e alélicas dos SNPs MTHFR_rs1801131 e MTHFR_rs4846049 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

ID SNP	Fenótipo	Freq. genóticas (n)			Freq. alélicas (n)	
		GG	TG	TT	G	T
rs1801131	A	GG: 0,75 (3)	TG: 0,25 (1)	TT: 0	G: 0,875 (7)	T: 0,125 (1)
	B	GG: 1,0 (4)	TG: 0	TT: 0	G: 1,0 (8)	T: 0
	C	GG: 0,43 (6)	TG: 0,21 (3)	TT: 0,36 (5)	G: 0,54 (15)	T: 0,46 (13)
	B+C	GG: 0,55 (10)	TG: 0,17 (3)	TT: 0,28 (5)	G: 0,64 (23)	T: 0,36 (13)
rs4846049	A	GG: 0	TG: 0,25 (1)	TT: 0,75 (3)	G: 0,125 (1)	T: 0,875 (7)
	B	GG: 0	TG: 0	TT: 1,0 (4)	G: 0	T: 1,0 (8)
	C	GG: 0,36 (5)	TG: 0,21 (3)	TT: 0,43 (6)	G: 0,46 (13)	T: 0,54 (15)
	B+C	GG: 0,28 (5)	TG: 0,17 (3)	TT: 0,55 (10)	C: 0,36 (13)	T: 0,64 (23)

Para o rs4846049 não se verificou uma associação entre o genótipo e o fenótipo na análise dos dados de genotipagem realizada no trabalho anterior pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray* e visto que o rs1801131 é seu *tagged* SNP, conclui-se que também este não estará relacionado com a progressão da RD.

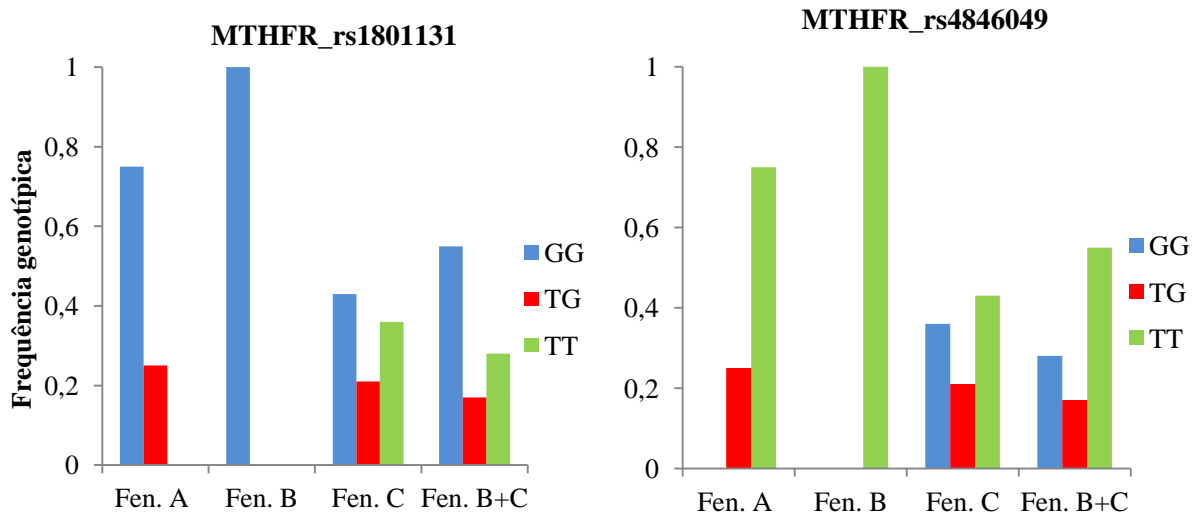


Figura 3.36: Representação gráfica da genotipagem dos SNPs MTHFR_rs1801131 e MTHFR_rs4846049 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

3.3.2. Gene ACE

Quando se procedeu à análise pormenorizada das sequências obtidas para os SNPs do gene ACE (rs121912703 (C/T), rs113110741 (G/C) e rs12720744 (C/T)) foi detetada a ocorrência de outras duas alterações: rs12720743 (-/T) e rs4363 (G/A).

A Figura 3.37 ilustra o fragmento de DNA onde se encontram estes SNPs: a sublinhado, regiões de hibridização dos *primers* para amplificação e sequenciação do fragmento; a verde, os rs121912703, rs113110741 e rs12720744 por esta mesma ordem; e a vermelho, rs12720743 (-/T) e rs4363 (G/A). Apenas o SNP rs121912703 (C/T) é exónico (marcado a amarelo), os restantes são intrónicos.

5'-GTCCTTCTGACTCTGCCTCCCTGTCTCATGCCTCCCCAGGACCGCCATGAAGCTGGGCTTC
AGTAGGCCGTGGCCGGAAGCCATGCAGCTGATCACGGGCCAGCCCAACATGAGCGCCTCGG
CCATGTTGAGCTACTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCACGGAGAACGAGCTGCATGGG
GAGAAGCTGGGCTGGCCGAGTACAACCTGGACGC[C/T]GAACTCCG[G/C]TAC[C/T]GCCACC
CACCCACCTTCCAGCCTTGGGTCTTAACCCCTCCCCAGGCTGGGCAGCCATGCGGCTGACC
TCGGAGCCTGGCCCTGCCCGCACCCCTTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCATGCTGTCTCC
TTGCTTCCC[G/A]CTCAGCTCGCTCAGAAGGGCCCTCCAGACAGCGGCCGCGTCAGCTTCC
TGGGCCTGGACCTGGATGCGCAGCAGGCCCGCGTGGGCCAGTGGCTGCTGCTCTTCCTGGGC
ATCGCCCTGCTGGTAGCCACCCTGGGCCTCAGCCAGCGGCTCTTCAGCATCCGCCACCGCAG
CCTCCACCGCACTCCACGGGCCCCAGTTCGGCTCCGAGGTGGAGCTGAGACACTCCTGAG
GTG-3'

Figura 3.37: Sequência nucleotídica do gene ACE que compreende os SNPs rs121912703, rs113110741, rs12720744 (verde), rs12720743 (-/T) e rs4363 (G/A) (vermelho). A sublinhado: *primers* para amplificação e sequenciação e a marcador amarelo: exão.

3.3.2.2.2. Genótipo AA

A Figura 3.40 representa o cromatograma de uma amostra homocigótica, número 18, para o alelo A (indicado pela seta).

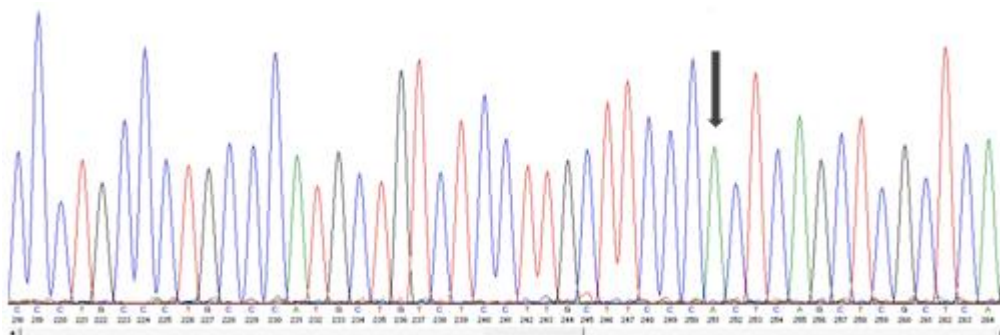


Figura 3.40: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º18 apresenta genótipo AA para o ACE_rs4363.

3.3.2.2.3. Genótipo GA

A Figura 3.41 corresponde ao cromatograma de uma amostra heterocigótica. Na sequência apresentada estão assinalados os alelos G e A, indicado pela seta, do ACE_rs4363 (amostra número 1).

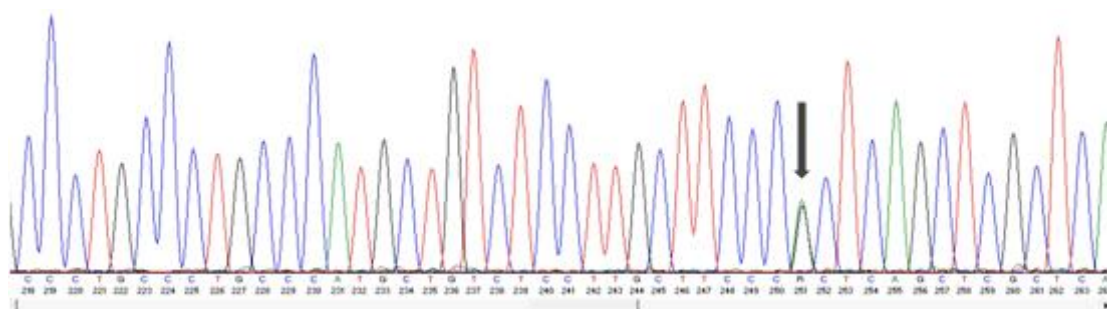


Figura 3.41: Cromatograma obtido por sequenciação de Sanger. A amostra n.º1 apresenta genótipo GA para o ACE_rs4363.

O SNP rs4363 tinha sido genotipado pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], mas o ensaio não gerou resultados satisfatórios. Nenhum dos SNPs, no gene ACE, genotipados pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] está em LD com estes dois SNPs.

O rs4363 pode ser um SNP interessante porque, embora seja intrónico, está localizado numa zona de *splicing* (6 bases afastado do exão). As características de cada um dos SNPs encontram-se reunidas na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Descrição dos SNPs ACE_rs12720743 e ACE_rs4363 identificados por sequenciação.

Gene	ID SNP	Alteração Transcripto	Frequência Europa	Características	
ACE	rs12720743	c.3691+21delT – ENST00000290866	1000 Genomas: -: 0,007 (5) T: 0,993 (753) -/T: 0,013 (5) TT: 0,987 (374)	→Intrónico	→Validado por: 1000 Genomas
	rs4363	c.3692-6G>A – ENST00000290866	1000 Genomas: A: 0,441 (334) G: 0,559 (424) AA: 0,198 (75) AG: 0,485 (184) GG: 0,317 (120)	→Intrónico, local de <i>splicing</i>	→Validado por: 1000 Genomas, HapMap

Os genótipos dos SNPs rs12720743 e rs4363 para as amostras sequenciadas: 88, 92, 95, 96, 101, 105, 107 do fenótipo A, 10, 17, 31, 36, 44, 48, 89, 90 do fenótipo B e 1, 5, 6, 16, 18, 34, 35, 41, 43, 45, 73, 75, 76, 77, 83, 87, 94, 97, 98, 99, 100, 137, 198, 247, 264 do fenótipo C, encontram-se no Anexo III.

As frequências genóticas e alélicas dos SNPs ACE_rs12720743 e ACE_rs4363, para cada fenótipo e para B e C em conjunto (B+C), encontram-se descritas nas Tabelas 3.11 e 3.12, respetivamente. Os gráficos das Figuras 3.42 e 3.43 mostram a distribuição genotípica nos respetivos fenótipos (A, B, C e B+C) para os 2 SNPs.

Tabela 3.11: Frequências genóticas e alélicas do ACE_rs12720743 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

Fenótipo	Freq. genóticas (n)		Freq. alélicas (n)	
A	TT: 0,86 (6)	-/T: 0,14 (1)	T: 0,93 (13)	-: 0,07 (1)
B	TT: 1,0 (8)	-/T: 0	T: 1,0 (16)	-: 0
C	TT: 0,96 (24)	-/T: 0,04 (1)	T: 0,98 (49)	-: 0,02 (1)
B+C	TT: 0,97 (32)	-/T: 0,03 (1)	T: 0,98 (65)	-: 0,02 (1)

Tabela 3.12: Frequências genotípicas e alélicas do ACE_rs4363 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

Fenótipo	Freq. genotípicas (n)			Freq. alélicas (n)	
	GG: 0,29 (2)	AA: 0,14 (1)	GA: 0,57 (4)	G: 0,8 (8)	A: 0,60 (6)
A	GG: 0,125 (1)	AA: 0	GA: 0,875 (7)	G: 0,56 (9)	A: 0,44 (7)
B	GG: 0,32 (8)	AA: 0,24 (6)	GA: 0,44 (11)	G: 0,54 (27)	A: 0,46 (23)
B+C	GG: 0,27 (9)	AA: 0,18 (6)	GA: 0,55 (18)	G: 0,55 (36)	A: 0,45 (30)

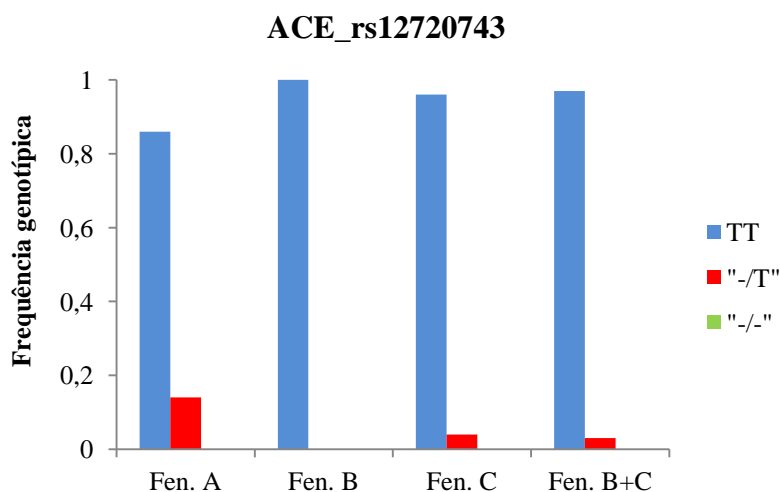


Figura 3.42: Representação gráfica da genotipagem do ACE_rs12720743 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

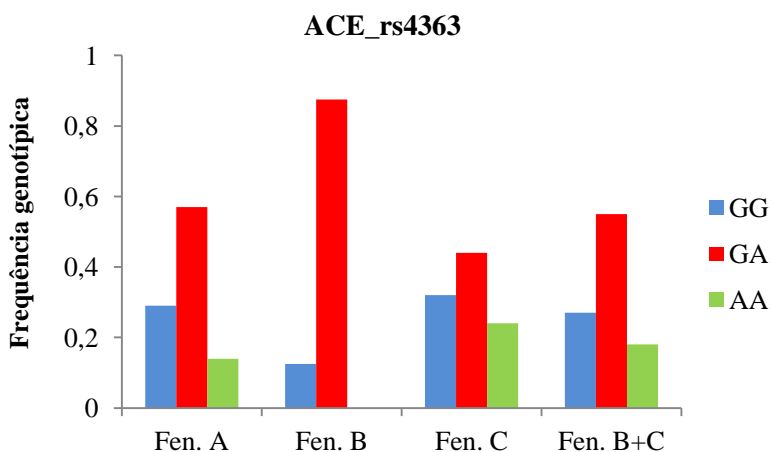


Figura 3.43: Representação gráfica da genotipagem do ACE_rs4363 nos indivíduos correspondentes aos fenótipos A, B, C e B+C.

Apesar do reduzido número de doentes genotipados para ambos os SNPs, os resultados encontrados poderão vir a ser interessantes, pelo que numa próxima fase fará sentido alargar o estudo dos SNPs rs12720743 e rs4363 aos restantes indivíduos selecionados.

Capítulo 4

Discussão

O presente estudo foi efetuado no seguimento de um trabalho realizado no laboratório que envolveu a análise de 172 SNPs, selecionados por seleção manual e por ferramentas bioinformáticas a partir de 11 genes candidatos, pelo sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®]. A genotipagem dos SNPs foi efetuada em 307 diabéticos do tipo 2 com retinopatia diabética divididos em 3 fenótipos: A - indivíduos com RD não progressiva (grupo controlo), B - indivíduos com RD intermédia entre os fenótipos A e C, e C - indivíduos com RD agressiva e de progressão rápida. O principal objetivo consistiu na identificação de marcadores genéticos associados com o desenvolvimento dos fenótipos mais agressivos (B e C) de modo a poder correlacioná-los com a doença. No presente trabalho pretendeu-se alargar o estudo anterior a alguns SNPs que não foram possíveis de genotipar pela técnica acima mencionada, por se localizarem em regiões complexas do gene, impossibilitando o desenho de ensaios para o método em causa. Assim, os SNPs NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs8075924, ACE_rs4357, ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 e ACE_rs12720744 foram propostos genotipar com a técnica *Allele-Specific PCR* num sistema de PCR em tempo real com *MeltDoctor*, um método também rápido e mais económico que ultrapassou a desvantagem da técnica anterior. A genotipagem pela técnica AS-PCR só foi possível após uma longa série de otimizações, nomeadamente no desenho de *primers* específicos, quantidade de *primers* e condições ótimas de PCR. Esta análise foi, posteriormente, complementada com sequenciação pelo método de Sanger de algumas amostras para confirmação dos resultados obtidos por AS-PCR. A genotipagem começou sempre pelos indivíduos dos fenótipos B e C, relacionados com a progressão da RD, e quando mais que um genótipo era identificado estendeu-se aos indivíduos do fenótipo A (grupo controlo).

Apenas foi possível otimizar os ensaios de genotipagem pela técnica AS-PCR para os SNPs NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs8075924, ACE_rs4357. Os SNPs do gene NOS1 e MTHFR foram genotipados somente nos fenótipos B e C, e os SNPs do gene ACE nos 3 fenótipos. Devido às regiões altamente complexas do gene onde os SNPs se localizavam, isto é, devido à proximidade entre SNPs, os ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 e ACE_rs12720744 não foram estudados por esta técnica, mas sim por sequenciação de Sanger em 40 indivíduos (7 do fenótipo A, 8 do fenótipo B e 25 do fenótipo C). Ao proceder-se à análise pormenorizada das sequências de Sanger geradas para confirmar

resultados obtidos pela técnica AS-PCR ou para genotipar os SNPs mencionados, foram identificados 3 outros SNPs: MTHFR_rs1801131, ACE_rs12720743 e ACE_4363.

Relativamente à associação de cada SNP estudado com a progressão da RD esta está discutida de seguir.

4.1. Análise dos resultados de AS-PCR e sequenciação de Sanger

4.1.1. Gene NOS1

As alterações rs77074921 e rs76839820 localizam-se em exões do gene NOS1 e correspondem a mutações não sinónimas, ou seja, a troca do nucleótido leva à alteração do aminoácido correspondente, o que pode levar a consequências estruturais e funcionais na proteína codificada [115]. O rs77074921 (CGC/TGC) corresponde à troca de uma arginina, um aminoácido polar básico (com carga positiva), por uma cisteína, um aminoácido polar neutro, de estrutura mais pequena [146, 147]. O rs76839820 (ACG/ATG) corresponde à troca de uma treonina, um aminoácido polar neutro e, por isso, pequeno, que possui um grupo hidroxilo muito reativo, por uma metionina, um aminoácido apolar, não reativo [146, 147]. Devido à não reatividade da metionina, as pontes de hidrogénio que a treonina (aminoácido reativo) pode formar com um vasto leque de substratos polares está comprometida [147]. De acordo com a base de dados Ensembl, as alterações possuem o grau de patogenicidade de *deleterious* e *probably damaging* previstas pelo *software* SIFT e Polyphen, respetivamente, ou seja, apresentam um forte potencial patogénico para os SNPs. Assim, de acordo com as suas propriedades e com a previsão de patogenicidade, estas alterações de aminoácido podem ter um grande impacto na estrutura e função da proteína.

Para as duas alterações (rs77074921 e rs76839820), a base de dados Ensembl não possui quaisquer dados de frequência em nenhuma população, concluindo-se que não existem estudos das mesmas ou então que os estudos efetuados não são significativos para entrarem para esta base de dados.

No presente trabalho, o resultado da genotipagem mostrou que estes SNPs são monomórficos, ou seja, todos os indivíduos analisados apresentam o mesmo genótipo pelo que não há evidências diretas da sua associação com a progressão da RD, uma vez

que não foi analisado o grupo controle. A falta de frequências na base de dados e da referência destes SNPs na literatura sugerem que não há estudos feitos ou pelo menos que não se encontrou, até à data, qualquer associação deles com a retinopatia, embora se tenha conhecimento que num estado precoce da RD o NO, produzido através da ação da NOS1, está envolvido na leucostase e quebra da barreira hemato-retiniana pela ativação de ICAM-1 e, portanto, alguns SNPs do NOS1 que afetem a conformação ou atividade da sintase poderão estar associados a estes fenómenos [9].

4.1.2. Gene MTHFR

O rs72552099 (AGT/CGT), localizado no gene MTHFR, é uma alteração exónica que corresponde a uma mutação não sinónima, em que ocorre a troca de uma serina, um aminoácido polar neutro, com as mesmas propriedades da treonina, por uma arginina, um aminoácido polar básico [146, 147]. Esta alteração possui o grau de patogenicidade de *deleterious* e *benign* prevista pelo SIFT e Polyphen, respetivamente, ou seja, o potencial patogénico para este SNP é um pouco menor que para os anteriores, pelo que se conclui que a alteração do aminoácido na proteína não deve afetar de forma significativa a sua função.

Na base de dados Ensembl esta alteração também não possui dados de frequência em nenhuma população. No entanto, este SNP foi estudado também pela Universidade de Stanford, a única indicação de frequências descrita.

A genotipagem por AS-PCR também revelou o rs72552099 como monomórfico, e visto que também não são encontrados mais estudos com este SNP, não há evidências da sua associação com a progressão da RD.

O rs1801131, encontrado neste estudo pela análise das sequências de Sanger, também está presente no gene MTHFR e corresponde a uma mutação não sinónima. A alteração (GAA/GCA) corresponde à troca de um glutamato, um aminoácido polar ácido (com carga negativa), por uma alanina, um aminoácido apolar, de tamanho reduzido, [146, 147]. De acordo com as propriedades dos aminoácidos, a alteração poderia trazer consequências para a proteína, mas apenas possui o grau de patogenicidade de *tolerated* e *benign* pelos *softwares* SIFT e Polyphen, respetivamente.

No entanto, esta mutação está descrita como envolvida na deficiência da proteína MTHFR, na esquizofrenia, embora não sendo considerada patogénica.

Na base de dados Ensembl esta alteração possui dados de frequência para a população europeia registada em estudos efetuados no Projeto dos 1000 Genomas (Tabela 3.8) e no Projeto Internacional HapMap, cujos dados são concordantes com os presentes neste trabalho, ou seja, para a população portuguesa (Tabela 3.9).

O rs1801131 é *tagged* de um SNP anteriormente analisado pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] (rs4846049). O rs4846049 situa-se na região 3'UTR (c.*372A>C), está descrito na base de dados Ensembl como tendo o rs1801131 como *tagged*-SNP, possui dados de frequência para a população europeia semelhantes com os do rs1801131 em estudos também efetuados no Projeto dos 1000 Genomas (Tabela 3.8) e no Projeto Internacional HapMap. Pela análise das respetivas frequências alélicas e genóticas nos doentes de RD em estudo, confirmou-se que estes SNPs estão de facto em *linkage* (Tabela 3.9). Para o rs4846049 não se verificou uma associação entre o genótipo e o fenótipo na análise dos dados de genotipagem realizada no trabalho anterior, pelo que a mesma conclusão pode ser tirada para o rs1801131.

A produção deficiente da proteína MTHFR pode ser causada por alterações na sequência do gene [96]. A atividade diminuída desta proteína leva à diminuição de folato que é utilizado na remetilização de homocisteína em metionina [91, 93, 94, 96, 97]. Deste modo a homocisteína concentra-se no plasma em quantidades elevadas e a metionina, necessária para a síntese de proteínas, é claramente produzida em menor quantidade [94, 97]. A hiperhomocisteinémia em diabéticos tem sido de certa forma, relacionada com a RD [3, 90, 98]. Neste sentido, o polimorfismo C677T (Ala222Val) (rs1801133), descoberto por Frosst *et al.*, em 1995, foi descrito como um dos responsáveis por prejudicar a atividade da MTHFR, estando associado a hiperhomocisteinémia leve [93, 97-100, 148]. Num estudo feito com indivíduos diabéticos do tipo 2 na população Japonesa, este polimorfismo foi confirmado como um fator de risco para a RD em condições de hiperglicémia, posteriormente comprovado para outras populações [93, 98]. A atividade diminuída desta proteína leva também ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, como se comprovou, na população chinesa, pela presença do rs4846049, e os rs1801131 e rs1801133 foram associados com problemas cerebrais [100, 149, 150].

4.1.3. Gene ACE

Os SNPs rs8075924 e rs4357 são alterações intrônicas (c.1970-1525C>T e c.3282-103C>T, respetivamente), do gene ACE. A base de dados Ensembl apresenta dados de frequência para a população europeia registada em estudos efetuados no Projeto dos 1000 Genomas (Tabela 3.1) e no Projeto Internacional HapMap. Os valores apresentados encontram-se concordantes com as frequências obtidas neste trabalho (Tabela 3.5 e Tabela 3.6).

Pelos resultados de AS-PCR, estudado em todos os indivíduos dos fenótipos A, B e C, no presente trabalho registou-se a presença dos 3 genótipos no rs8075924 mas, apesar disso, as frequências alélicas e genótípicas obtidas, igualmente distribuídas pelos 3 fenótipos, sugerem que este SNP não é relevante para a progressão da doença. Para o rs4357 observou-se a ocorrência de uma amostra CT no fenótipo mais agressivo (CC = 0,993 e CT = 0,007), o que num estudo com um maior número de indivíduos poderá demonstrar-se interessante.

O rs121912703 (CCG/CTG), uma alteração exónica localizada no gene ACE corresponde a uma mutação não sinónima que ocorre pela troca de uma prolina por uma leucina. Ambos os aminoácidos são apolares, não reativos e raramente envolvidos na função da proteína [146, 147]. Assim, a probabilidade de alterações na função da proteína é mais reduzida, mas como a prolina é mais pequena que a leucina, a estrutura da proteína ACE poderá ser afetada, tal como está indicado pelo grau de patogenicidade de *tolerated* e *probably damaging* pelos softwares SIFT e PolyPhen, respetivamente [147]. Este resultado poderá indicar um potencial patogénico para o SNP.

Esta alteração não possui quaisquer dados de frequência em nenhuma população nem se encontra validado por nenhuma entidade, como se pode verificar na base de dados Ensembl. É também reportada a informação clínica para este SNP cuja alteração é considerada patogénica com aumento da proteína ACE no soro, contudo não se encontra referida na literatura.

No entanto, pela análise dos resultados apresentados no presente trabalho este SNP é monomórfico, e desta forma não há evidências de associação com a progressão da RD. Visto que está descrito a sua associação com o aumento de ACE (no Ensembl), será importante alargar a genotipagem deste SNP a mais indivíduos, pois aqui apenas

foram estudadas 40 amostras de DNA (7 do fenótipo A, 8 do fenótipo B e 25 do fenótipo C).

O rs113110741 localizado num intrão (c.3691+1G>C) do gene ACE, situa-se num local de *splicing* essencial, uma base afastado do exão, um lugar chave para ocorrer alteração da expressão da proteína. Para além da base de dados Ensembl não possuir quaisquer dados de frequência em nenhuma população para este SNP, nem se encontrar validado por nenhuma entidade, os resultados da sequenciação deste trabalho apresentam-no como monomórfico pelo que poderá não ser associado à progressão da RD.

Os SNPs rs12720744 e rs4363 são alterações intrónicas 5 bases afastada do exão (c.3691+5C>T) e 6 bases afastada do exão (c.3692-6G>A), respetivamente, no gene ACE. Estas alterações situam-se também num local de *splicing*. Na base de dados Ensembl estes SNPs possuem dados de frequência para a população Europeia registada em estudos efetuados no Projeto dos 1000 Genomas (rs12720744 – Tabela 3.1 e rs4363 – Tabela 3.10), cujos dados são concordantes com os obtidos no presente trabalho (rs12720744 – Tabela 3.7 e rs4363 – Tabela 3.12).

Neste trabalho, o rs12720744, para os fenótipos B+C, apresenta uma frequência de 0,97 de genótipo CC (32 amostras) e 0,03 de genótipo CT (1 amostra), mas como em 7 amostras do fenótipo A uma amostra tem o genótipo CT, a presença do alelo T poderá não estar associada à progressão da RD.

Ainda assim, a genotipagem dos restantes indivíduos será necessária para melhor compreender o eventual envolvimento de rs12720744 e rs4363 na doença por estarem localizados num local de *splicing*, o que pode alterar a expressão da proteína ACE.

O rs12720743, localizado num intrão (c.3691+21delT) do gene ACE, corresponde a uma deleção do nucleótido T. Na base de dados Ensembl esta alteração possui dados de frequência para a população europeia registada em estudos efetuados no Projeto dos 1000 Genomas (Tabela 3.10), cujos dados são concordantes com os obtidos neste trabalho (Tabela 3.11). É de referir ainda que apenas está registada esta alteração para 1% da população Europeia e para 12% da população Africana.

Esta proteína (ACE), como foi anteriormente referido, tem um papel importante na regulação da pressão sanguínea pelo RAS, desencadeando alterações no olho quando os seus níveis são mais elevados e conseqüentemente leva ao desenvolvimento de RD e as alterações encontradas poderão estar envolvidas na alteração da proteína [16, 19, 23, 27, 38, 39, 47].

4.2. Técnica AS-PCR

A técnica de AS-PCR, apesar de elegante, veio a revelar-se bastante complexa e passível de otimização extensa ensaio a ensaio, o que sugere ser uma técnica de aplicação limitada.

O desenho de *primers* é fundamental para a obtenção de bons resultados. Por exemplo, estes devem ser desenhados com um *mismatch* na penúltima ou antepenúltima (-2 ou -3, respetivamente) base da extremidade 3'. Em estudos realizados anteriormente já tinha sido feita a comparação dos resultados obtidos com *primers* em cada uma destas posições, tendo sido registada preferência pelo *mismatch* na antepenúltima base devido ao aumento de especificidade e sensibilidade assinaladas, em relação ao *mismatch* na penúltima base (Hézar *et al.* em 1997). No entanto, não foi registada qualquer preferência em relação à posição do *mismatch*, em estudos feitos por Birdsell *et al.* em 2012, pois obteve-se resultados semelhantes com o *mismatch* nas diferentes posições [133, 151]. No presente trabalho também não é possível definir uma posição preferencial do *mismatch* nos *primers*, pois uns SNPs geraram melhores resultados com uma alteração e outros com outra (Tabela 2.2).

Outra característica a ter em conta quando os *primers* são desenhados é a cauda GC na sua extremidade 5' que não pode ter mais de 15 bases para não interferir na sua hibridização com o molde; a diferença máxima de 2°C entre a T_m dos *primers*; a diferença igual ou superior a 3°C na T_m dos amplicões para que seja perceptível a separação dos picos das curvas de *melting* referentes a cada um dos alelos e a concentração dos *primers* entre 0,1 e 0,2µM, sendo fundamental uma maior concentração do *primer* comum, que dos específicos, nas reações de PCR efetuadas no mesmo poço de reação.

Neste trabalho foram utilizados nas reações de genotipagem 1ng/µL de DNA molde para os SNPs NOS1_rs77074921, MTHFR_rs72552099, ACE_rs8075924 e

ACE_rs4357, e entre 0,5ng/μL e 0,75ng/μL de DNA para o NOS1_rs76839820; os fragmentos usados como controlos positivos nem sempre geraram o mesmo perfil das curvas de *melting* que os DNAs das amostras, talvez pela quantidade elevada de fragmentos de controlo utilizada, pelo que, nestes casos, a sequenciação das amostras por Sanger foi fundamental. Todos os SNPs foram analisados em reações com os *primers* específicos, para cada um dos alelos sob estudo, e o *primer* comum no mesmo tubo, o que aumenta a fiabilidade dos dados gerados e diminui o tempo e os custos associados à utilização da técnica.

Para além destas vantagens existem outras, como a obtenção dos resultados imediatamente após a PCR sem ser necessário manipular o produto em eletroforeses ou com enzimas de restrição, evitando assim contaminações.

Estas vantagens contrastam com o tempo e custos despendidos nas reações de otimização, realizadas de forma individual e específica para cada SNP e embora se tenha conseguido otimizar a técnica para a maioria dos SNPs considerados inicialmente, não foi possível otimizá-la para 3 deles devido à zona complexa em que se situavam no gene (Figura 3.29): ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 e ACE_rs12720744. Estes SNPs, como se situam muito próximos entre si no gene, para genotipar o rs113110741 tinham que se desenhar *primers* numa zona da sequência que incluía o rs121912703, no caso do *primer* específico ser o *forward* e o rs12720744 no caso do *primer* específico ser o *reverse*, o que poderia não produzir resultados se estivessem presentes as duas alterações nas diferentes amostras dos doentes. Para além disso, os *primers* específicos que se conseguiram desenhar para rs121912703 e rs12720744, também não produziram resultados válidos, pois a sequência que circunda os SNPs é muito rica em conteúdo GC.

4.3. Perspetivas futuras

Como perspectivas para um próximo trabalho poder-se-ão apontar:

1. Aumentar o número de indivíduos em estudo para genotipagem dos SNPs ACE_rs12720744, ACE_rs12720743 e o ACE_rs4363, pois foram somente analisados em 40 doentes.

2. Associar os dados obtidos no presente trabalho com as outras alterações descritas no projeto relativamente à doença, de modo a clarificar se várias alterações em conjunto conduzem ao aumento da expressão dos genes implicados no desenvolvimento e progressão da RD.

3. Comprovar o efeito das novas alterações encontradas no presente trabalho, através de mutantes dos genes aqui referidos, para ver o efeito na proteína, num organismo modelo como, por exemplo, o rato, muito utilizados neste tipo de doenças, ou fazer expressão no peixe-zebra adulto, que possui uma vasculatura retinal semelhante à dos humanos, ou em *Drosophila melanogaster*.

Capítulo 5

Conclusão

No presente trabalho foram estudados um total de 11 SNPs de 3 genes (NOS1, MTHFR e ACE) em 307 diabéticos do tipo 2 com RD divididos em 3 fenótipos (A - indivíduos com RD não progressiva (grupo controlo), B - indivíduos com RD intermédia entre os fenótipos A e C, e C - indivíduos com RD agressiva e de progressão rápida) com o objetivo de perceber a associação das alterações com o desenvolvimento da doença.

Os SNPs NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820 e MTHFR_rs72552099 foram genotipados pela técnica *Allele-Specific* PCR num sistema de PCR em tempo real com *MeltDoctor*. No entanto, apenas foi possível estudar por sequenciação de Sanger os SNPs ACE_rs121912703, ACE_rs113110741 e ACE_rs12720744, pois a sua proximidade no gene impossibilitou o desenho de *primers*, bem como os SNPs MTHFR_rs1801131, ACE_rs12720743 e ACE_rs4363, que não estavam inicialmente selecionados para estudo, mas foram detetados quando se procedeu à análise das sequências de Sanger.

Os resultados deste estudo mostraram que os SNPs NOS1_rs77074921, NOS1_rs76839820, MTHFR_rs72552099, ACE_rs121912703 e ACE_rs113110741 são monomórficos, ou seja, todos os indivíduos analisados apresentam o mesmo genótipo, o que é indicativo da falta de associação destes SNPs com a progressão da RD. Para o ACE_rs8075924 observou-se a presença dos 3 genótipos. Contudo, as frequências alélicas e genotípicas obtidas encontram-se igualmente distribuídas pelos 3 fenótipos, sugerindo que este polimorfismo não é relevante para a progressão da RD.

Pela análise das frequências alélicas e genotípicas foi possível confirmar que o SNP MTHFR_rs1801131 é *tagged* do MTHFR_rs4846049, anteriormente genotipado pelo sistema *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] e não associado com a RD, indicando assim a ausência de associação do MTHFR_rs1801131 na progressão da doença.

O ACE_rs4357 apresentou uma amostra com genótipo CT no fenótipo C em 307 indivíduos estudados. O ACE_rs12720744 também apresentou um indivíduo heterozigótico nesse fenótipo, embora também tenha surgido um indivíduo heterozigótico no fenótipo A num total de 40 DNAs genotipados. Para os SNPs ACE_rs12720743 e ACE_rs4363 não se verificou uma distribuição equiparada pelos 3 fenótipos. Assim sendo, estes SNPs poderão revelar alguma associação com a progressão da RD, após o estudo com um número mais alargado de indivíduos.

Relativamente à técnica AS-PCR, esta revelou-se morosa para a genotipagem dos SNPs, pois o primeiro passo da sua aplicação foi o extenso trabalho de otimização

realizado SNP a SNP (Anexo IV – Optimização da técnica AS-PCR). Ainda assim, esta técnica não permitiu a genotipagem de todos os SNPs em alternativa ao sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], pois para alguns SNPs não foi possível desenhar *primers* que amplificassem a região onde estes se localizavam, tendo de se recorrer à sequenciação de Sanger para a sua genotipagem, sendo esta um método mais dispendioso.

Referências

bibliográficas

1. Ashcroft F. M. & Rorsman, P. (2012). Diabetes *mellitus* and the β cell: the last ten years. *Cell* **148**:1160-1171.
2. Correia, L. G., Boavida, J. M., Fragoso de Almeida, J. P., Cardoso, S. M., Dores, J., Duarte, J. S., Duarte, R., Ferreira, H., Guerra, F., Medina, J. L., Nunes, J. S. Pereira, M., Raposo, J. (2013). Diabetes: factos e números 2012 - Relatório anual do observatório nacional da diabetes, Portugal. Lisboa, 2013. pp.1-64.
3. Errera, F.I.V., Silva, M.E.R., Yeh, E., Maranduba, C.M.C., Folco, B., Takahashi, W., Pereira, A.C., Krieger, J.E., & Passos-Bueno, M.R. (2006). Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. APOE, MTHFR and diabetic retinopathy *Braz J Med Biol Res* **39**:883-888.
4. American diabetes association (2013). Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. *Diabetes care* **36**:S67-S74.
5. Ulbig, M. R. W. & Hamilton, A. M. P. (1993). Factors influencing the natural history of diabetic retinopathy. *Eye* **7**:242-249.
6. Uthra, S., Raman, R., Mukesh, B. N., Kumari, R. P., Sharma, T., McCarty, C. & Kumaramanickavel, G. (2008). Genetics of diabetic retinopathy. *Int J Hum Genet* **8(1-2)**:155-159.
7. Olho humano (Fonte: www.ifi.unicamp.br). [Internet] Disponível em <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-olho-humano/olho-humano.php>>. [Consult. 12 de Maio 2013].
8. Mende, L. (2011). Olho humano – estrutura do olho humano. [Internet] Disponível em <<http://www.klimanaturali.org/2011/03/olho-humano-estrutura-do-olho-humano.html>>. [Consult. 12 de Maio 2013].
9. Leal, E. C., Manivannan, A., Hosoya, K-I., Terasaki, T., Cunha-Vaz, J., Ambrósio, A. F. & Forrester, J. V. (2007). Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48(11)**: 5257–5265.
10. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**:129-146.
11. Liew, G., Klein, R. & Wong, T. Y. (2009). The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* **49(2)**:35–52.
12. Vinita, K., Sripriya, S., Prathiba, K., Vaitheeswaran, K., Sathyabaarathi, R., Rajesh, M., Amali, J., Umashankar, V., Kumaramanickavel, G., Pal, S. S., Raman, R. & Sharma, T. (2012). ICAM-1 K469E polymorphism is a genetic determinant for the clinical risk factors of T2D subjects with retinopathy in Indians: a population-based case–control study. *BMJ Open* **0**:e001036.
13. Adamis, A. P, & Berman, A. J. (2008). Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* **30**:65–84.
14. Joussen, A. M., Doehmen, S., Le, M. L., Koizumi, K., Radetzky, S., Krohne, T. U., Poulaki, V., Semkova, I. & Kociok, N. (2009). TNF- α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis* **15**:1418-1428.
15. Hanis, C. L. & Hallman, D. M. (2006). Genetics of diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reports* **6**:155–161.
16. Wright A. D. & Dodson P. M. (2010). Diabetic retinopathy and blockade of the renin–angiotensin system: new data from the DIRECT study programme. *Eye* **24**:1-6.
17. Huang, S. P., Palla, S., Ruzycski, P, Varma, R. A., Harter, T., Reddy, G. B. & Petrash, J. M. (2010). Aldo-Keto reductases in the Eye. *Journal of Ophthalmology* **2010**:1-6.

18. Human eye. Webvision, The Organization of the Retina and Visual System. [Internet] <<http://webvision.med.utah.edu/imageswv/Sagschem.jpeg>>. [Consult. 12 de Maio 2013].
19. Matsumoto, A., Iwashima, Y., Abiko, A., Morikawa, A., Sekiguchi, M., Eto, M. & Makino, I. (2000). Detection of the association between a deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and advanced diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* **50**:195-202.
20. Kohner, E. M. (1993). The effect of diabetic control on diabetic retinopathy. *Eye* **7**: 309-311.
21. Stewart, J. M., Coassin, M., Schwartz, D. M. (2009). Chapter 29 – Diabetic Retinopathy. [Internet] Disponível em <<http://www.endotext.org/diabetes/diabetes29/diabetesframe29.htm>>. [Consult. 19 de Fevereiro 2013].
22. Van Geest, R. J., Klaassen, I., Vogels, I. M. C, Van Noorden, C. J. F., & Schlingemann, R. O. (2010). Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy? *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51(4)**:1857–1865.
23. Rabensteiner, D., Abrahamian, H., Irsigler, K., Hermann, K. M., Kiener, H. P., Mayer, G., Kaider, A., Prager, R. (1999). ACE gene polymorphism and proliferative retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **22(9)**:1530–1535.
24. Leal, E. C., Ambrósio, A. F. & Cunha-Vaz, J. (2012). Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Chapter 26 - Nitric oxide synthase in retinal vascular diseases. *Human Press* pp.529-544.
25. Dr. Tango (2012). Diabetes y enfermedad ocular. *MedlinePlus, Información de salud para usted*. [Internet] Disponível em <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001212.htm>>. [Consult. 27 de Abril 2013].
26. Dr. Tango (2012). Problemas de la visión. *MedlinePlus, Información de salud para usted*. [Internet] Disponível em <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003029.htm>> [Consult. 27 de Abril 2013].
27. Verma, A., Shan, Z., Lei, B., Yuan, L., Liu, X., Nakagawa, T., Grant, M. B., Lewin, A. S., Hauswirth, W. W., Raizada, M. K. & Li, Q. (2012). ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Mol Ther* **20(1)**:28-36.
28. Gardner, T. W. & Antonetti, D. A. (2007). A prize catch for diabetic retinopathy. *Nat Med* **13(2)**:131–132.
29. Ai, H. & Song, H. P. (2012). Different expression pattern of serum soluble intercellular adhesion molecules -1 and neutrophilic expression of CD18 in patients with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* **5(2)**:202-207.
30. Ren, Z., Li, Wei., Zhao, Q., Ma, L. & Zhu, J. (2012). The impact of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on the expressions of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β_1 in the retinas of rats with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **98**:474-480.
31. O que é a Retinografia. *Lotten Eye* (2013). [Internet] Disponível em <<http://www.lotteneyes.com.br/exames-retinografia/>> [Consult. 27 de Abril 2013].
32. Brownlee, M. (1994). Glycation and diabetic complications. *Diabetes* **43**:836-841.
33. Ralston, A. (2008). Gene interaction and disease. *Nature Education* **1(1)**.
34. NCBI, Gene (2013). ACE angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1636>> [Consult. 22 de Fevereiro 2013].

35. Wikipedia (2012). Renin-angiotensin system, RAAS schematic. [Internet] Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Renin%E2%80%93angiotensin_system> [Consult. 8 de Maio 2013].
36. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E. & Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* **87**: e1-e9.
37. GeneCards[®], The Human Gene Compendium (2013). Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A)1. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE&search=ACE>> [Consult. 26 de Janeiro 2013].
38. PhosphoSitePlus[®] (2013). Protein Page: ACE (human). *Cell Signaling Technology*. [Internet] Disponível em <<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4352&showAllSites=true>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].
39. Kayhan, F. E. & Sesal, C. (2005). The biochemical fundamentals of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in myocardial infarction. *Journal of Cell and Molecular Biology* **4**:1-8.
40. Meldau, D. C. (2013). Sistema Renina-angiotensina. InfoEscola, Navegando e Aprendendo. [Internet] Disponível em <<http://www.infoescola.com/fisiologia/sistema-renina-angiotensina/>> [Consult. 10 de Maio 2013].
41. Masuyer, G., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., Isaac, R. E & Acharya, K. R. (2012). Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Sci Rep* **2**:717.
42. Lavoie, J. L. & Sigmund, C. D. (2003). Minireview: Overview of the renin-angiotensin system – an endocrine and paracrine system. *Endocrinol* **144**(6):2179–2183.
43. Danser, A. H. J., Batenburg, W. W. & van Esch J. H. M. (2007). Prorenin and the (pro)renin receptor – an update. *Nephrol Dial Transplant* **22**:1288–1292.
44. Broden C. C. (2009). Acute renal failure and mechanical ventilation: reality or myth? *Crit Care Nurse* **29**(2):62-75.
45. Catarasi, P., Ravazzolo, R., Emma, F., Fruci, D., Finos, L., Frau, A., Morreale, G., Carrea, A. & Ghiggeri, G. M. (2005) Angiotensin-converting enzyme (ACE) haplotypes and cyclosporine A (CsA) response: a model of the complex relationship between ACE quantitative trait locus and pathological phenotypes. *Hum Molec Genet* **14**:2357-2367.
46. Gene Review (2013). ACE-angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 [Homo sapiens]. *Wikigenes, collaborative publishing*. [Internet] Disponível em <<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/1636.html>> [Consult. 30 de Novembro 2012].
47. Lu, Y., Ge, Y., Hu, Q., Shi, Y., Xue, C., Shi, Y., Chen, S. & Huang, Z. (2012). Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and diabetic retinopathy in the Chinese population. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **13**(2):289-295.
48. Medical Dictionary (2013). Angiogenesis. *MedlinePlus, Merriam-webster*. [Internet] Disponível em <<http://www.merriam-webster.com/medlineplus/angiogenesis>> [Consult. 22 de Fevereiro 2013].
49. Dendorfer, A. Wolfrum, S. & Dominiak, P. (1999). Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *The Japanese Journal of Pharmacology* **79**(4):403-426.
50. NCBI, Gene (2013). AGER advanced glycosylation end product-specific receptor [Homo sapiens]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/177>>, [Consult. 22 de Fevereiro 2013].
51. Schmidt, A. M., Yan, S. D., Yan, S. F & Stern D. M. (2000). The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta* **1498**:99-111.

52. NCBI, BioSystems (2013). AGE/RAGE pathway <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/698754?Sel=geneid:177#show=genes> [Consult. 22 de Fevereiro 2013].
53. Barile, G. R. & Schmidt, A. M. (2007). RAGE and its ligands in retinal disease. *Curr Mol Med* **7(8)**:758-765.
54. PhosphoSitePlus® (2013). Protein Page: RAGE (human). *Cell Signaling Technology*. [Internet] Disponível em <<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=13495&showAllSites=true>> [Consult. 22 de Fevereiro 2013].
55. Kaji, Y., Usui, T., Ishida, S., Yamashiro, K., Moore, T. C. B, Moore, J., Yamamoto, Y., Yamamoto, H. & Adamis, A. P. Inhibition of diabetic leukostasis and blood–retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:858-865.
56. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Advanced glycosylation end product-specific receptor. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AGER&search=AGER>> [Consult. 22 de Fevereiro 2013].
57. Abhary, S., Burdon, K. P. Laurie, K. J. Thorpe, S. Landers, J. Goold, L., Lake, S., Petrovsky, N. & Craig, J. E. (2010). Aldose reductase gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility. *Diabetes Care* **33**:1834–1836.
58. NCBI, Gene (2013). AKR1B1 aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase) [*Homo sapiens* (human)]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231>> [Consult. 26 de Abril 2013].
59. Gene Review (2013). AKR1B1 aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase). *Wikigenes, collaborative publishing*. [Internet] Disponível em <<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/231.html>> [Consult. 26 de Abril 2013].
60. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase). [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKR1B1&search=AKR1B1>> [Consult. 26 de Abril 2013].
61. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Nitric oxide synthase 1 (neuronal). [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS1&search=nos%201#snp>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].
62. Hall, A. V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A. H., Arbus, A. M., Olson, S. L., Lu, W. C., Kau, C-L. & Marsden, P. A. (1994). Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *The Journal of Biological Chemistry* **269(52)**:33082-33090.
63. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell). [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS3&search=NOS3>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].
64. NCBI, Gene (2013). NOS1 nitric oxide synthase 1 (neuronal) [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4842>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].
65. Cai, J. & Boulton, M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* **16**:242–260.
66. Medical Dictionary (2013). Sarcolemma. *MedlinePlus, Merriam-webster*. [Internet] Disponível em <<http://www.merriam-webster.com/medlineplus/sarcolemma>> [Consult. 11 de Maio 2013].
67. PhosphoSitePlus® (2013). Protein Page: nNOS (human). *Cell Signaling Technology*. [Internet] Disponível em <<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1018&showAllSites=true>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].

68. NCBI, Gene (2013). NOS3 nitric oxide synthase 3 (endotelial cell) [*Homo sapiens*] NCBI - <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>> [Consult. 13 de Fevereiro 2013].
69. Cilenšek, I., Mankoč, S., Petrovič, M. G. & Petrovič D. (2012). The 4a/4a genotype of the VNTR polymorphism for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene predicts risk for proliferative diabetic retinopathy in Slovenian patients (Caucasians) with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep* **39**:7061-7067.
70. NCBI, Gene (2013). VEGF vascular endothelial growth factor A [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422>> [Consult. 27 de Abril 2013].
71. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Vascular endothelial growth factor A. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA&search=VEGF>> [Consult. 28 de Maio 2013].
72. Medical Dictionary (2013). Vasculogenesis. *MedlinePlus, Merriam-webster*. [Internet] Disponível em <<http://www.merriam-webster.com/medlineplus/vasculogenesis>> [Consult. 28 de Maio 2013].
73. Watson, C. J., Webb, N. J. A., Bottomley, M. J. & Brenchley, P. E. C. (2000). Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *CYTOKINE* **12**(8):1232–1235.
74. Joussen, A. M., Poulaki, V., Qin, W., Kirchhof, B., Mitsiades, N., Wiegand, S. J., Rudge, J., Yancopoulos, G. D., & Adamis, A. P. (2002). Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*. *Am J Pathol* **160**(2):501–509.
75. Lu, M., Perez, V. L., Ma, N., Miyamoto, K., Peng, H-B., Liao, J. K. & Adamis, A. P. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression *in vivo*. *IOVS* **40**(8):1808-1812.
76. Tolentino, M. J., Mcleod, D. S., Taomoto, M., Otsuji, T., Adamis, A. P., Luty, G. A. (2002). Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol*. **133**(3): 373-385.
77. Arden, G. B. & Sivaprasad, S. (2012). The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol* **124**:15–26.
78. Yang, X., Deng, Y., Gu, H., Lim, A., Altankhuyag, A., Jia, W., Ma, K., Xu, J., Zou, Y., Snellingen, T., Liu, X., Wang, N. & Liu, N. (2011). Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Vis* **17**:3088-3096.
79. NCBI, Gene (2013).PPARGC1A peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10891> acedido a 26.04.2013> [Consult. 26 de Abril 2013].
80. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPARGC1A&search=PPARGC1A>> [Consult. 26 de Abril 2013].
81. Girnun, G. D. (2012). The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biol* **23**:381-388.
82. Lai, C-Q, Tucker, K. L., Parnell, L. D., Adiconis, X., García-Bailo, B., Griffith, J., Meydani, M. & Ordovás, J. M. (2008). PPARGC1A variation associated with DNA damage, diabetes, and cardiovascular diseases: the boston puerto rican health study. **57**(4):809-816.
83. D'Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., Egorova, A. V., Polishuck, R., Madeyski-Bengtson, K., Lelliott, C., Vidal-Puig, A. J., Seibel, P., Villani, G., Moschetta, A. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α (PGC1 α) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *PNAS* **108**(16):6603-6608.

84. Dougherty, E. (2008). Metabolic regulator has hand in controlling vessel growth. *Harvard Medical School*. [Internet] Disponível em <<http://hms.harvard.edu/news/metabolic-regulator-has-hand-controlling-vessel-growth-3-7-08>> [Consult. 26 de Abril 2013].
85. Kleiner, S., Mepani, R. J., Laznik, D., Ye, L., Jurczak, M. J., Jornayvaz, F. R., Estall, J. L., Bhowmick, D. C., Shulman, G. I. & Spiegelman, B. M. (2012). Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *PNAS* **109(24)**:9635-9640.
86. NCBI, Gene (2013). TGFB1 transforming growth factor, beta 1 [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>> [Consult. 30 de Abril 2013].
87. GeneCards[®], The Human Gene Compendium (2013). Transforming growth factor, beta 1. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TGFB1&search=TGFB1>> [Consult. 30 de Abril 2013].
88. Redondo, S., Navarro-Dorado, J., Ramajo, M., Medina, Ú., Tejerina, T. (2012) The complex regulation of TGF- β in cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management* **8**:533–539.
89. Ittner, L. M., Wurdak, H., Schwerdtfeger, K., Kunz, T., Ille, F., Leveen, P., Hjalt, T. A., Suter, U., Karlsson, S., Hafezi, F., Born, W. & Sommer, L. (2005). Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF β signaling in neural-crest stem cells. *J. Biol.* **4(3)**: 11.
90. NCBI, Gene (2013). MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H) [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>>, [Consult. 21 de Fevereiro 2013].
91. GeneCards[®], The Human Gene Compendium (2013). Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H). [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR&search=MTHFR>> [Consult. 21 de Fevereiro 2013].
92. PhosphoSitePlus[®] (2013). Protein Page: MTHFR (human). *Cell Signaling Technology*. [Internet] Disponível em <<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=7717&showAllSites=true>> [Consult. 21 de Fevereiro 2013].
93. Niu, W. & Qi, Y. (2012). An updated meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C/T polymorphism with diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* **95(1)**:110-8.
94. Genetics Home Reference, Your Guide to Understanding Genetic Conditions (2011). *A service of the U.S. National Library of Medicine*[®]. [Internet] Disponível em <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>> [Consult. 21 de Fevereiro 2013].
95. Garilli, B. (2012). MTHFR Mutation: A Missing Piece in the Chronic Disease Puzzle, 13(2). [Internet] Disponível em <<http://holisticprimarycare.net/topics/topics-a-g/functional-medicine/1353-mthfr-mutation-a-missing-piece-in-the-chronic-disease-puzzle>> [Consult. 20 de Março 2013].
96. Krajinovic, M., Lamothe, S., Labuda, D., Lemieux-Blanchard, E., Théorêt, Y., Moghrabi, A. & Sinnett, D. (2004). Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **103**:252-257.
97. Leclerc, D., Sibani, S. & Rozen, R. (2000). Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-.
98. Maeda, M., Yamamoto, I., Fukuda, M., Motomura, T., Nishida, M., Nonen, S., Kasayama, S., Fujio, Y. & Azuma, J. (2008). MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes and Its Complications* **22(2)**:119–125.

99. Maeda, M., Yamamoto, I., Fukuda, M., Nishida, M., Fujitsu, J., Nonen, S., Igarashi, T., Motomura, T., Inaba, M., Fujio, Y. & Azuma, J. (2003). MTHFR gene polymorphism as a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without serum creatinine elevation. *Diabetes Care* **26**(2):547-548.
100. Matthews, R. (2002). Methylenetetrahydrofolate reductase: a common human polymorphism and its biochemical implications. *Chem Rec* **2**:4-12.
101. Brustolin, S., Giugliani, R. & Félix, T. M. (2010). Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res*, **43**(1): 1-7.
102. NCBI, Gene (2013). ICAM1 intercellular adhesion molecule 1 [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3383>> [Consult. 1 de Maio de 2013].
103. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Intercellular adhesion molecule 1 [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ICAM1&search=ICAM1>> [Consult. 1 de Maio de 2013].
104. Mullins, R. F., Skeie, J. M., Malone, E. A. & Kuehn, M. H. (2006). Macular and peripheral distribution of ICAM-1 in the human choriocapillaris and retina. *Mol Vis* **12**: 224-235.
105. Greenwood, J., Etienne-Manneville, S., Adamson, P. & Couraud, P-O. (2002). Lymphocyte migration into the central nervous system: Implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascular Pharmacology* **38**:315-322.
106. Moller, D. E. (2000). Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *TEM* **11**(6):212-217.
107. NCBI, Gene (2013). TNF tumor necrosis fator [*Homo sapiens*]. [Internet] Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>>. [Consult. 1 de Maio de 2013].
108. GeneCards®, The Human Gene Compendium (2013). Tumor necrosis fator. [Internet] Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF&search=TNFa>> [Consult. 1 de Maio de 2013].
109. Agarwal, R. & Agarwal, P. (2012). Glaucomatous neurodegeneration: An eye on tumor necrosis factor-alpha. *Indian J Ophthalmol* **60**: 255-261
110. Kuo, J. Z. Guo, X. Klein, R., Klein, B. E. Cui, J., Rotter, J. I., Ipp, E., Chen, Y-D. I. (2012). Systemic soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are associated with severity of diabetic retinopathy in hispanics. *Ophthalmology* **119**:1041-1046.
111. Li, Y., Huang, J., Amos, C. I. (2012). Genetic association analysis of complex diseases incorporating intermediate phenotype information. *PLoS ONE* **7**(10):e46612.
112. Cardon, L. R. & Bell, J. I. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics* **2**:91-99.
113. Kim, S. & Misra, A. (2007). SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annu Rev Biomed Eng* **9**:289-320.
114. Biosearch Technologies. Genotyping-qPCR. [Internet] Disponível em <<http://www.biosearchtech.com/support/applications/genotyping-qpcr.aspx>> [Consult. 15 de Junho 2012].
115. Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev, S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* **30**:3894-3900.
116. ANNOVAR website. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. [Internet] Disponível em <<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>> [Consult. 25 de Maio 2012].

117. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38(16)**:e164.
118. ANNOVAR website. ANNOVAR Accessary Programs. [Internet] Disponível em <http://www.openbioinformatics.org/annovar/annovar_accessary.html> [Consult. 25 de Maio 2012].
119. Ng, C. P. & Henikoff, S. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* **31**:3812-3814.
120. Lorente-Galdos, B., Medina, I., Morcillo-Suarez, C., Heredia, T., Carreno-Torres, A., Sangrós, R., Alegre, J., Pita, G., Vellalta, G., Malats, N., Pisano, D. G., Dopazo, J. & Navarro, A. (2012). Select your SNPs (SYSNPs): a web tool for automatic and massive selection of SNPs. *Int J Data Min Bioinform* **6(3)**:324-334.
121. Lin, Z. & Altman, R. B. (2004). Finding haplotype tagging SNPs by use of principal components analysis. *Am J Hum Genet* **75**:850-861.
122. Novais, C. M., Pires-Alves, M. & Silva, F. (2004). PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reacção em cadeia da polimerase. *Biotec Ciência e Desenvol* **33**:10-13.
123. Life Technologies Corporation (2010). TaqMan® OpenArray® Genotyping, Getting started guide. *Applied Biosystems*.
124. Life Technologies Corporation (2010). TaqMan® OpenArray Genotyping System: High-throughput, low-cost genotyping using TaqMan® genotyping assays. Product Bulletin. *Applied Biosystems*.
125. Andersen, C. B., Holst-Jensen, A., Berdal, K.G., Thorstensen, T. & Tengs, T. (2006). Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. *J Agric Food Chem* **54**:9658-9663.
126. Life Technologies Corporation (2012). SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays. [Internet] Disponível em <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html#support>> [Consult. 15 de Junho 2012].
127. Life Technologies Corporation (2011). TaqMan® SNP Genotyping Assays. Product Bulletin. *Applied Biosystems*.
128. Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H. & Meyer, R. B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* **25**:2657-2660.
129. Life Technologies Corporation (2012). TaqMan® and SYBR® Green Chemistries. *Applied Biosystems*. [Internet] Disponível em <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>> [Consult. 23 de Junho 2012].
130. Life Technologies Corporation (2010). Custom TaqMan® Assays: For new SNP genotyping and gene expression assays. Design and ordering guide. *Applied Biosystems*.
131. QIAGEN (2006). Dneasy® Blood & Tissue Handbook.
132. Molecular Probes (2008). Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, invitrogen™.
133. Birdsell, D. N., Pearson, T., Price, E. P., Hornstra, H. M., Nera, R. D., Stone, N., Gruendike, J., Kaufman, E. L., Pettus, A. H., Hurbon, A. N., Buchhagen, J. L., Harms, N. J., Chanturia, G., Gyuranecz, M., Wagner, D. M. & Keim, P. S. (2012). Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): A functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS ONE* **7(3)**:e32866.

134. Bottema, C. D. & Sommer, S. S. (1993). PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res* **288**:93–102.
135. Maertens, O., Legius, E., Speleman, F., Messiaen, L. & Vandesompele, Jo. (2006). Real-time quantitative allele discrimination assay using 3' locked nucleic acid primers for detection of low-percentage mosaic mutations. *Analytical Biochem* **359**:144-146.
136. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. & Markham, A.F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**:2503–2516.
137. Casado-Díaz, A., Cuenca-Acevedo, R., Quesada, J. M. & Dorado, G. 2007. Individual single tube genotyping and DNA pooling by allele-specific PCR to uncover associations of polymorphisms with complex diseases. *Clinica Chimica Acta* **376**:155–162.
138. Dall'Ozzo, S., Andres, C., Bardos, P., Watier, H. & Thibault, G. (2003). Rapid single-step *FCGR3A* genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *Journal of Immunological Methods* **277**:185-192.
139. Martino, A., Mancuso, T. & Rossi, A. M. (2010). Application of High-Resolution Melting to Large-Scale, High-Throughput SNP Genotyping: A Comparison with the TaqMan® Method. *J Biomol Screen* **15**(6): 623-629.
140. Rahmann, S. & Gräfe, C. (2004). Mean and variance of the Gibbs free energy of oligonucleotides in the nearest neighbor model under varying conditions. *Bioinformatics* **20**(17):2928-2933.
141. Rahmann, S. (2003). Fast and sensitive probe selection for DNA chips using jumps in matching statistics. *Proceedings of the 2nd IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB 2003)*, IEEE, pp.57–64.
142. Life Technologies Corporation (2013). SYTO® green fluorescent nucleic acid stain invitrogen, molecular probes. [Internet] Disponível em <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/S34854>> [Consult. 15 de Maio 2013].
143. Life Technologies Corporation (2009). MeltDoctor™HRM Master Mix. *Applied Biosystems*.
144. Life Technologies Corporation (2011). MeltDoctor™ high-resolution melt reagentes, Part of the Applied Biosystems®HRM complete solution. Product Bulletin. *Applied Biosystems*.
145. SelectScience (2013). illustra™ ExoStar Kit for Enzymatic PCR and Sequencing Clean-up. *GE Healthcare*. [Internet] Disponível em <www.gelifesciences.com/illustra> [Consult. 20 de Maio 2013].
146. Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2004). Lehninger Principles of biochemistry. 4th ed. pp.75-115.
147. Barnes, M. R & Gray, I. C. (2003). Bioinformatics for Geneticists. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, England, pp. 289-316.
148. Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J. H., den Heijer, M., Kluijtmans, L. A. J., van den Heuvel, L. P. & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* **10**: 111-113.
149. SNPedia. rs1801131. [Internet] Disponível em <<http://snpedia.com/index.php/Rs1801131>> [Consult. 26 de Julho 2013].
150. Wu, C., Gong, Y., Sun, A., Zhang, Y., Zhang, C., Zhang, W., Zhao, G., Zou, Y. & Ge, J. (2012). The human MTHFR rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**(7):693-698.

151. Hezard, N., Cornillet, P., Droullé, C., Gillot, L., Potron, G. & Nguyen, P. (1997). Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. *Thromb Res* **88(1)**:59–66.

ANEXOS

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1.

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
10	B	GG	GG
12		GG	GG
17		GG	GG
25		GG	GG
30		GG	GG
31		GG	GG
32		GG	GG
36		GG	GG
44		GG	GG
48		GG	GG
50		GG	GG
61		GG	GG
81		GG	GG
82		GG	GG
84		GG	GG
85		GG	GG
89		GG	GG
90		GG	GG
103		GG	GG
111		GG	GG
114		GG	GG
115		GG	GG
116		GG	GG
118		GG	GG
121		GG	GG
122		GG	GG
123		GG	GG
125		GG	GG
126		GG	GG
127		GG	GG
140	GG	GG	
144	GG	GG	
151	GG	GG	
154	GG	GG	
155	GG	GG	
156	GG	GG	
158	GG	GG	
159	GG	GG	
162	GG	GG	
168	GG	GG	
169	GG	GG	
171	GG	GG	
176	GG	GG	
178	GG	GG	

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1. (continuação)

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
182	B	GG	GG
192		GG	GG
202		GG	GG
206		GG	GG
207		GG	GG
209		GG	GG
210		GG	GG
213		GG	GG
217		GG	GG
219		GG	GG
223		GG	GG
227		GG	GG
230		GG	GG
231		GG	GG
232		GG	GG
233		GG	GG
243		GG	GG
244		GG	GG
248		GG	GG
260		GG	GG
261		GG	GG
265		GG	GG
267		GG	GG
269		GG	GG
270		GG	GG
271		GG	GG
274		GG	GG
277		GG	GG
279		GG	GG
287		GG	GG
288	GG	GG	
293	GG	GG	
294	GG	GG	
305	GG	GG	
1	C	GG	GG
2		GG	GG
4		GG	GG
5		GG	GG
6		GG	GG
11		GG	GG
15		GG	GG
16		GG	GG
18		GG	GG
19		GG	GG

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1. (continuação)

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
20	C	GG	GG
22		GG	GG
23		GG	GG
24		GG	GG
26		GG	GG
27		GG	GG
28		GG	GG
29		GG	GG
33		GG	GG
34		GG	GG
35		GG	GG
37		GG	GG
41		GG	GG
42		GG	GG
43		GG	GG
45		GG	GG
47		GG	GG
49		GG	GG
51		GG	GG
52		GG	GG
53		GG	GG
54		GG	GG
56		GG	GG
57		GG	GG
58		GG	GG
59		GG	GG
60		GG	GG
62		GG	GG
63		GG	GG
65		GG	GG
67		GG	GG
68		GG	GG
70	GG	GG	
71	GG	GG	
72	GG	GG	
73	GG	GG	
74	GG	GG	
75	GG	GG	
76	GG	GG	
77	GG	GG	
78	GG	GG	
80	GG	GG	
83	GG	GG	
87	GG	GG	

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1. (continuação)

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
91	C	GG	GG
93		GG	GG
94		GG	GG
97		GG	GG
98		GG	GG
99		GG	GG
100		GG	GG
102		GG	GG
104		GG	GG
106		GG	GG
108		GG	GG
109		GG	GG
113		GG	GG
117		GG	GG
119		GG	GG
120		GG	GG
124		GG	GG
128		GG	GG
129		GG	GG
130		GG	GG
136		GG	GG
137		GG	GG
138		GG	GG
139		GG	GG
142		GG	GG
147		GG	GG
148		GG	GG
149		GG	GG
150		GG	GG
157		GG	GG
160		GG	GG
161	GG	GG	
163	GG	GG	
165	GG	GG	
166	GG	GG	
167	GG	GG	
173	GG	GG	
174	GG	GG	
179	GG	GG	
181	GG	GG	
183	GG	GG	
184	GG	GG	
185	GG	GG	
186	GG	GG	

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1. (continuação)

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
190	C	GG	GG
194		GG	GG
195		GG	GG
196		GG	GG
197		GG	GG
198		GG	GG
199		GG	GG
200		GG	GG
203		GG	GG
204		GG	GG
205		GG	GG
208		GG	GG
214		GG	GG
220		GG	GG
221		GG	GG
222		GG	GG
225		GG	GG
228		GG	GG
229		GG	GG
234		GG	GG
237		GG	GG
239		GG	GG
240		GG	GG
241		GG	GG
242		GG	GG
245		GG	GG
246		GG	GG
247		GG	GG
249		GG	GG
250		GG	GG
251		GG	GG
253	GG	GG	
256	GG	GG	
257	GG	GG	
259	GG	GG	
263	GG	GG	
264	GG	GG	
272	GG	GG	
273	GG	GG	
275	GG	GG	
276	GG	GG	
278	GG	GG	
280	GG	GG	
281	GG	GG	

ANEXO I – Genótipo das amostras para os SNPs rs77074921 e rs76839820 do gene NOS1. (continuação)

Gene		NOS1	
ID SNP		rs77074921	rs76839820
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo	
282	C	GG	GG
289		GG	GG
298		GG	GG
299		GG	GG
300		GG	GG
302		GG	GG
303		GG	GG

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
3	A	GG	CC	CC
8		TG	CT	CC
9		TG	CC	CC
13		TT	CT	CC
14		TG	CC	CC
21		GG	CC	CC
38		GG	CC	CC
39		GT	CC	CC
40		TT	CT	CC
46		GG	CC	CC
55		TT	CC	CC
64		GG	CC	CC
66		GG	CT	CC
69		TG	CC	CC
79		GT	CC	CC
86		GG	CT	CC
88		TT	CC	CC
92		TG	CC	CC
95		GG	CC	CC
96		TG	CC	CC
101		GG	CC	CC
105		TG	CC	CC
107		TG	CT	CC
110		GG	CT	CC
112		GG	CC	CC
131		TT	CC	CC
132		GG	CT	CC
133		TT	CT	CC
134	TG	CC	CC	
135	TG	CC	CC	
141	TT	CC	CC	
143	GG	CC	CC	
145	TG	CT	CC	
146	TT	CT	CC	
152	TG	CT	CC	
153	TG	CT	CC	
164	TT	CC	CC	
170	TG	CC	CC	
172	GG	CC	CC	
175	TG	CC	CC	
177	TG	TT	CC	
180	GG	CC	CC	
187	TG	CT	CC	

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
187	A	TG	CT	CC
188		TG	CC	CC
189		TG	CC	CC
191		GG	CC	CC
193		GG	TT	CC
201		GG	CT	CC
211		TG	CT	CC
212		GG	CC	CC
215		TT	CC	CC
216		TT	CC	CC
218		TG	CC	CC
224		GG	CC	CC
226		GG	CT	CC
235		TT	CT	CC
236		GG	CC	CC
238		TG	CC	CC
252		GG	CC	CC
254		GG	CT	CC
255		TG	CT	CC
258		GG	CC	CC
262		TG	CC	CC
266		TG	CC	CC
268		TG	CT	CC
283		TG	CT	CC
284		GG	CC	CC
285		TT	CC	CC
286		TG	CC	CC
290		TG	CC	CC
291		TG	CC	CC
292		TG	CC	CC
295	TT	CT	CC	
296	GG	CT	CC	
297	TG	CC	CC	
301	TT	CC	CC	
304	GG	CC	CC	
306	TG	CT	CC	
307	TT	CT	CC	
7	B	TT	...	TG	CT	CC
10		TT	...	TG	CT	CC
12		TT	...	GG	CC	CC
17		TT	...	GG	CC	CC
25		TT	...	TG	CT	CC

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
30	B	TT	...	GG	CC	CC
31		TT	...	TG	CC	CC
32		TT	...	TG	CC	CC
36		TT	...	TG	CT	CC
44		TT	...	GG	CC	CC
48		TT	...	GG	CC	CC
50		TT	...	TG	CC	CC
61		TT	...	GG	CC	CC
81		TT	...	GG	CC	CC
82		TT	...	GG	CC	CC
84		TT	...	TG	CC	CC
85		TT	...	TG	CC	CC
89		TT	...	TG	CC	CC
90		TT	...	TG	CC	CC
103		TT	...	TG	CC	CC
111		TT	...	TT	CT	CC
114		TT	...	TG	TT	CC
115		TT	...	GG	CC	CC
116		TT	...	GG	CT	CC
118		TT	...	GG	CC	CC
121		TT	GG	TT	CC	CC
122		TT	...	TG	CC	CC
123		TT	...	TG	CT	CC
125		TT	GG	TT	CT	CC
126		TT	...	GG	CC	CC
127		TT	...	TT	CT	CC
140		TT	...	GG	CC	CC
144		TT	...	GG	CC	CC
151		TT	...	TT	CC	CC
154		TT	...	GG	CC	CC
155	TT	...	GG	CT	CC	
156	TT	...	GG	CT	CC	
158	TT	...	TG	CT	CC	
159	TT	...	GG	CC	CC	
162	TT	...	TG	CC	CC	
168	TT	...	GG	CC	CC	
169	TT	...	GG	CT	CC	
171	TT	...	GG	CC	CC	
176	TT	...	TG	CC	CC	
178	TT	...	TG	CT	CC	
182	TT	...	TG	CC	CC	
192	TT	...	GG	CT	CC	

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
202	B	TT	...	GG	CC	CC
206		TT	GG	TT	CC	CC
207		TT	...	GG	CC	CC
209		TT	GG	TT	CT	CC
210		TT	...	TG	CT	CC
213		TT	...	TT	CC	CC
217		TT	...	TT	CC	CC
219		TT	...	TG	CC	CC
223		TT	...	GG	CC	CC
227		TT	...	GG	CC	CC
230		TT	...	TG	CC	CC
231		TT	...	GG	CC	CC
232		TT	...	TG	CT	CC
233		TT	...	TG	CC	CC
243		TT	...	GG	CC	CC
244		TT	...	GG	CT	CC
248		TT	...	TG	CT	CC
260		TT	...	TT	CT	CC
261		TT	...	TG	CC	CC
265		TT	...	GG	CC	CC
267		TT	...	GG	CT	CC
269		TT	...	TT	TT	CC
270		TT	...	TT	TT	CC
271		TT	...	TG	CC	CC
274		TT	...	GG	CT	CC
277		TT	...	GG	CT	CC
279		TT	...	GG	CC	CC
287		TT	...	TG	CC	CC
288		TT	...	TG	TT	CC
293		TT	...	GG	CC	CC
294	TT	...	TG	CC	CC	
305	TT	...	TG	TT	CC	
1	C	TT	TG	TG	CT	CC
2		TT	...	GG	TT	CC
4		TT	...	TG	CT	CC
5		TT	...	GG	CT	CC
6		TT	...	TG	CC	CC
11		TT	...	GG	CC	CC
15		TT	...	TG	CC	CC
16		TT	...	TG	CT	CC
18		TT	TG	TG	CC	CC
19		TT	...	GG	CC	CC

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
20	C	TT	...	GG	CT	CC
22		TT	...	TG	CT	CC
23		TT	...	TT	CT	CC
24		TT	...	TG	CC	CC
26		TT	...	TG	CT	CC
27		TT	...	TG	CC	CC
28		TT	GG	TT	TT	CC
29		TT	GG	TT	TT	CC
33		TT	...	GG	CT	CC
34		TT	...	GG	CC	CC
35		TT	TT	GG	CT	CC
37		TT	...	TG	CC	CC
41		TT	TT	GG	CT	CT
42		TT	...	TG	CT	CC
43		TT	TT	GG	CC	CC
45		TT	TG	TG	CT	CC
47		TT	...	GG	CC	CC
49		TT	...	TT	CC	CC
51		TT	...	TG	CC	CC
52		TT	...	TG	TT	CC
53		TT	...	GG	CT	CC
54		TT	...	TG	CC	CC
56		TT	...	GG	CC	CC
57		TT	...	GG	CC	CC
58		TT	...	TG	CT	CC
59		TT	...	TG	CT	CC
60		TT	...	GG	CC	CC
62		TT	...	GG	CT	CC
63		TT	...	GG	CT	CC
65		TT	...	GG	CT	CC
67	TT	...	TG	CC	CC	
68	TT	...	TG	CT	CC	
70	TT	...	GG	CT	CC	
71	TT	...	GG	CC	CC	
72	TT	...	TG	CC	CC	
73	TT	...	GG	CC	CC	
74	TT	...	GG	CC	CC	
75	TT	...	GG	CC	CC	
76	TT	...	GG	CC	CC	
77	TT	...	GG	CC	CC	
78	TT	...	GG	CT	CC	
80	TT	...	TG	CT	CC	

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
83	C	TT	...	GG	CC	CC
87		TT	...	GG	CT	CC
91		TT	...	TG	CC	CC
93		TT	GG	TT	CC	CC
94		TT	...	TG	CC	CC
97		TT	...	TG	CC	CC
98		TT	...	GG	CC	CC
99		TT	...	TG	CC	CC
100		TT	...	GG	CC	CC
102		TT	...	GG	CT	CC
104		TT	...	GG	CC	CC
106		TT	...	TG	CC	CC
108		TT	...	GG	CC	CC
109		TT	...	GG	CC	CC
113		TT	...	GG	TT	CC
117		TT	...	GG	CT	CC
119		TT	...	TG	CC	CC
120		TT	...	TG	CT	CC
124		TT	...	TG	TT	CC
128		TT	...	GG	CT	CC
129		TT	...	TG	TT	CC
130		TT	...	TT	CC	CC
136		TT	...	TG	CC	CC
137		TT	GG	TT	CC	CC
138		TT	...	TG	CT	CC
139		TT	...	GG	CC	CC
142		TT	...	GG	CC	CC
147		TT	...	GG	CC	CC
148		TT	...	GG	CC	CC
149		TT	...	GG	CC	CC
150		TT	...	GG	CC	CC
157	TT	...	TG	CC	CC	
160	TT	...	GG	CT	CC	
161	TT	...	TG	CC	CC	
163	TT	...	TG	CT	CC	
165	TT	...	TT	CC	CC	
166	TT	...	TT	TT	CC	
167	TT	...	TT	CC	CC	
173	TT	...	TT	CC	CC	
174	TT	...	GG	CC	CC	
179	TT	...	GG	CC	CC	
181	TT	...	TG	CT	CC	

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
183	C	TT	...	TG	CT	CC
184		TT	...	TG	CT	CC
185		TT	...	TG	CT	CC
186		TT	...	GG	CC	CC
190		TT	...	GG	CC	CC
194		TT	...	GG	CT	CC
195		TT	...	TT	CC	CC
196		TT	...	GG	CC	CC
197		TT	...	GG	CT	CC
198		TT	GG	TT	CC	CC
199		TT	...	GG	CT	CC
200		TT	...	TG	CC	CC
203		TT	...	GG	CT	CC
204		TT	...	TT	CT	CC
205		TT	...	TG	CC	CC
208		TT	...	TG	CT	CC
214		TT	...	TT	CT	CC
220		TT	GG	TT	CT	CC
221		TT	...	TT	CC	CC
222		TT	...	TG	CC	CC
225		TT	...	TG	CT	CC
228		TT	...	TG	CC	CC
229		TT	...	TG	CT	CC
234		TT	...	TT	CC	CC
237		TT	...	TG	CC	CC
239		TT	...	TG	CT	CC
240		TT	...	TG	CC	CC
241		TT	...	TG	CC	CC
242		TT	...	TG	CT	CC
245		TT	...	GG	CC	CC
246	TT	...	GG	CC	CC	
247	TT	TT	GG	CT	CC	
249	TT	...	TG	CC	CC	
250	TT	...	TG	CC	CC	
251	TT	...	GG	CC	CC	
253	TT	...	GG	CC	CC	
256	TT	...	TG	CC	CC	
257	TT	...	TG	CC	CC	
259	TT	...	GG	CC	CC	
263	TT	...	GG	CC	CC	
264	TT	TT	GG	CT	CC	
272	TT	...	GG	CC	CC	

ANEXO II – Genótipo das amostras para os SNPs rs72552099, rs1801131 e rs4846049 do gene MTHFR e rs8075924 e rs4357 do gene ACE.
(continuação)

Gene		MTHFR			ACE	
ID SNP		rs72552099	rs1801131	rs4846049	rs8075924	rs4357
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
273	C	TT	...	GG	CT	CC
275		TT	...	TG	CC	CC
276		TT	...	GG	CC	CC
278		TT	...	GG	CT	CC
280		TT	...	TT	CT	CC
281		TT	...	TG	CC	CC
282		TT	...	GG	CT	CC
289		TT	...	TG	CT	CC
298		TT	...	TG	CT	CC
299		TT	...	TG	CC	CC
300		TT	...	TG	CC	CC
302		TT	...	TG	CC	CC
303		TT	...	TG	CT	CC

ANEXO III – Genótipo das amostras para os SNP rs121912703, rs113110741, rs12720744, rs12720743 e rs4363 do gene ACE.

Gene		ACE				
ID SNP		rs121912703	rs113110741	rs12720744	rs12720743	rs4363
Amostra nr	Fenótipo	Genótipo				
88	A	CC	GG	CC	TT	AG
92		CC	GG	CC	TT	AG
95		CC	GG	CC	TT	GG
96		CC	GG	CC	TT	AA
101		CC	GG	CC	TT	GG
105		CC	GG	CC	TT	AG
107		CC	GG	CT	/T	AG
10	B	CC	GG	CC	TT	AG
17		CC	GG	CC	TT	AG
31		CC	GG	CC	TT	AG
36		CC	GG	CC	TT	GG
44		CC	GG	CC	TT	AG
48		CC	GG	CC	TT	AG
89		CC	GG	CC	TT	AG
90		CC	GG	CC	TT	AG
1	C	CC	GG	CC	TT	GA
5		CC	GG	CC	TT	AA
6		CC	GG	CC	TT	AA
16		CC	GG	CC	TT	AG
18		CC	GG	CC	TT	AA
34		CC	GG	CC	TT	GG
35		CC	GG	CC	TT	GG
41		CC	GG	CC	TT	AA
43		CC	GG	CC	TT	GG
45		CC	GG	CC	TT	GA
73		CC	GG	CC	TT	AG
75		CC	GG	CC	TT	AG
76		CC	GG	CC	TT	AG
77		CC	GG	CC	TT	AG
83		CC	GG	CC	TT	AG
87		CC	GG	CC	TT	AG
94		CC	GG	CC	TT	GG
97		CC	GG	CC	TT	AA
98		CC	GG	CC	TT	AG
99		CC	GG	CC	TT	GG
100		CC	GG	CC	TT	AG
137		CC	GG	CC	TT	GG
198		CC	GG	CT	/T	GG
247		CC	GG	CC	TT	AA
264		CC	GG	CC	TT	GG

ANEXO IV – Otimização da técnica AS-PCR

Para a otimização da técnica AS-PCR foram alteradas algumas variáveis, nomeadamente, a utilização de *primers* específicos em reações de PCR separadas e em combinação (os dois *primers* específicos num mesmo poço de reação); alteração da concentração dos *primers*, dos fragmentos de controlo positivo e das amostras de DNA; alteração da posição do *mismatch* na extremidade 3' do *primer* específico, do número de bases GC da cauda situada na extremidade 5' do *primer*, do número de ciclos e da temperatura de *annealing*. O único reagente que não sofreu alterações foi a *master mix* que, em todas as reações, tinha uma concentração de 1x.

Foi necessário realizar otimizações concretas para cada SNP e, por isso, os resultados apresentados neste capítulo dividem-se também por SNP, tal como no Capítulo 3 – Resultados. Todas as otimizações partiram de um ponto comum: os *primers* específicos incluíram o *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' (Tabela I) e as reações foram realizadas com esses *primers* juntos no mesmo poço de reação. Os fragmentos de controlo positivo utilizados, para além dos apresentados no Capítulo 2 – Materiais e Métodos, encontram-se na Tabela II.

Tabela I: Pares de *primers* (F = *forward* e R = *reverse*) utilizados para a otimização inicial da genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica *Allele-specific* PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplicão e respetivo tamanho do amplicão em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a azul – *mismatch* na penúltima base.

Gene	ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T _m	T _m amplicão	Tamanho amplicões
				(°C)		
NOS1	rs77074921	F	5'-ggcgccgcgcgcggcGGAGCTGATGGAATAGTAGAG-3'	62	87	142/157 pb
		F	5'-GGAGCTGATGGAATAGTAGTA-3'	60	84	
		R	5'-GCAGGAGTACGAGGAATGGA-3'	62	-	
	rs76839820	F	5'-ggcgccgcgcgcggcAAGGTGGTCTCCAGGTGAG-3'	60	84	89/104 pb
		F	5'- AAGGTGGTCTCCAGGTGA-3'	58	80	
		R	5'-GAGGTACTCAGAGGCATTG-3'	58	-	
MTHFR	rs72552099	F	5'-CCAGCATCACTCACTTTGTGA-3'	62	-	93/108 pb
		R	5'-ggcgccgcgcgcggcGGAGCTGACCAGTGAAGAGC-3'	64	82	
		R	5'-GGAGCTGACCAGTGAAGACA-3'	62	78	
ACE	rs8075924	F	5'-ggcgccgcgcgcggcGAATCATGGAGGCAGACTTTC-3'	62	83	125/140 pb
		F	5'-GAATCATGGAGGCAGACTTAT-3'	60	80	
		R	5'-ACATCTTCACATGGTGGCAG-3'	60	-	

Tabela I: Pares de *primers* (F = *forward* e R = *reverse*) utilizados para a otimização inicial da genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica *Allele-specific PCR*. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplicão e respetivo tamanho do amplicão em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a azul – *mismatch* na penúltima base. (Continuação).

Gene	ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T_m	T_m	Tamanho amplicões
				(°C)		
ACE	rs4357	F	5'-ggcgccgcgcgcgcgcCGCAGGAGAATGGGGTGT C -3'	62	85	135/149 pb
		F	5'-ACGCAGGAGAATGGGGTGA T -3'	62	82	
		R	5'-CTGGTACTTCAGCCTGTCTGA-3'	62	-	
	rs121912703	F	5'-ggcgccgcgcgcgcgcCGCAGTACA A CTGGACG A C-3'	60	91	166/181pb
		F	5'-CGCAGTACA A CTGGACG A T-3'	58	89	
		R	5'-CAAGGAGACAGCATGGGCA-3'	60	-	
	rs113110741	-	_____	-	-	-
	rs12720744	F	5'-CATGTTGAGCTACTTCAAGC-3'	58	-	126/141pb
		R	5'-ggcgccgcgcgcgcgcAGGTGGGGTGGGTGG A G-3'	60	88	
R		5'-GAGGTGGGGTGGGTGG A -3'	58	85		

Tabela II: Sequências de DNA utilizadas como controlos positivos das reações de genotipagem dos SNPs ACE_rs121912703 e ACE_rs12720744. As sequências representam cada um dos alelos esperados para cada SNP em estudo. O tamanho do amplicão está indicado em pares de bases (pb). Nucleótidos a vermelho: possíveis alelos para cada SNP.

Gene	ID SNP	Sequência dos fragmentos	Tamanho amplicão
ACE	rs121912703	5'-GGAGAAGCTGGGCTGGCCGCAGTACA A CTGGACGC C GAACTCCGGTACCGCCACCCACCCACCTCCA GCCTTGGGTCTTAACCCCTCCCCAGGCTGGGCAGCCATGCGGCTGACCTCGGAGCCTGGCCCTGCCCCG CACCCTTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCATGCTGTCTCCTTGCTTCCCGCTCAGCTCGC-3'	200 pb
		5'-GGAGAAGCTGGGCTGGCCGCAGTACA A CTGGACGCT T GAACTCCGGTACCGCCACCCACCCACCTCCA GCCTTGGGTCTTAACCCCTCCCCAGGCTGGGCAGCCATGCGGCTGACCTCGGAGCCTGGCCCTGCCCCG CACCCTTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCATGCTGTCTCCTTGCTTCCCGCTCAGCTCGC-3'	200 pb
	rs12720744	5'-GCCAGCCCAACATGAGCGCCTCGGCCATGTTGAGCTACTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCACG GAGAACGAGCTGCATGGGGAGAAGCTGGGCTGGC CGCAGTACA A CTGGACGCCGA A CTCCGGTAC C GCC ACCACCCACCTCCAGCCTTGGGTCTTAACCCCT CCC-3'	176 pb
		5'-GCCAGCCCAACATGAGCGCCTCGGCCATGTTGAGCTACTTCAAGCCGCTGCTGGACTGGCTCCGCACG GAGAACGAGCTGCATGGGGAGAAGCTGGGCTGGC CGCAGTACA A CTGGACGCCGA A CTCCGGTAC T GCC ACCACCCACCTCCAGCCTTGGGTCTTAACCCCT CCC-3'	176 pb

I. Gene NOS1

i.i. rs77074921 (G/A)

Para a otimização do SNP NOS1_rs77074921 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

i.i.i. *Primers* específicos no mesmo poço de reação de PCR

Foi testado se se obtinham resultados válidos com a adição dos dois *primers* específicos na mesma reacção de PCR, ou seja, no mesmo poço de reacção, como forma de poupar tempo e recursos monetários.

A Figura 1 representa as curvas de *melting* do produto amplificado das amostras de controlo positivo correspondentes ao NOS1_rs77074921. As curvas de *melting* G e A representam a amplificação dos produtos dos fragmentos com os nucleótidos G e A na posição do SNP, respetivamente. As condições comuns às 2 reacções foram: 0,10µM de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', 0,20µM de *primer reverse* e 40 ciclos de PCR com 60°C de temperatura de *annealing*. Apenas se alterou a concentração dos fragmentos de controlo positivo: (a) e (b) - 0,001ng/µL e (c) e (d) - 0,000004ng/µL. As curvas GA (Figura 1b e d) dizem respeito a um controlo positivo heterozigótico obtido pela combinação de ambos os fragmentos, numa proporção de 1:1 e o “c-“ representa o controlo negativo.

Da Figura 1 verifica-se que a combinação dos *primers* específicos na mesma reacção de PCR resulta na separação evidente dos picos, pois as T_m apresentadas nas curvas são semelhantes às T_m teóricas. No entanto, na curva GA não houve separaçãoem dois picos correspondentes às T_m de cada alelo. Das duas concentrações de fragmentos apresentadas escolheu-se a 0,000004ng/µL para continuar com a otimização, visto que a Figura 1c possui os picos mais uniformes.

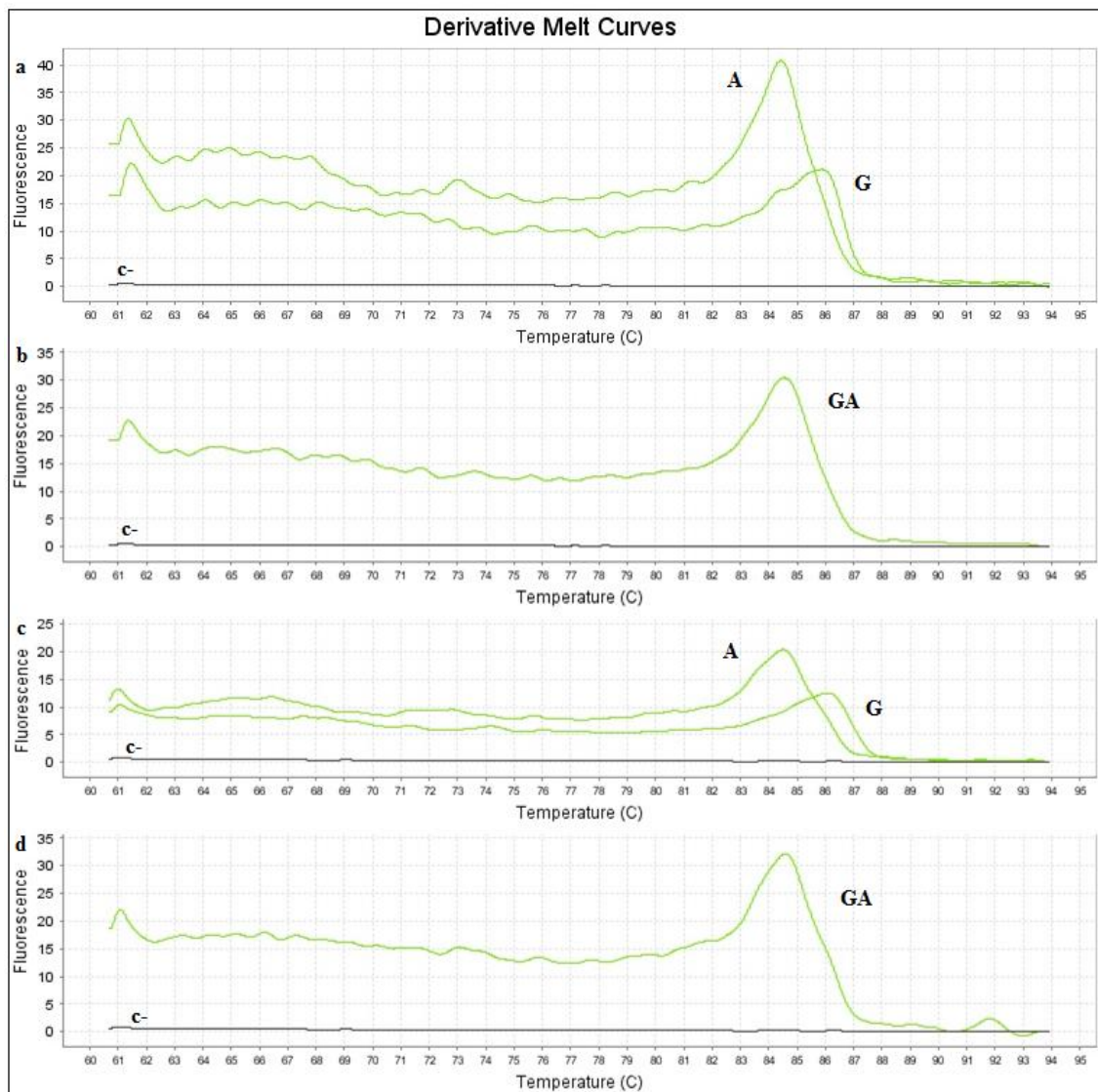


Figura 1: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – Pico homocigótico para A a 84,5°C e para G a 86°C (curvas A e G, respetivamente). b e d – O pico heterocigótico apenas é apresentado a 84,5°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

i.i.ii. Variação da quantidade de *primers* nas reações de PCR

De forma a aumentar a intensidade dos picos das curvas de *melting*, principalmente o G, para tentar igualar a sua fluorescência ao pico da curva A, e para ultrapassar o facto do controlo heterocigótico apresentar apenas um pico, aumentou-se a quantidade de *primers* nas reações. As condições foram as mesmas das reações apresentadas anteriormente, mas agora com diferentes concentrações de *primers*:

0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse*. O resultado está apresentado na Figura 2.

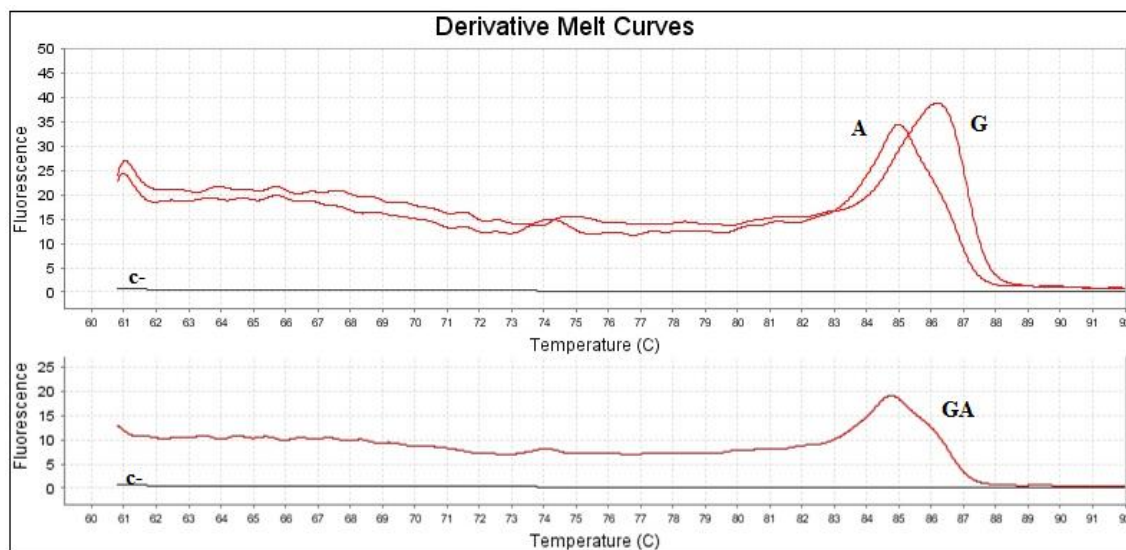


Figura 2: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A a 85°C e para G a 86°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico apenas é apresentado a 84,5°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Dos resultados da Figura 2 verifica-se que o aumento de quantidade do *primer* específico para o nucleótido G levou, como esperado, ao aumento da intensidade do sinal. No entanto há desvantagens que se destacam: a T_m da curva A agora é de 85°C o que se aproxima bastante da curva G (T_m aproximadamente a 86°C) e o fragmento heterocigótico continua a possuir apenas um pico aos 84,5°C.

O aumento ainda maior apenas da concentração do *primer* específico para o alelo G (0,30 μ M) produziu resultados semelhantes aos apresentados na Figura 2 (dados não mostrados).

i.i.iii. Alteração da temperatura de *annealing*

Na tentativa de aumentar a especificidade dos *primers* realizaram-se reações de PCR com 40 ciclos mas com um aumento de temperatura de *annealing* para 62°C. As restantes condições de PCR e a quantidade de *primers* foram as mesmas que as apresentadas nas reações da Figura 2, assim como os próprios resultados (dados não mostrados).

Também se realizaram reações a 62°C de temperatura de *annealing*, e 40 ciclos de PCR, com 0,15µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20µM *primer reverse* e outras reações com 0,30µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20µM *primer reverse*, mas os resultados (dados não mostrados) foram semelhantes aos da Figura 2, ou seja, picos de diferentes alelos com Tm muito próximas e heterozigótico apenas com um pico na curva de *melting*.

i.i.iv. Primers específicos em reações de PCR independentes

Uma vez que não foi possível otimizar a técnica AS-PCR para o NOS1_rs77074921 com a utilização de *primers* específicos combinados na mesma reação de PCR, foram testados os resultados com os *primers* específicos em reações de PCR independentes. O objetivo foi perceber se um dos *primers* estava a ser mais específico que o outro, nomeadamente por não ocorrer dois picos no fragmento heterozigótico.

A Figura 3 apresenta o produto de amplificação das reações realizadas a 40 ciclos de PCR, 60°C de temperatura de *annealing*, 0,10µM de *primer* específico para um dos alelos (com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3') e de *primer reverse* e 0,000004ng/µL de fragmentos de controlo positivo. Na Figura 3a, a curva G corresponde à reação onde se adicionou *primer* específico para o alelo G e fragmento de controlo positivo com o nucleótido G na posição do SNP e a curva de *melting* A (letra indicada a vermelho) corresponde à reação onde se adicionou *primer* específico para o alelo G e fragmento de controlo positivo com o nucleótido A na posição do SNP. Na Figura 3b, a curva A corresponde à reação onde se adicionou *primer* específico para o alelo A e fragmento de controlo positivo com o nucleótido A na posição do SNP e a curva G (letra indicada a vermelho) corresponde à reação onde se adicionou *primer* específico para o alelo A e fragmento de controlo positivo com o nucleótido G na posição do SNP. Na Figura 3c, as curvas de *melting* GA-A e GA-G correspondem a reações com *primer* específico para os alelos A e G, respetivamente, e com fragmento de controlo positivo heterozigótico.

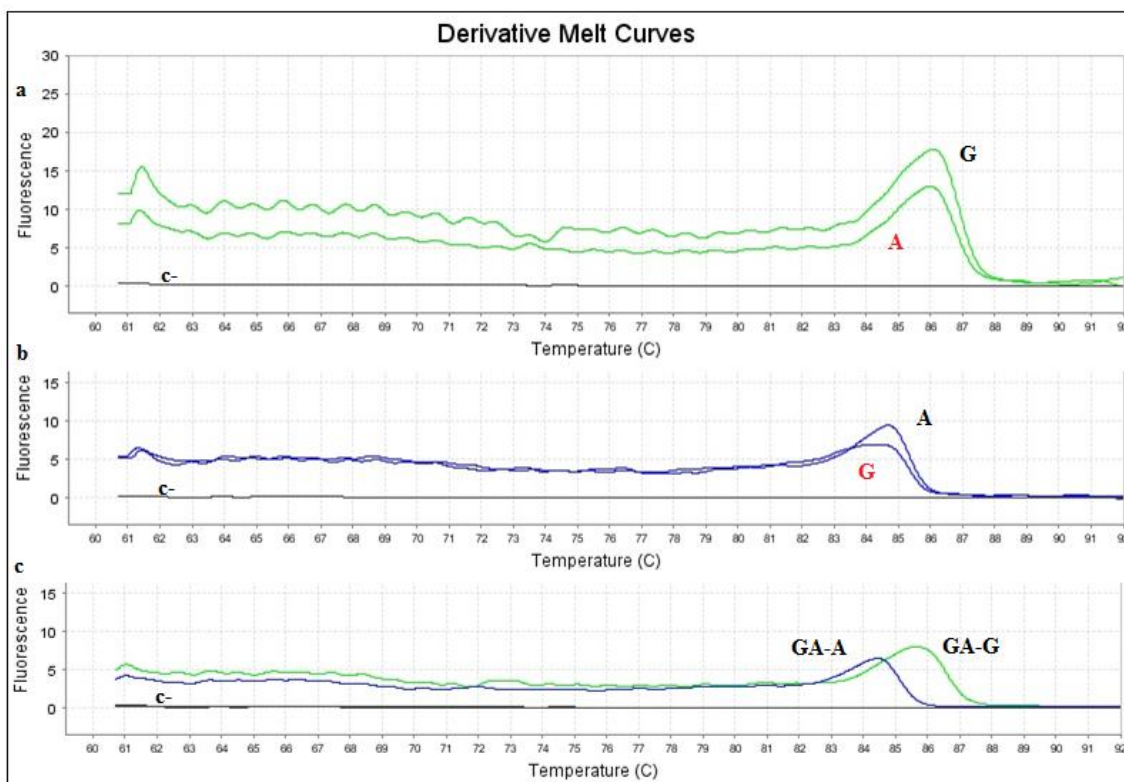


Figura 3: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', em poços de reação independentes e de *primer reverse*. Adição de 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Reação com *primer* específico para o alelo G com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G, Tm=86°C) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido A (curva A, Tm=86°C) na posição do SNP. b) Reação com *primer* específico para o alelo A com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido A (curva A, Tm=84,5°C) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G, Tm=84°C). a e b – Pico homocigótico para A aproximadamente a 84,5°C e para G a 86°C. c) Picos do controlo heterocigótico a 84,5°C (curva GA-A) e a 85,5°C (curva GA-G). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Estes resultados mostram que a adição de *primers* específicos, em reações independentes, com os fragmentos de controlo positivo para cada um dos alelos (G e A), não permitem determinar o alelo na amostra em estudo. Na Figura 3a, o pico do alelo G encontra-se a uma Tm de 86°C e em (b) o pico do alelo A encontra-se a aproximadamente 84,5°C, Tm válidas para inferir o genótipo dos indivíduos. No entanto, em (a), o fragmento com o alelo A na posição do SNP não possuía o seu *primer* específico para amplificar, mas ocorreu amplificação do produto, e o mesmo aconteceu para a reação em (b), onde o fragmento com o alelo G na posição do SNP não possuía o seu *primer* específico para amplificar mas a amplificação acabou por ocorrer. Apenas se verifica que as reações independentes resultam para os fragmentos heterocigóticos (curva GA-A, Tm=84,5°C e curva GA-G, Tm=85,5°C). Com estes resultados conclui-se

que estes *primers* não são tão específicos para amplificarem apenas a sequência de DNA com o SNP correspondente e, portanto, foi necessário desenhar outros *primers*.

i.i.v. *Primers sem mismatch vs primers com mismatch*

De forma a aumentar a especificidade dos *primers* nas reações com estes no mesmo poço de reação, nomeadamente no que diz respeito às T_m dos *primers* específicos que até aqui eram muito próximas e do facto do produto amplificado do fragmento heterozigótico nunca ter separado em dois picos, foram utilizados os *primers* anteriores, mas agora desenhados sem *mismatch* e com *mismatch* numa outra posição do *primer*, na antepenúltima base da extremidade 3', como está indicado a verde na Tabela III. Com o intuito de aumentar mais a diferença entre as T_m foram acrescentados resíduos G e C na cauda da extremidade 5' dos *primers* específicos, regra geral no de T_m superior: 21 bases GC para o *primer* sem *mismatch* e 22 para o *primer* com *mismatch* na antepenúltima base, permitindo uma diferença de até 4°C entre as T_m dos *primers* específicos. Foram na mesma adquiridos *primers* com uma cauda com 15 bases GC de forma a testar qual o melhor conjunto de *primers*. O *primer reverse* manteve-se o mesmo utilizado até aqui e encontra-se novamente apresentado na Tabela III.

Tabela III: Pares de *primers* (F=*forward* e R=*reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica AS-PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada ampliação e respectivo tamanho do ampliação em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas e o número de bases que a compõem está indicado na coluna imediatamente antes da sequência dos *primers*. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T_m	T_m ampliação	Tamanho ampliação
			(°C)		
NOS1_ rs77074921	F-15	5'-ggcgccgcgcggcGAGCTGATGGAATAGTAGCG-3'	60	87	142/156- 162 pb
	F-21	5'-cggcgccgcgcggcGAGCTGATGGAATAGTAGCG-3'	60	88	
	F	5'-GGAGCTGATGGAATAGTAGCA-3'	62	85	
	F-15	5'-ggcgccgcgcggcGGAGCTGATGGAATAGTAAACG-3'	62	87	142/157- 164 pb
	F-22	5'-gcgccgcgcggcGGAGCTGATGGAATAGTAAACG-3'	62	88	
	F	5'-GGAGCTGATGGAATAGTATCA-3'	60	84	
	R	5'-GCAGGAGTACGAGGAATGGA-3'	62	-	

Seguidamente estão apresentadas diferentes reações, e os seus resultados, que puderam ser efetuadas com as várias combinações de *primers*. Na prática foram sempre

repetidos os ensaios com 0,001ng/μL e 0,000004ng/μL de fragmentos de controlo positivo, mas aqui apenas estão apresentados os resultados com uma das concentrações: a que resultou em picos mais definidos ou com mais intensidade quando os resultados nas duas deram semelhantes.

i.i.v.i. *Primers* específicos sem *mismatch* com cauda GC de 15 bases

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 4, foram utilizadas as seguintes condições: 0,10μM de *primers forward* específicos sem *mismatch*, com o *primer* específico para a deteção do alelo G com 15 bases GC na extremidade 5', 0,20μM de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo.

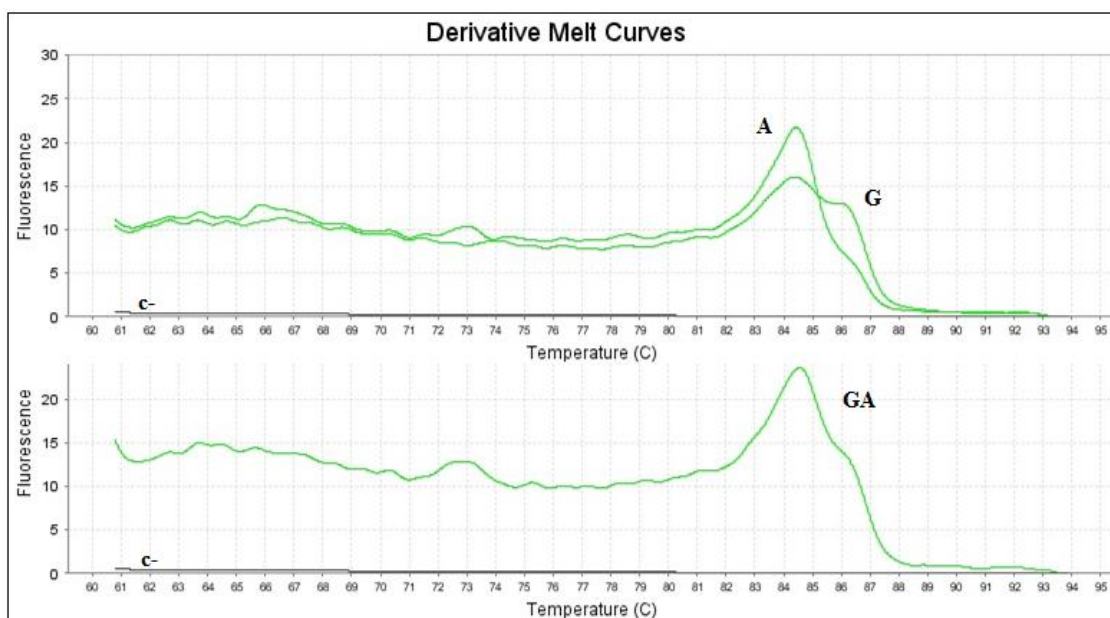


Figura 4: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10μM de *primers forward* específicos sem *mismatch* com o *primer* específico para a deteção do alelo G com 15 bases GC na extremidade 5' e 0,20μM de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A e G a 84,5°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico apenas é apresentado aos 84,5°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

A Figura 4 ilustra as curvas de *melting* do produto amplificado com os *primers* específicos sem *mismatch*, cujas curvas A e GA são muito semelhantes e, por isso, não se consegue distinguir um indivíduo homocigótico de heterocigótico, e a curva G não resultou num pico definido à T_m teórica, a 87°C. Os *primers* sem *mismatch* não são específicos porque apenas se obtiveram picos à T_m de aproximadamente 84°C para

ambos os alelos, o que não permite determinar, dessa forma, o alelo presente no fragmento.

i.i.v.ii. *Primers* específicos sem *mismatch* com cauda GC de 21 bases

Em reações posteriores foram utilizadas as mesmas condições apresentadas para a Figura 4, mas com os *primers forward* específicos sem *mismatch* e com o *primer* específico para a detecção do alelo G com cauda GC de 21 bases na extremidade 5'. O resultado encontra-se na Figura 5.

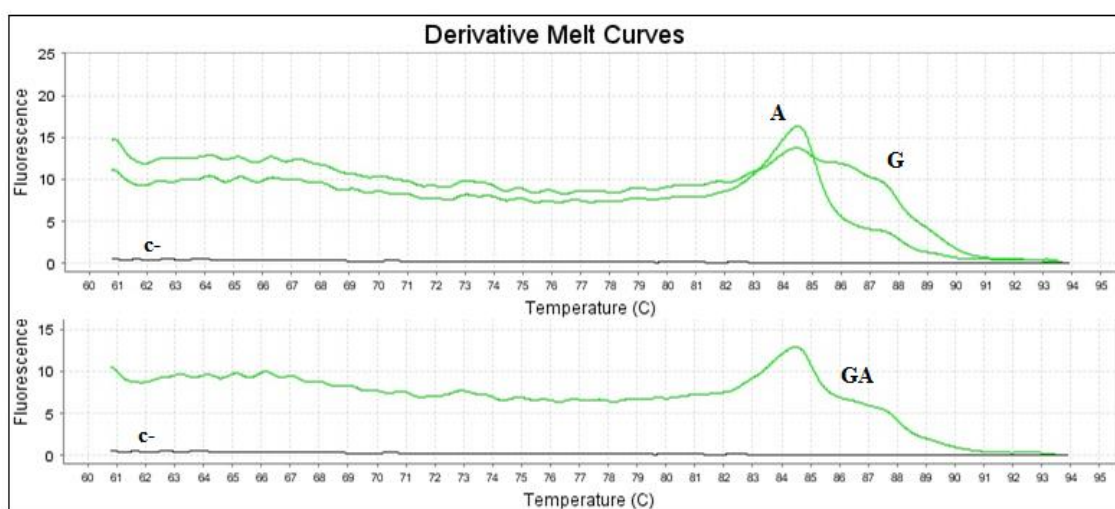


Figura 5: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch* com o *primer* específico para a detecção do alelo G com 21 bases GC na extremidade 5' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A a 84,5°C e sem pico homocigótico para G (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico (curva GA) apenas é apresentado a 84,5°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

De acordo com a Figura 5 a curva G não possui qualquer pico e a curva A tem um pico aos 84,5°C, próximo da T_m teórica. A curva GA, controlo positivo heterocigótico, continua a não apresentar dois picos, representativos de cada alelo, com esta combinação de *primers*. Neste caso o aumento do número de bases na cauda poderá ter influenciado a amplificação do produto, não permitindo que a curva de *melting*, identificadora do alelo G, possuísse um pico.

Destes dois exemplos conclui-se que os *primers* sem *mismatch* não são específicos para esta técnica.

i.i.v.iii. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 6, foram utilizadas as mesmas condições apresentadas para as figuras anteriores (4 e 5), mas com os *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e com o *primer* específico para o alelo G com 15 bases GC na extremidade 5'.

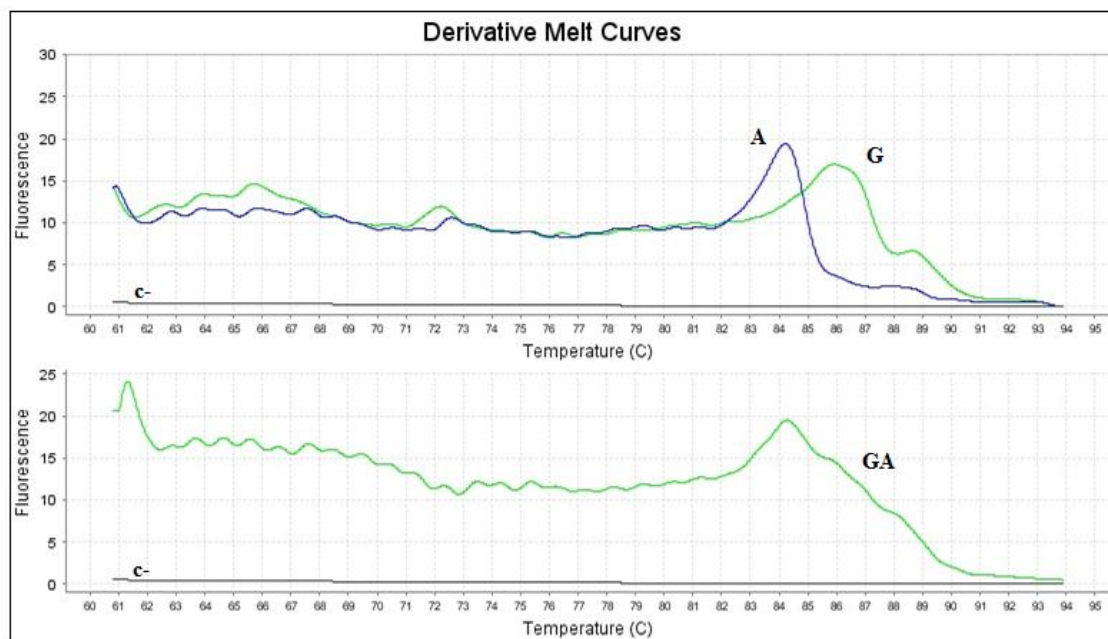


Figura 6: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos, com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', com o *primer* específico para o alelo G com 15 bases GC na extremidade 5', e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A a 84°C e para G a 86°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico apenas é apresentado a 84°C (curva GA). Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Destes resultados destaca-se a separação evidente dos picos das curvas de *melting* devido à existência de uma diferença de 3°C entre as T_m , o que permite identificar o alelo presente nos fragmentos sem margem para dúvidas. Mas novamente ainda não existe separação, em dois picos, do produto amplificado do fragmento heterocigótico.

i.i.v.iv. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 22 bases

Os resultados de reações que utilizaram as mesmas condições apresentadas para as figura anteriores (4, 5 e 6) mas com os *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e com o *primer* específico para o alelo G com 22 bases GC na extremidade 5' são muito semelhantes à Figura 5. A curva G (nucleótido G na posição do SNP) também não apresentou qualquer pico e a curva A (nucleótido A na posição do SNP) obteve um pico igual à Tm teórica, a 84°C. Não foi possível obter dois picos para o controlo positivo heterozigótico (dados não mostrados). Novamente se verifica que provavelmente devido ao número elevado de bases na cauda GC no *primer* específico, não há uma curva com um pico definido que represente o alelo G.

i.i.v.v. *Primers* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases (alelo G) e na antepenúltima base (alelo A)

Ainda se realizou outra combinação de *primers* com o objetivo de tentar melhorar os resultados até então obtidos. Assim, combinaram-se *primers forward* específicos para os alelos G e A com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, com o *primer* específico para o alelo G com 15 bases GC na extremidade 5', nas mesmas condições apresentadas anteriormente no ponto i.i.v.iii. Os resultados encontram-se na Figura 7.

Em comparação com a Figura 6, os resultados apresentados na Figura 7 são melhores, pois apresentam um pico muito mais definido para o alelo G (curva G). Foi a partir deste resultado que se continuou a otimização do SNP de forma a ser possível genotipar os DNAs dos doentes.

De forma a aumentar a intensidade da curva G, realizaram-se reações nas mesmas condições mas com 0,15µM de *primer forward* específico para o alelo G com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', cujo resultado foi de encontro ao esperado, ou seja, a curva G igualou, em termos de intensidade, a curva A da Figura 7 (dados não mostrados).

Fizeram-se também reações nas mesmas condições de PCR com 0,20 μ M de *primer forward* específico para o alelo G com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e ainda com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers* específicos para os alelos G e A com *mismatch* na penúltima e antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,30 μ M de *primer reverse*, mas resultaram em curvas menos definidas que as da Figura 7 (dados não mostrados).

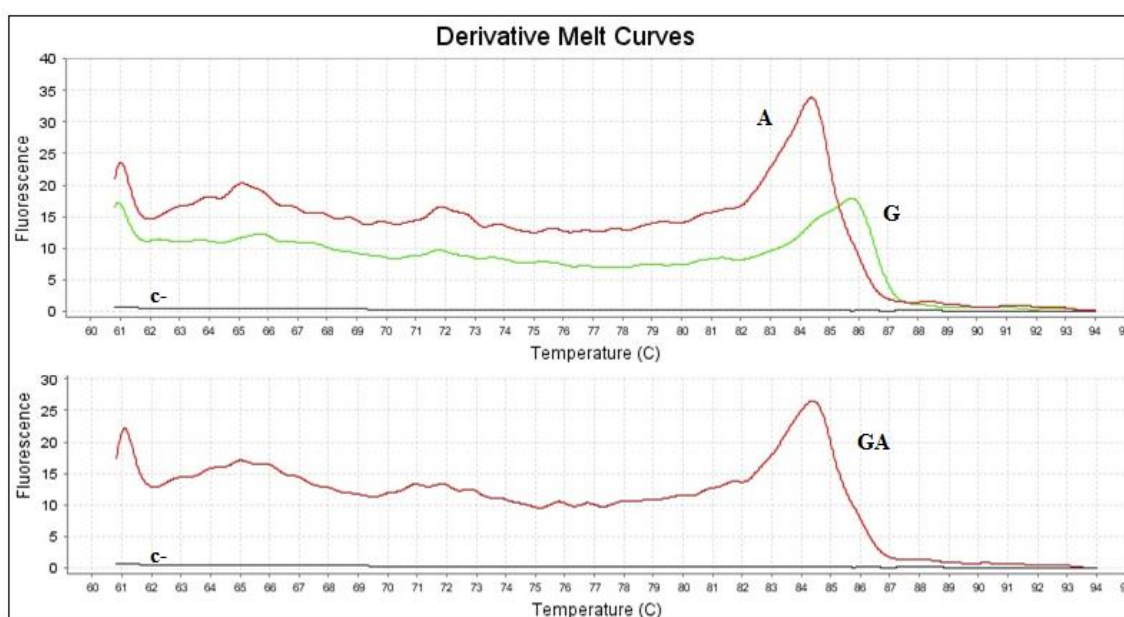


Figura 7: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos G e A com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, com o *primer* específico para o alelo G com 15 bases GC na extremidade 5' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A aproximadamente a 84,5°C e para G a 86°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico apenas é apresentado aos 84,5°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

i.i.vi. Fragmentos homocigóticos de controlo positivo, em diferentes proporções, para originar heterocigótico

Como o fragmento heterocigótico nunca apresentou dois picos, foi elaborado um DNA heterocigótico com proporções diferentes de fragmentos G e A. O objetivo foi tentar perceber se com mais fragmento G (0,15 μ M de *primer forward* específico para o alelo G com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3') a curva aparecia com dois picos (Figura 8). A proporção de fragmento G utilizada em relação ao fragmento A foi 2:1 e as restantes condições de PCR foram as mesmas utilizadas para obter a Figura 7.

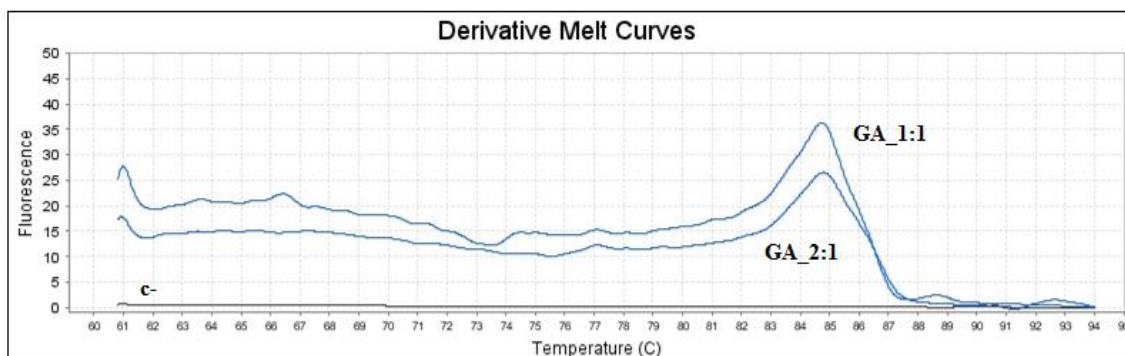


Figura 8: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos G e A com *mismatch* na penúltima e antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, com o *primer* específico para o alelo G com 15 bases GC na extremidade 5' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Sobreposição das curvas heterozigóticas com proporção de fragmentos de controlo positivo de 1:1 (curva GA_1:1) e de 2:1 (curva GA_2:1) (fragmento G:fragmento A) que apenas apresentam picos aproximadamente aos 84,5°C. Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Ainda assim esta estratégia não resultou, talvez devido à especificidade dos *primers*.

Posteriormente voltou-se a utilizar o conjunto de *primers* específicos, ambos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e com o *primer* específico para a deteção do alelo G com 15 bases GC na extremidade 5', e procedeu-se de igual forma: primeiro aumentou-se a quantidade de *primers* para aumentar a intensidade dos picos em reações com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse* e depois com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,30 μ M de *primer reverse*. Os resultados das reações deste último conjunto de *primers* (dados não mostrados) mostrou um aumento da intensidade do pico da curva G maior que o de A e, por isso, voltou-se a utilizar as concentrações de *primers* iniciais (0,10 μ M de *primers forward* específicos e 0,20 μ M de *primer reverse*) (Figura 9) e ainda se realizou, nestas condições, uma reação com diferentes proporções de fragmentos para obter um heterozigótico (2:1, fragmento G:fragmento A) (Figura 9, curva GA_2:1).

Assim conclui-se aqui a otimização, considerando-se as condições de reação óptima as da Figura 9 e com fragmento heterozigótico na proporção de 1:1 (Figura 3.4, Capítulo 3 – Resultados). Embora o controlo heterozigótico não apresentem dois picos como indicativos de um DNA heterozigótico, a curva GA apresenta um perfil diferente das curvas correspondentes aos alelos G e A e, por isso, foi considerada como válida na identificação do genótipo das amostras de DNA.

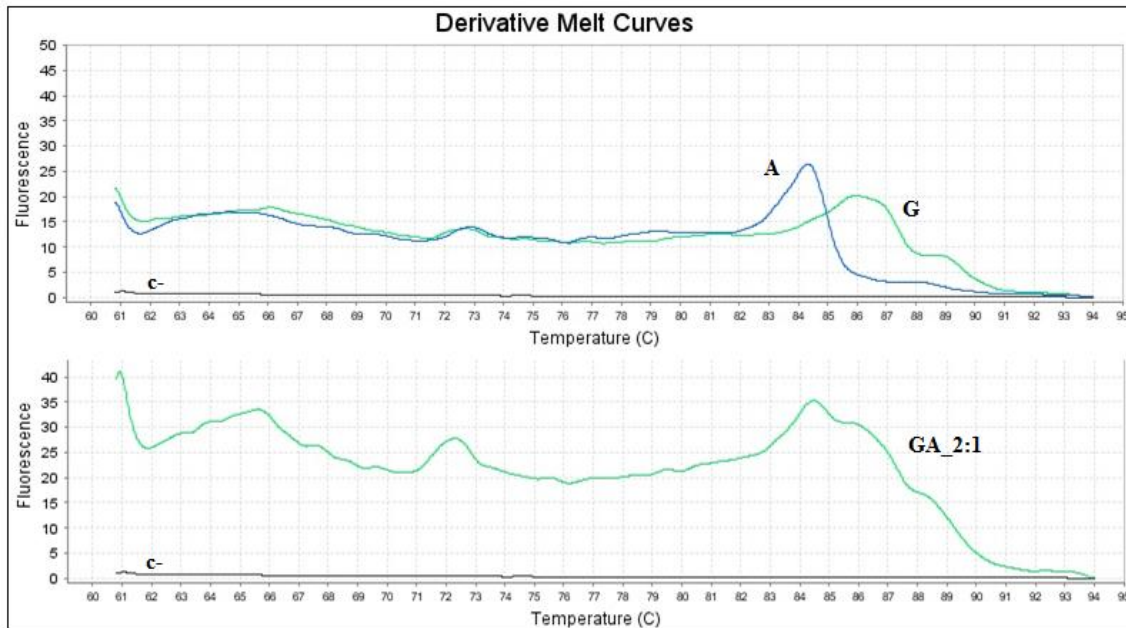


Figura 9: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs77074921. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e com o *primer* específico para a detecção do alelo G com 15 bases GC na extremidade 5' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A a 84,5°C e para G a 86°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterocigótico obtido com proporção de fragmentos de controlo positivo de 2:1 (fragmento G:fragmentoA) apenas é apresentado aos 84,5°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

O genótipo encontrado para este SNP, nas amostras de DNA consideradas neste estudo, encontram-se no Capítulo 3 – Resultados (Figuras 3.1, 3.3 e 3.4).

De igual forma procedeu-se à otimização do SNP NOS1_rs76839820 com pequenas alterações em relação aos passos anteriormente seguidos para o NOS1_rs77074921.

i.ii. rs76839820 (G/A)

Para a otimização do NOS1_rs76839820 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

i.ii.i. Primers específicos no mesmo poço de reação de PCR

Com o mesmo objetivo que para o SNP apresentado anteriormente, foram realizadas reações de PCR com ambos os *primers* específicos no mesmo poço de

reação. Para as reações foram utilizados 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L (Figura 10 a e b) e 0,000004ng/ μ L (Figura 10 c e d) de fragmentos de controlo positivo.

Da comparação dos resultados das duas diferentes concentrações de fragmentos de controlo positivo, verificou-se que devido a uma maior semelhança entre os picos das curvas de *melting*, a melhor concentração para continuar com a otimização era de 0,001ng/ μ L (Figura 10 a e b).

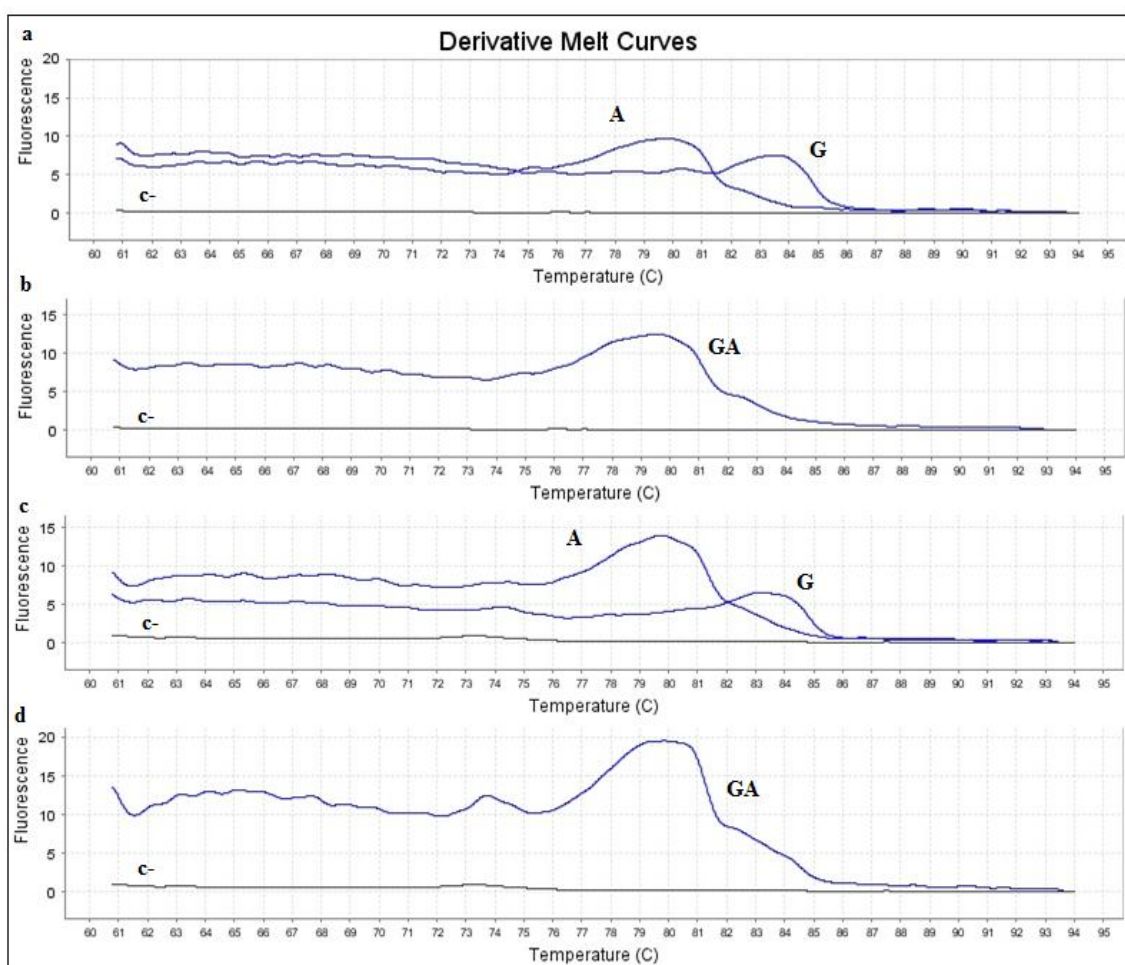


Figura 10: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – Pico homocigótico para A a 80°C e para G a 83,5°C (curvas A e G, respetivamente). b e d – O pico heterocigótico apenas é apresentado aproximadamente a 80°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

i.ii.ii. Variação da quantidade de *primers* nas reações de PCR

Para aumentar a intensidade dos picos das curvas de *melting*, principalmente o G, de forma a tentar igualar a sua fluorescência ao de A, e para tentar que o controlo heterozigótico também tivesse um pico aos 84°C, aumentou-se a quantidade de *primers* nas reações. Foram realizadas reações nas mesmas condições apresentadas em i.ii.i., mas com diferentes concentrações de *primers*. Inicialmente foram utilizados 0,20µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20µM de *primer reverse*. Posteriormente realizaram-se reações com 0,20µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,30µM de *primer reverse*. E por último, cujo resultado está apresentado na Figura 11, utilizaram-se reações com 0,20µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,40µM de *primer reverse*. Em ambas as reações a intensidade das curvas de *melting* foi aumentando gradualmente de acordo com a quantidade de *primer reverse* que estava mais disponível em cada reação (dados não mostrados). Mas foi nestas últimas reações (Figura 11) que se verificou um pequeno pico mais evidente, em direção à T_m correspondente ao alelo G, na curva do fragmento heterozigótico.

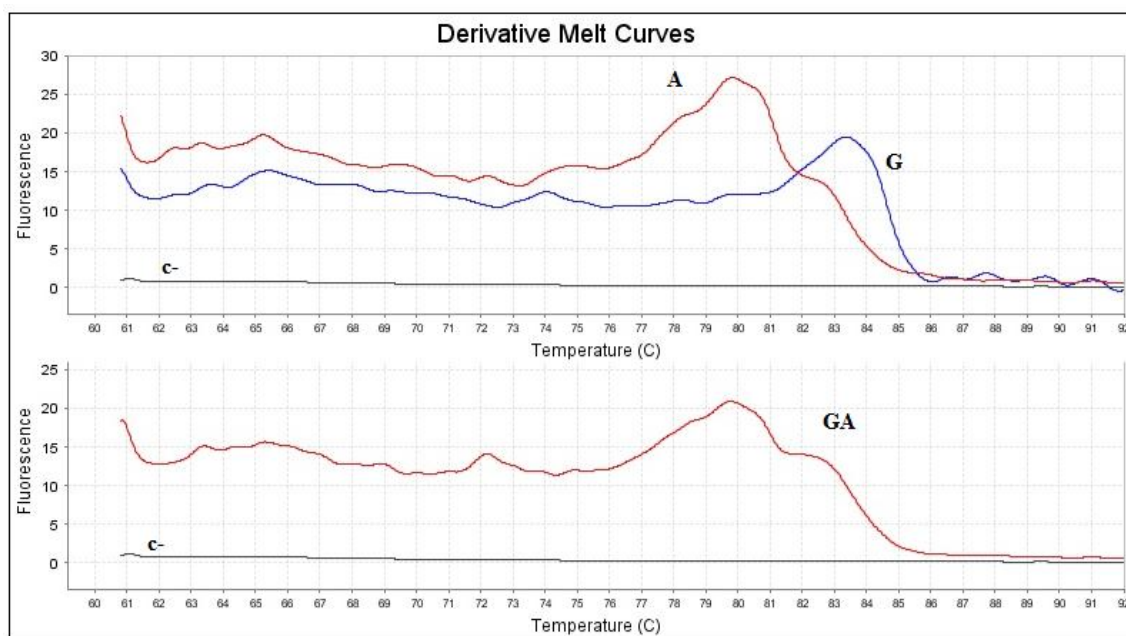


Figura 11: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,20µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,40µM de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/µL de fragmentos de controlo positivo. Pico homozigótico para A a 80°C e para G aproximadamente a 83,5°C (curvas A e G, respetivamente). O pico heterozigótico apenas é apresentado aproximadamente aos 80°C (curva GA). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

A Figura 11 representa curvas mais definidas para os alelos presentes nos fragmentos (curva A e G) e para o fragmento heterozigótico (curva GA) há a presença de um pico (correspondente ao alelo A), mas também a formação de uma pequena curva que certamente correspondente ao alelo G. No entanto, as curvas A e GA continuam a ser muito semelhantes.

i.ii.iii. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

Devido à não separação evidente dos picos no controlo heterozigótico e da mesma forma que se procedeu no SNP anterior, foram testados os resultados com *primers* específicos em reações de PCR independentes. As condições de reação foram as mesmas utilizadas no ponto i.i.iv. e os resultados encontram-se na Figura 12.

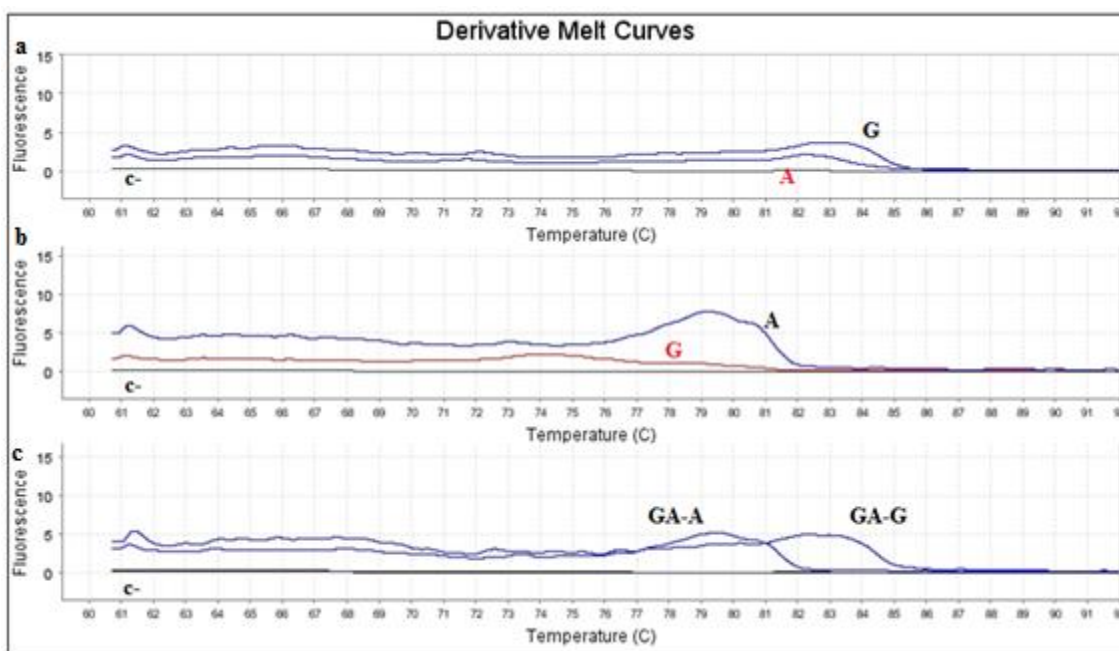


Figura 12: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', em poços de reação independentes e de *primer reverse*. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Reação com *primer* específico para o alelo G com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido A (curva A) na posição do SNP. b – Reação com *primer* específico para o alelo A com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido A (curva A) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G) na posição do SNP. a e b – Pico homocigótico para A aproximadamente a 79°C e para G aproximadamente a 83°C. c – Picos do controlo heterocigótico a 79,5°C (curva GA-A) e a 83°C (curva GA-G). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Neste resultado, os fragmentos que não deviam ter amplificado por não possuírem *primer* específico para tal (a vermelho) encontram-se negativos como esperado, o que torna este um bom resultado para a identificação dos alelos nas

amostras. Quando se tentou aumentar as quantidades de *primer* para aumentar a intensidade do sinal (0,30µM e 0,20µM de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, e 0,20µM de *primer reverse*) já voltou a acontecer o mesmo que no NOS1_rs77074921 (Figura 3), em que os fragmentos que não deviam ter amplificado por não possuírem *primer* específico, também amplificaram (dados não mostrados).

i.ii.iv. Primers sem mismatch vs primers com mismatch

Para ultrapassar as baixas intensidades dos picos das curvas de *melting* e de forma a possibilitar a realização de reações com os *primers* específicos combinados, por serem mais fáceis e rápidas, foram desenhados *primers* semelhantes aos utilizados até aqui, mas sem *mismatch* ou com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' (Tabela IV). Para este SNP não foi necessário aumentar o número de bases na cauda GC como anteriormente havia sido feito para o NOS1_rs77074921. Com uma cauda de 15 bases GC continuou a manter-se uma diferença de 4°C entre as T_m dos fragmentos resultantes que, de acordo com os últimos resultados, tem permitido uma boa separação dos picos nas curvas de identificação dos alelos.

Tabela IV: Pares de *primers* (F=*forward* e R=*reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica AS-PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplificação e respectivo tamanho do amplificação em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas e o número de bases que a compõem está indicado na coluna imediatamente antes da sequência dos *primers*. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T _m	T _m amplificação	Tamanho amplificação
			(°C)		
NOS1_rs76839820	F-15	5'-ggcgccgcgcgggcAGGTGGTCTCCAGGTGC G -3'	60	85	89/103 pb
	F	5'-AAGGTGGTCTCCAGGTGC A -3'	60	81	
	F-15	5'-ggcgccgcgcgggcAAGGTGGTCTCCAGGT ACG -3'	60	84	89/104 pb
	F	5'-AAGGTGGTCTCCAGGT TCA -3'	58	80	
	R	5'-GAGGTACTCAGAGGCATTG-3'	58	-	

As reações e os seus resultados, que se efetuaram com as várias combinações de *primers*, encontram-se de seguida.

i.ii.iv.i. Primers específicos sem mismatch

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 13, foram utilizadas as seguintes condições: 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch*, com o *primer* específico para a detecção do alelo G com 15 bases GC na extremidade 5', 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo.

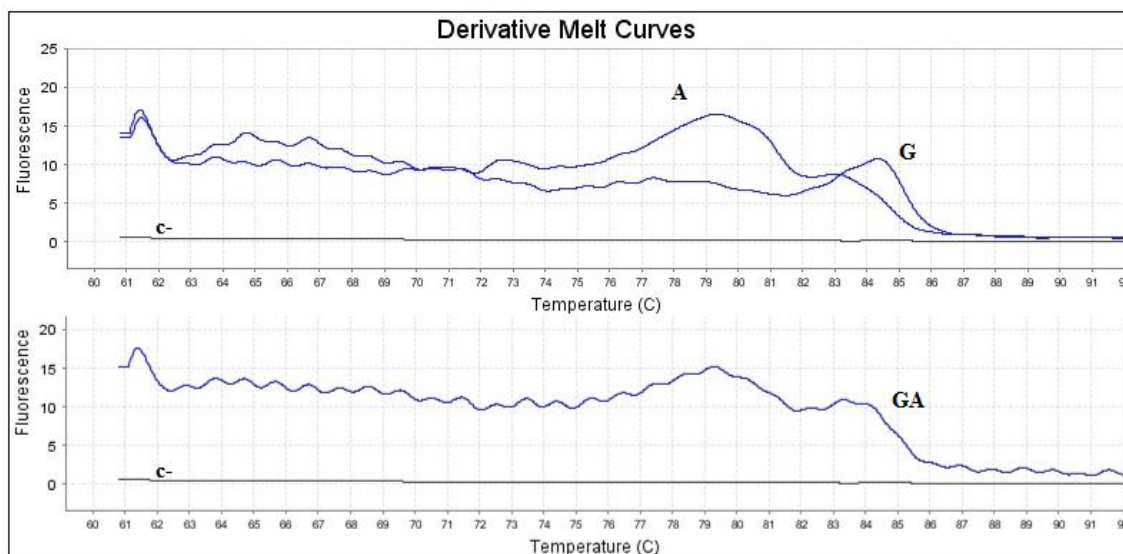


Figura 13: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch* e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A aproximadamente a 79,5°C e para G aproximadamente a 84,5°C (curvas A e G, respetivamente). Picos do controlo heterocigótico aproximadamente a 79,5°C e a 84°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

No caso da utilização de *primer* sem *mismatch* (Figura 13) apresenta-se uma grande diferença entre as T_m , o que permitiu separar bem os picos, embora estejam um pouco abaixo dos seus valores teóricos. Com estas condições de reação, o fragmento heterocigótico já separa o seu produto amplificado em dois picos, mas neste ensaio com algum barulho de fundo.

i.ii.iv.ii. Primers específicos com mismatch na antepenúltima base da extremidade 3'

O próximo passo foi a combinação de *primers* com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' (Tabela IV). As reações foram elaboradas nas mesmas condições que o ponto i.ii.iv.i e os resultados estão apresentados na Figura 14.

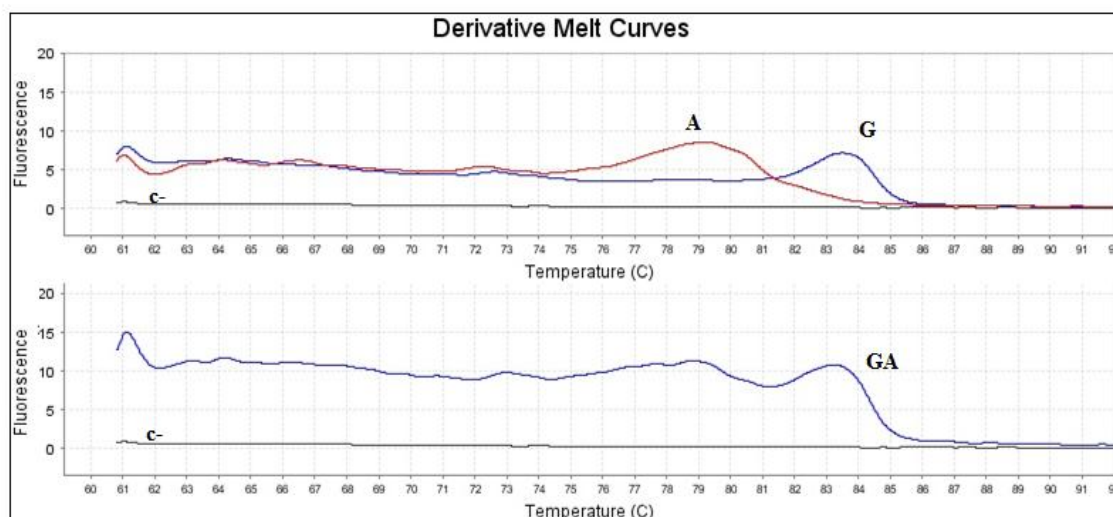


Figura 14: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para A aproximadamente a 79°C e para G aproximadamente a 83,5°C (curvas A e G, respetivamente). Picos do controlo heterocigótico aproximadamente a 79°C e a 83°C. Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Este resultado é o mais favorável de todos, pois para além dos picos separarem nas T_m próximas das teóricas, também o fragmento heterocigótico apresenta dois picos.

Ainda se realizaram outras reações com diferentes concentrações de *primers*: 0,15 μ M e 0,20 μ M de *primers forward* específicos para os alelos G e A, respetivamente, com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse*. O resultado foi uma maior intensidade dos picos, principalmente para o correspondente ao alelo A, mas com o fragmento heterocigótico (GA) com barulho de fundo, tal como na Figura 13, talvez por estas reações possuírem muita quantidade de *primer reverse* (dados não mostrados). Com 0,15 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse*, não se deu a separação da curva de *melting* heterocigótica em dois picos (dados não mostrados). Com 0,15 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse*, houve diminuição da intensidade do pico do alelo A para equilibrar com o G e desta forma também deixou de ocorrer o barulho de fundo no fragmento heterocigótico (dados não mostrados). Com 0,20 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse* levou a um pouco mais de aumento da intensidade das curvas de ambos os alelos e o fragmento heterocigótico continuou a não possuir barulho de fundo (Figura 15). Estas ficaram as concentrações finais dos *primers* para prosseguir com a genotipagem do SNP, utilizando 1ng/ μ L de DNA.

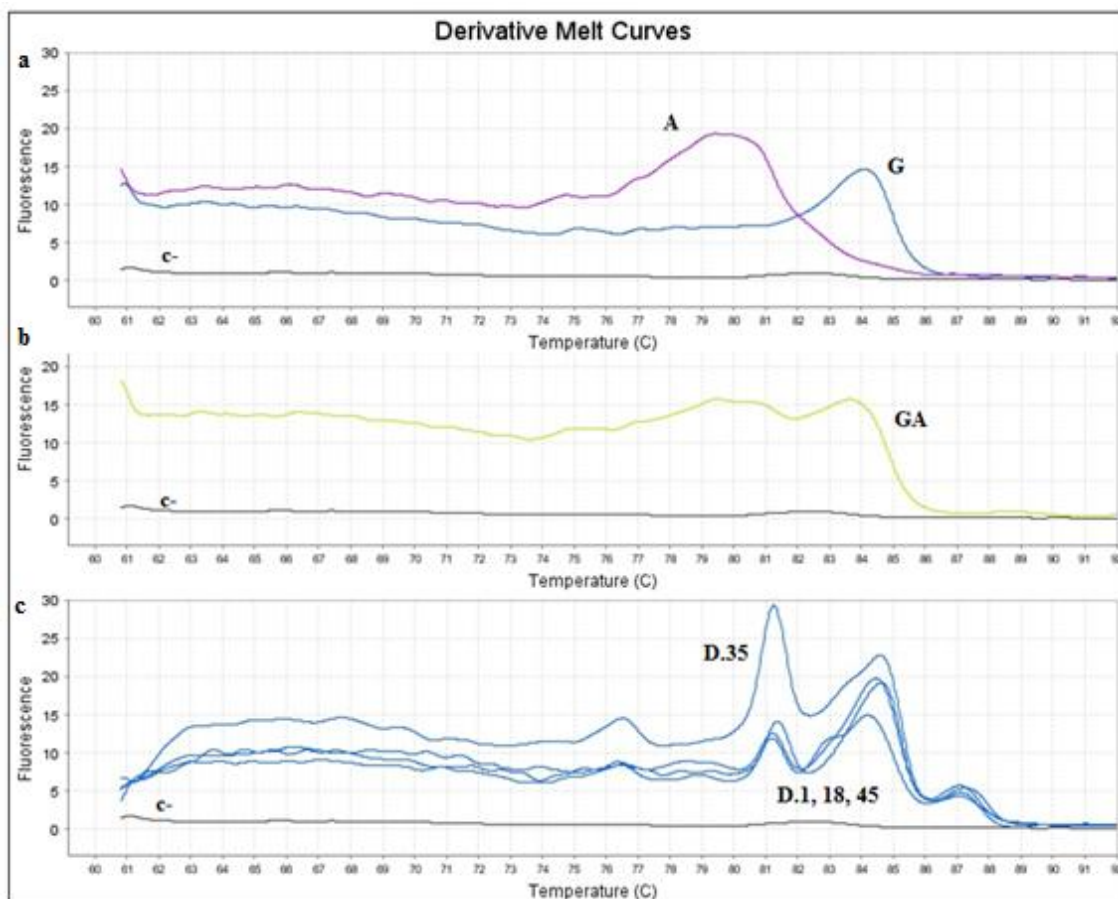


Figura 15: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,20 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo e 1ng/ μ L de DNA. a – Pico homocigótico para A a 80°C e para G a 84°C (curvas A e G, respetivamente). b – Picos do controlo heterocigótico aproximadamente a 80°C e 84°C (curva GA). c – Sobreposição das amostras números 1, 18, 35 e 45 (curvas D.1, 18, 35 e 45) que também possuem dois picos aproximadamente a 81°C e a 84,5°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Como existiam tantos picos nas curvas dos amplicões das amostras números 1, 18, 35 e 45, foi diminuída a quantidade de DNA utilizada nas reações e o resultado encontra-se na Figura 16, para as mesmas amostras. Utilizaram-se as condições anteriores mas agora com 0,5ng/ μ L de DNA.

Pela análise da Figura 16 verifica-se que a quantidade de DNA utilizada é a mais correta para produzir curvas de *melting* que permitem identificar os alelos presentes nas amostras. Considerando que a técnica estava otimizada para este SNP, foi então realizada a genotipagem das amostras dos doentes integrantes do fenótipo C. No entanto ainda se verificou que algumas curvas possuíam baixa intensidade e, por isso, aumentou-se a quantidade de DNA para 0,75ng/ μ L que também serviu para aumentar a especificidade da amostra 45 (curva D.45). Esses resultados encontram-se na Figura 17.

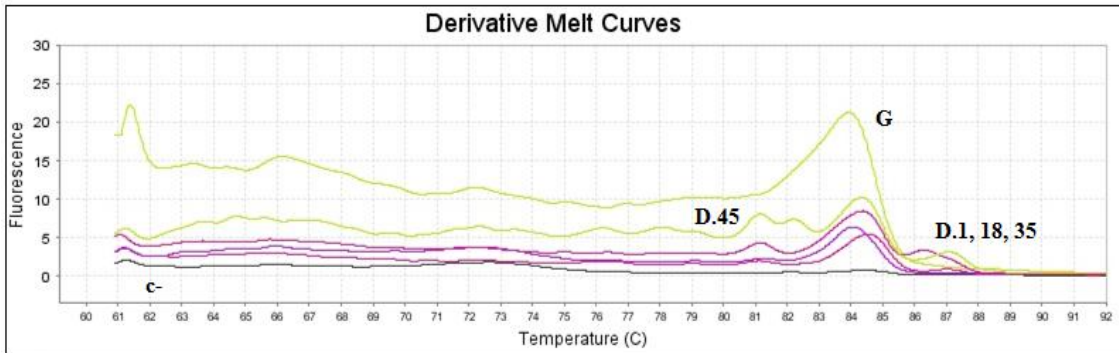


Figura 16: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,20 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo e 0,5ng/ μ L de DNA. Sobreposição do controlo positivo (curva G, pico homocigótico para G a 84°C) com as amostras números 1, 18, 35 e 45 (curvas D.1, 18, 35 e 45) que também possuem um pico aproximadamente a 84°C, à exceção da 45 que tem pico a 81°C e 82°C. Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

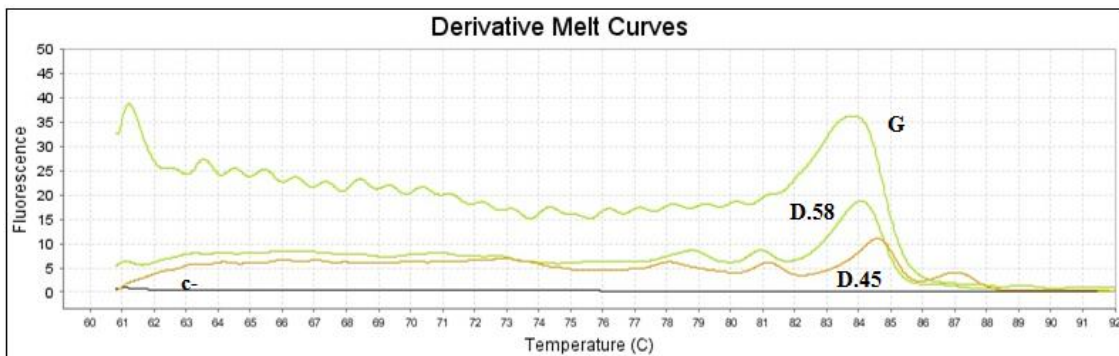


Figura 17: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,20 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo e 0,75ng/ μ L de DNA. Sobreposição do controlo positivo (curva G, pico homocigótico para G a 84°C) com as amostras números 45 e 58 (curvas D.45 e 58) que possuem um pico com maior intensidade aproximadamente aos 84°C. Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

O resultado ilustrado na Figura 17 apenas ocorreu para uma parte das amostras, mas não para outras como se pode observar na Figura 18.

Como não se obtinham picos para algumas amostras (D.67 e D.263) nas T_m correspondentes aos alelos e, dessa forma, não era possível saber qual/(ais) o(s) alelo(s) presente(s) nas amostras, foram sequenciadas 7 amostras (números 1, 18, 35, 45, 41, 67, 263) do fenótipo C. O genótipo para todas estas amostras é GG e com essa confirmação, posteriormente realizou-se a genotipagem do fenótipo B por AS-PCR. No início da genotipagem utilizaram-se 0,6ng/ μ L de DNA, menor que anteriormente se tinha utilizado, pois o pico aos 81°C da amostra 263 (e de muitas outras amostras que obtiveram uma curva semelhante a esta) poderia ser devido a uma quantidade superior de amostra. Como essas genotipagens nem sempre tinham o resultado pretendido, os

ensaios foram repetidos variando a quantidade de DNA entre 0,5ng/μL, 0,6ng/μL e 0,75ng/μL.

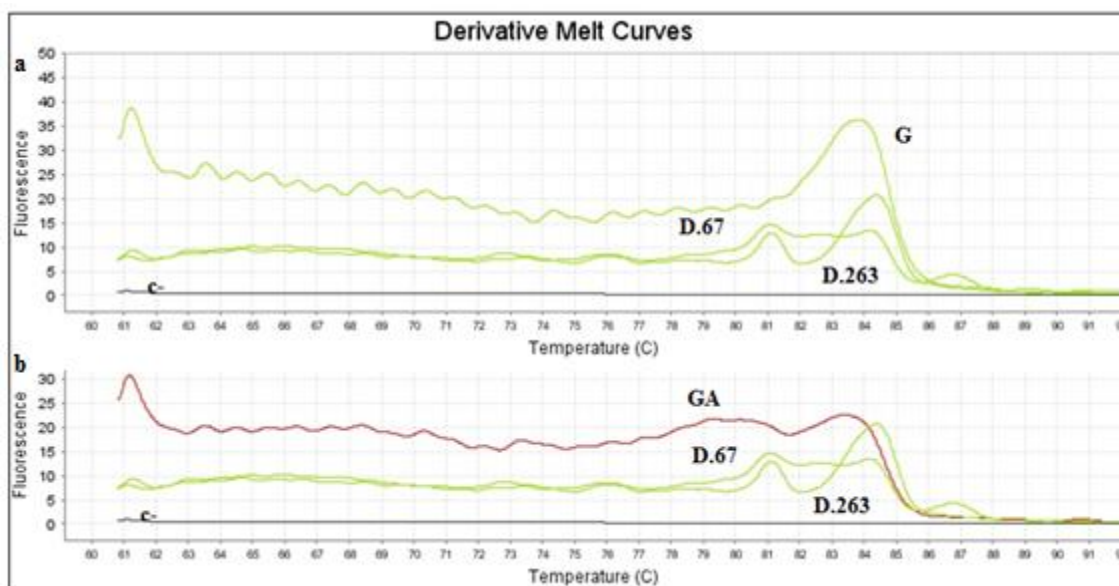


Figura 18: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_rs76839820. Reações com 0,20μM de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30μM de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo e 0,75ng/μL de DNA. a – Sobreposição do controlo positivo (curva G, pico homocigótico para G a 84°C) com as amostras números 67 e 263 (curvas D.67 e 263) que possuem dois picos, um a 81°C e outro a 84°C. b – Sobreposição do controlo positivo (curva GA, picos a 80°C e 83,5°C), com as mesmas amostras números 67 e 263 (curvas D.67 e 263). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

A Figura 19 representa o resultado das reações nas mesmas condições, mas com 0,6ng/μL de DNA, onde o controlo positivo para o alelo G é agora a amostra 263, cujo genótipo foi confirmado por sequenciação. Nesta figura ainda estão apresentadas as amostras 114, 142 e 300 (curvas D.114, D.142 e D.300) que representam outras amostras com perfil de curvas igual. Foi nestes casos que também se tentou genotipar, por AS-PCR, com as outras concentrações de DNA (0,5ng/μL e 0,75ng/μL).

Devido a estes resultados e também ao facto de, por vezes, os controlos negativo aparecerem positivos, realizaram-se novas diluições de *primers* do stock -80°C, mas os resultados foram semelhantes. No entanto, das amostras apresentadas, conseguiu-se obter uma curva com um pico na T_m correspondente ao alelo G para as amostras 114 e 300, mas não para a 142. Assim, foram sequenciadas mais 7 amostras de DNA, as duvidosas: 16, 142, 256, 281 (fenótipo C), 116, 223 e 274 (fenótipo B) que todas pareciam heterocigóticas por AS-PCR e por sequenciação resultaram homocigóticas para G (Anexo I).

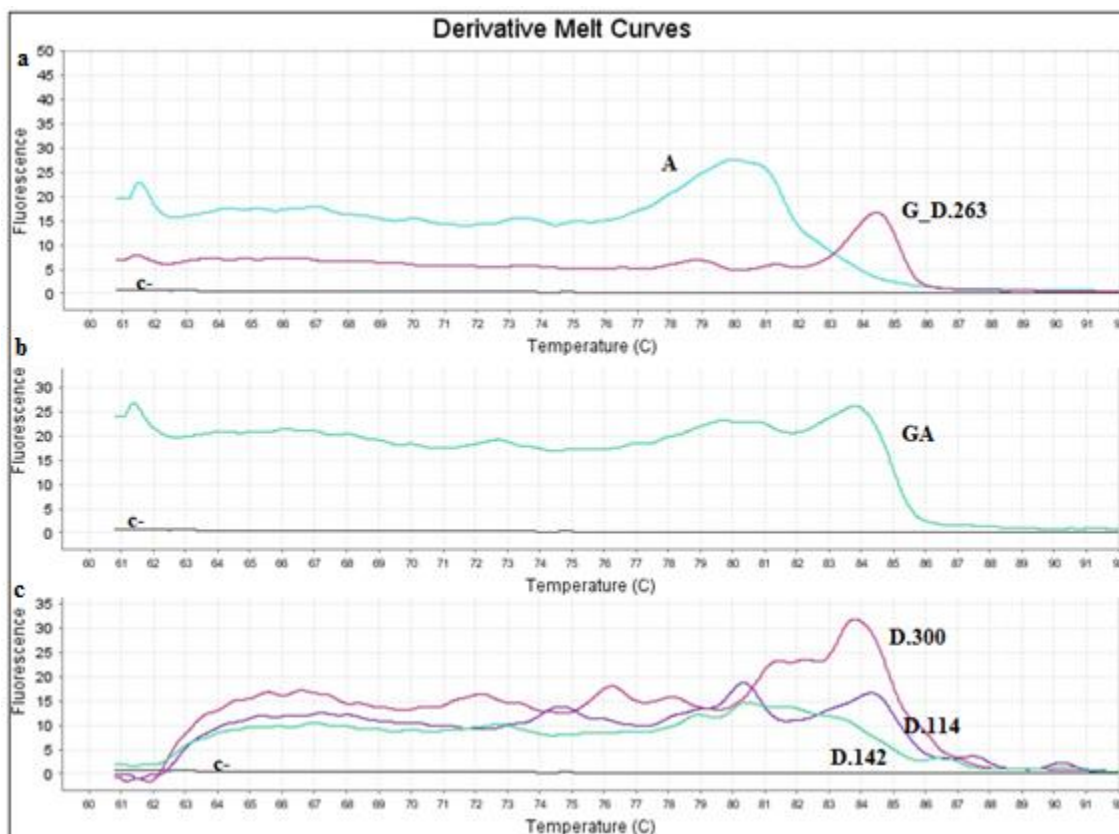


Figura 19: Curvas das derivadas de *melting* para o NOS1_ rs76839820. Reações com 0,20 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo e 0,6ng/ μ L de DNA. a – Pico homocigótico para A a 80°C (curva A) e para G aproximadamente a 84,5°C para a amostra número 263 (curva G_D.263). b – Picos do controlo heterocigótico aos 80°C e 84°C (curva GA). c – Sobreposição das amostras números 114, 142 e 300 (curvas D.114, D.142 e D.300). As curvas D.114 e D.300 possuem vários picos em posições diferentes das Tm dos controlos positivos e a amostra 142 (curva D.142) não apresenta nenhum pico. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

II. Gene MTHFR

ii.i. rs72552099 (T/G)

Este SNP foi dos primeiros a ser genotipado e por isso, numa fase inicial, a otimização começou com concentrações diferentes de *primers* e de fragmentos de controlo positivo até agora apresentadas. Os *primers* utilizados para a genotipagem deste SNP encontram-se na Tabela I.

ii.i.i. *Primers* específicos no mesmo poço de reação de PCR

A Figura 20 apresenta as curvas de *melting* do produto amplificado das amostras de controlo positivo correspondentes ao SNP MTHFR_rs72552099. As condições

comuns às 3 reações foram: 0,05 μ M de *primers*, com os *primers reverse* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 40 ciclos de PCR com temperatura de *annealing* de 60°C. Apenas foram alteradas as concentrações dos fragmentos de controlo positivo nas reações: a – 0,1ng/ μ L, b – 0,01 ng/ μ L e c – 0,001 ng/ μ L.

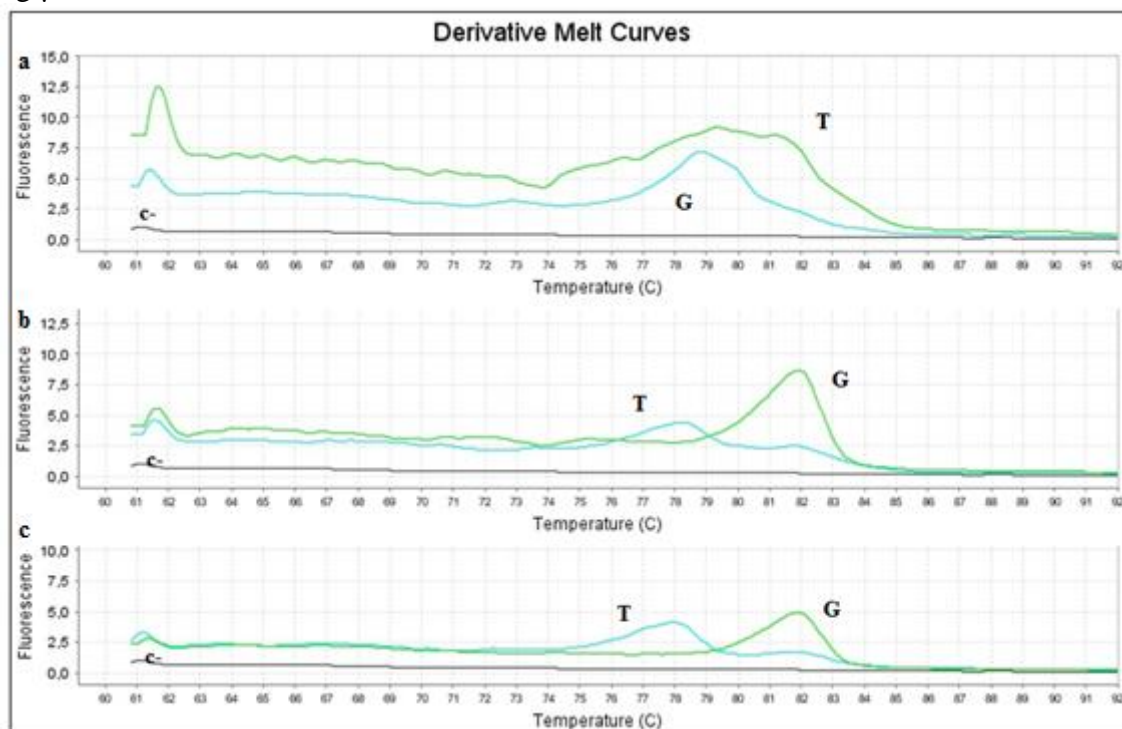


Figura 20: Curvas das derivadas de *melting* para o MTHFR_rs72552099. Reações com 0,05 μ M de *primers reverse* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,1ng/ μ L (a), 0,01 ng/ μ L (b) e 0,001 ng/ μ L (c) de fragmentos de controlo positivo. a – Pico homocigótico para T não existe e para G a 79°C (curvas T e G, respetivamente). b e c – Pico homocigótico para T aproximadamente aos 78°C e para G aos 82°C (curvas T e G, respetivamente). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

ii.i.ii. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

Com o objetivo de perceber o funcionamento dos *primers* nas reações de PCR, realizaram-se reações com os *primers* específicos em reações independentes. Nas mesmas condições que na Figura 20, adicionou-se, para as novas reações, apenas 0,001ng/ μ L de controlos positivos com os alelos T e G na posição do SNP. Esta concentração foi a que resultou em picos mais uniformes (Figura 20). A estratégia adotada foi a mesma que nos pontos i.i.iv e i.ii.iii e os resultados estão presentes na Figura 21.

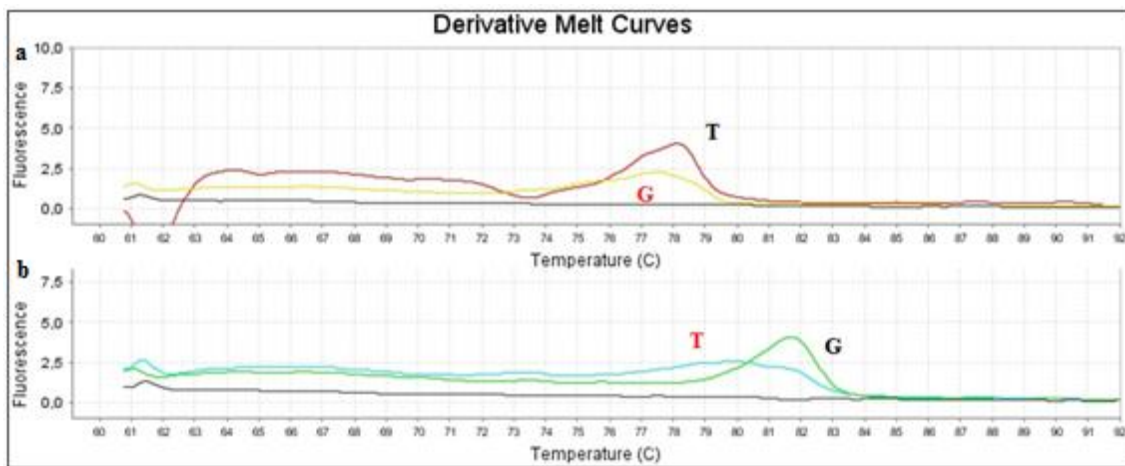


Figura 21: Curvas das derivadas de *melting* para o MTHFR_rs72552099. Reações com 0,05 μ M de *primers reverse* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' em poços de reação independentes e de *primer forward*. Adição de 0,001 μ g/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Reação com *primer* específico para o alelo T com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido T (curva T) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G) na posição do SNP. b – Reação com *primer* específico para o alelo G com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido G (curva G) e com adição de fragmento de controlo positivo com o nucleótido T (curva T) na posição do SNP. a e b – Pico homocigótico para T a 78°C e para G aproximadamente a 82°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Da observação da Figura 21 verifica-se que os picos das curvas correspondem aos alelos presentes em cada reação, no entanto verifica-se a presença de amplificação dos fragmentos dos alelos que não possuíam *primers* específicos. A curva G na Figura 21a e a curva A na Figura 21b deveriam sobrepor-se ao controlo negativo (c-), tal como já havia acontecido nos SNPs mostrados anteriormente.

ii.i.iii. Variação da quantidade de *primers* nas reações de PCR

Continuando com a otimização do MTHFR_rs72552099, foi necessário variar as quantidades de *primers* para aumentar a intensidade de fluorescência das curvas de *melting*. Nas mesmas condições apresentadas anteriormente, mas com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos T e G, respetivamente, 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação, 1ng/ μ L de DNA e 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Aqui também foi utilizado um controlo positivo heterocigótico obtido pela adição dos dois fragmentos (T e G) no mesmo poço de reação. Estas foram as condições ótimas a que se chegaram para a genotipagem deste SNP, cujas curvas de *melting* podem ser visualizadas no ponto 3.2.2.1. do Capítulo 3 – Resultados.

Também foram experimentadas reações a 40 ciclos com 62°C de *annealing*, mas nesse caso as curvas do fragmento GT (heterozigótico) não obtiveram separação resultando apenas um pico aos 82°C. As concentrações de *primers* que se utilizaram foram as identificadas na Tabela V, onde também estão apresentadas as condições em que ocorreram outras reações antes de se chegarem às quantidades ótimas de *primers* (a 40 ciclos, 60°C) com o objetivo de tornar a intensidade dos dois picos (G e T) praticamente igual.

Tabela V: Concentrações dos *primers* utilizados nas reações de genotipagem para otimização do SNP MTHFR_rs72552099.

MTHFR_rs72552099	Concentração final (µM)							
	60°C, 40 ciclos			62°C, 40 ciclos				
T <i>annealing</i>								
Primer R_T (1µM)	0,20	0,15	0,15	0,10	0,10	0,15	0,20	0,15
Primer R_G (1µM)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Primer F (1µM)	0,10	0,15	0,25	0,10	0,20	0,15	0,20	0,25

Não foi necessário novo desenho de *primers* para genotipar este SNP, porque conseguiu-se chegar à otimização com o *mismatch* na penúltima base.

As condições otimizadas permitiram genotipar, por AS-PCR, as 307 amostras que fizeram parte do estudo. Para confirmação do genótipo foram sequenciadas 22 amostras que comprovaram o genótipo TT para todas elas.

III. Gene ACE

iii.i. rs8075924 (C/T)

Para a otimização do ACE_rs8075924 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

iii.i.i. *Primers* específicos no mesmo poço de reação de PCR

Mais uma vez iniciou-se a otimização com os *primers* específicos em conjunto na mesma reação de PCR. A Figura 22 representa as curvas de *melting* do produto amplificado das amostras de controlo positivo correspondentes ao ACE_rs8075924. As reações foram realizadas com 0,10µM de *primers forward* específicos com *mismatch* na

penúltima base da extremidade 3', 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L (Figura 22 a e b) e 0,000004ng/ μ L (Figura 22 c e d) de fragmentos de controlo positivo. As curvas CT (Figura 22 b e d) dizem respeito a um controlo positivo heterozigótico e o “c-”, o controlo negativo.

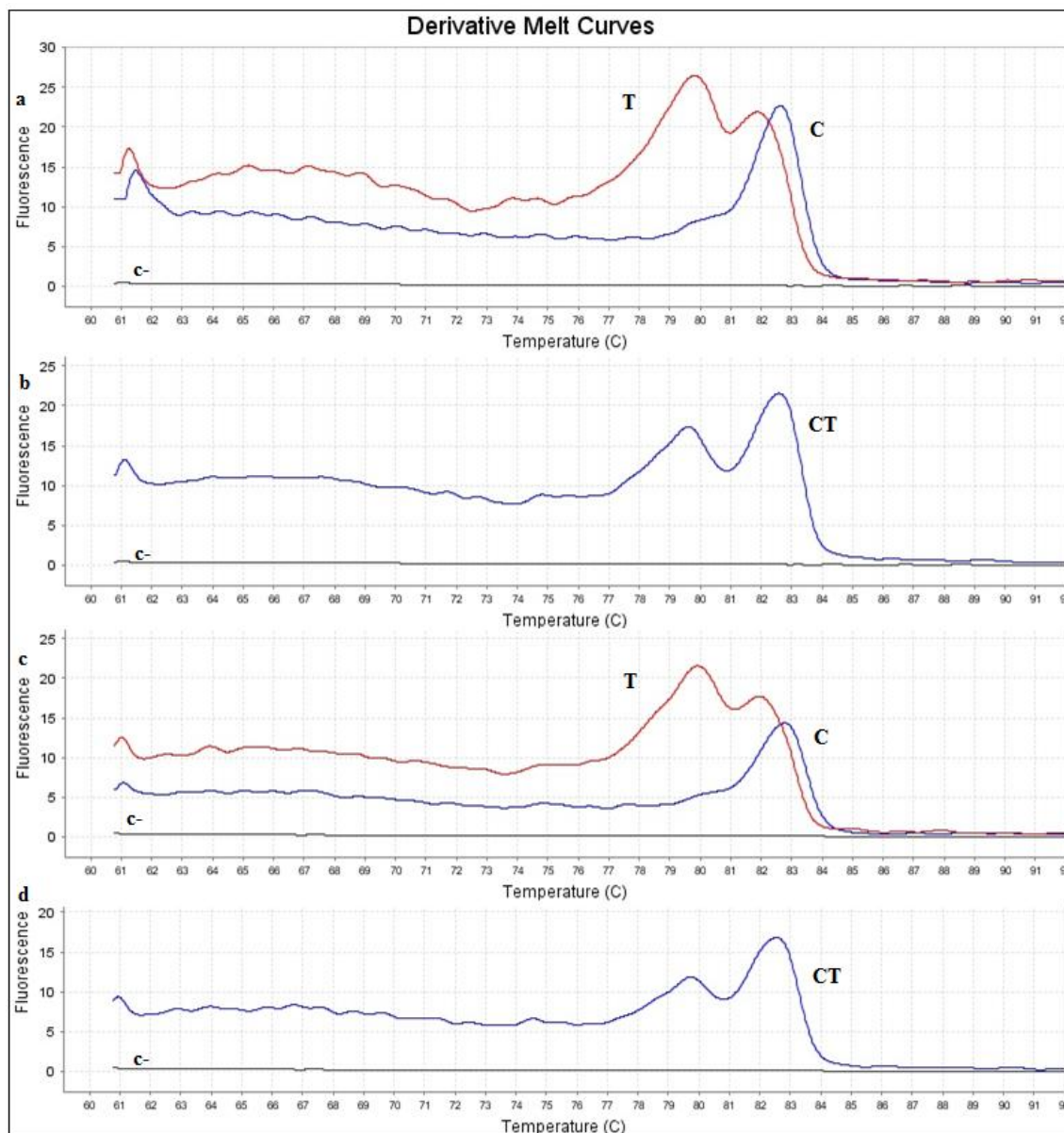


Figura 22: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs8075924. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – A curva do fragmento, de controlo positivo, homozigótico para T apresenta dois picos: 80°C e 82°C (curva T) e pico homozigótico para C aproximadamente a 82,5°C (curva C). b e d – Picos do controlo heterozigótico a 79,5°C e 82,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Pela primeira vez, dos SNPs testados até agora, este foi o único, que na primeira reação o controlo heterozigótico apresentou uma curva de *melting* com dois picos. No entanto, a curva CT da Figura 22 ainda não se considera otimizada, pois se for possível

aumenta-se a intensidade do pico de T_m 79,5°C. Outro fator que ainda não permite concluir a otimização do SNP é a curva do produto de amplificação que representa o alelo T (curva T) que possui dois picos. Da observação da Figura 22 escolheu-se a concentração de 0,001ng/μL de fragmentos para utilizar nas reações seguintes.

iii.i.ii. Variação da quantidade de *primers* nas reações de PCR

Com o objetivo de diminuir o pico existente, a mais, na curva do alelo T, foi diminuída a quantidade de *primer reverse* nas reações. Para este fim realizaram-se reações com 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing*, 0,10μM de *primers* específicos e de *primer reverse* e 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo. Os resultados deram a curva do controlo heterozigótico apenas com um pico aos 82°C (dados não mostrados). Assim, ainda se diminuiu a quantidade do *primer* para o alelo C, visto que poderia estar a influenciar o aparecimento do pico no fragmento T também aos 82°C.

A Figura 23 ilustra os resultados das reações realizadas com 0,05μM e 0,10μM de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20μM de *primer reverse*, nas mesmas condições de PCR.

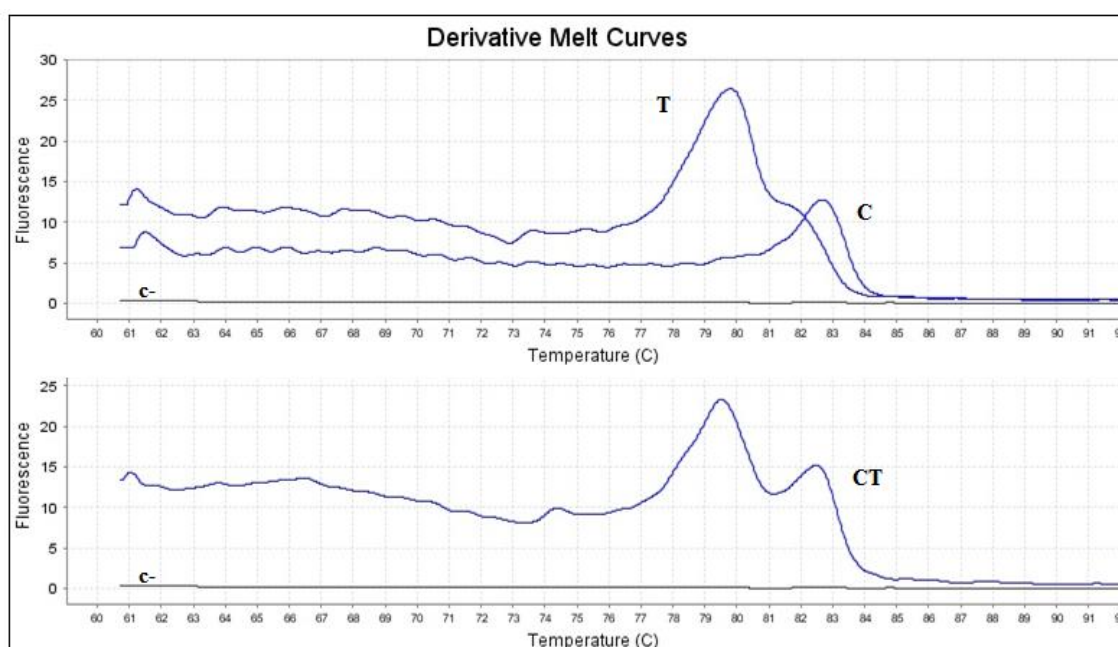


Figura 23: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs8075924. Reações com 0,05μM e 0,10μM de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20μM de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo. Pico homozigótico para T aproximadamente a 80°C e para C aproximadamente a 82,5°C (curvas T e C, respetivamente). Picos do controlo heterozigótico a 79,5°C e a 82,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Como a intensidade do pico da curva C estava baixa, ainda se diminuiu a quantidade de *primer* específico para o alelo T de forma a igualar a intensidade dos picos C e T em reações nas mesmas condições das anteriores, com 0,050 μ M e 0,075 μ M de *primers* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse*, mas os resultados foram muito semelhantes aos da Figura 23 (dados não mostrados).

iii.i.iii. Alteração da temperatura de *annealing*

Como forma de aumentar a especificidade dos *primers*, com o objetivo de diminuir a curva do alelo T que se situava na T_m do alelo C, fizeram-se reações com as mesmas concentrações e nas mesmas condições que a Figura 23, mas com 62°C de temperatura de *annealing*. Os resultados foram muito semelhantes aos da Figura 23, apenas com diminuição da intensidade dos picos (dados não mostrados). Deste modo, conclui-se que o aumento da temperatura de *annealing* não foi solução para aumentar a especificidade destes *primers*.

iii.i.iv. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

Ainda se testou o comportamento de reações com *primers* específicos em diferentes poços de reações, nas mesmas condições que os SNPs NOS1_rs77074921 e NOS1_rs76839820, cujos perfis das curvas (dados não mostrados) foram muito semelhantes aos da Figura 3 (NOS1_rs77074921) e, portanto, também para o ACE_rs8075924 não se obtêm resultados válidos com esta estratégia.

iii.i.v. Comportamento dos DNAs nas reações com *primers* na mesma reação

Até agora os resultados obtidos na Figura 23 foram os melhores, por isso realizaram-se reações exatamente nas mesmas condições de PCR e com as mesmas quantidades de *primers* e fragmentos, onde foram ainda testados DNA das amostras números 1 e 18 a 1ng/ μ L (curvas D.1 e D.18, Figura 24).

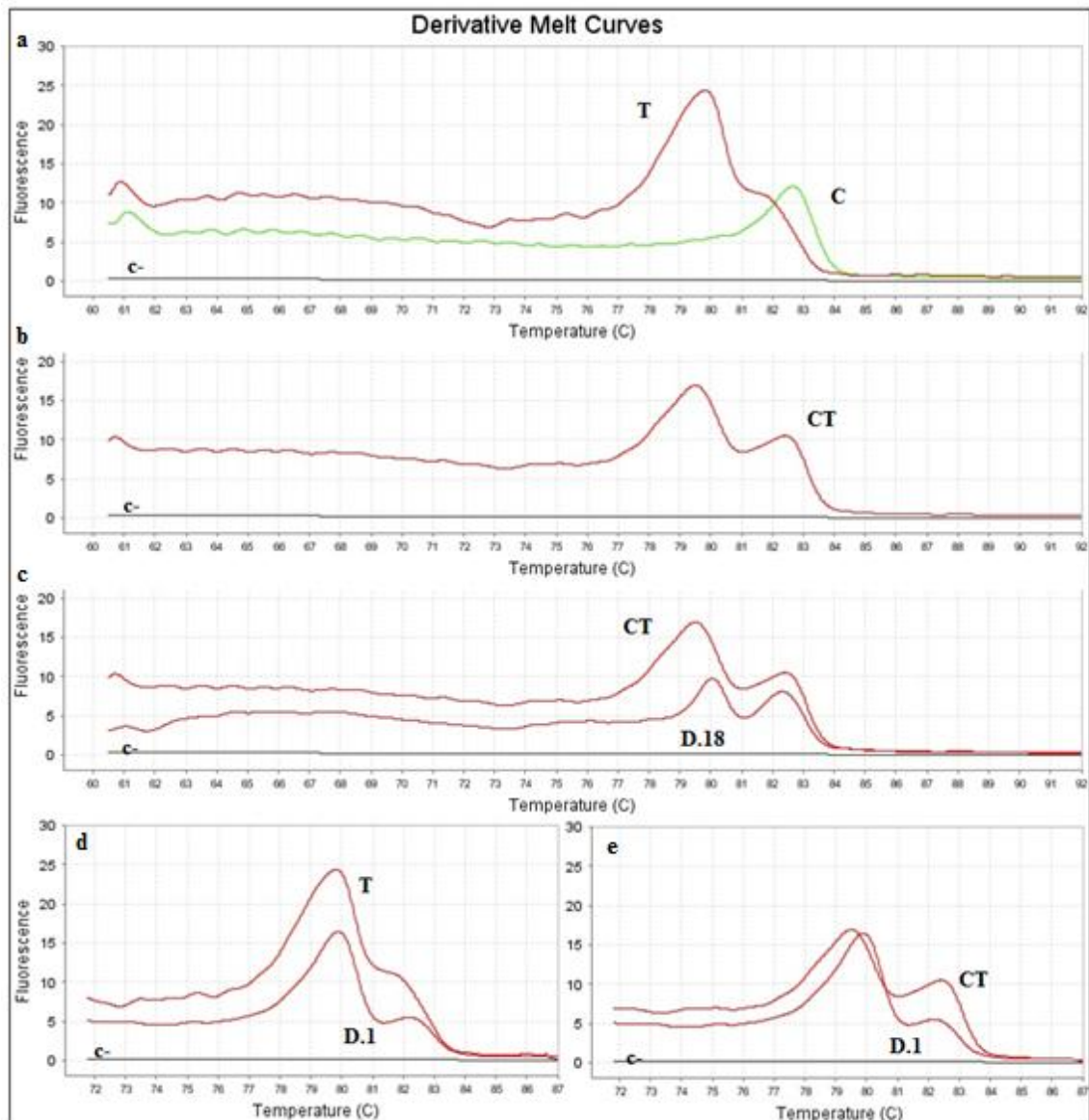


Figura 24: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs8075924. Reações com 0,05 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Pico homocigótico para T a 80°C e para C aproximadamente a 82,5°C (curvas T e C, respetivamente). b – Picos do controlo heterocigótico a 79,5°C e a 82,5°C (curva CT). c – Sobreposição do controlo positivo heterocigótico (curva CT) com amostra número 18 (curva D.18) que possui picos a 80°C e a 82,5°C. d – Sobreposição do controlo positivo (curva T) com a amostra número 1 (curva D.1) que possui picos a 80°C e de menor intensidade a 82°C. e – Sobreposição do controlo positivo heterocigótico (curva CT) com a amostra número 1 (curva D.1). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Os resultados de AS-PCR, apresentados na Figura 24, sugerem o genótipo CT para a amostra 18, por comparação com o controlo positivo heterocigótico (Figura 24 c). No entanto, a amostra 1 foi comparada com as curvas dos controlos positivos homocigótico para T (curva T, Figura 24 d) e heterocigótico (curva CT, Figura 24 e), sendo a amostra mais semelhante com o perfil homocigótico para T. Para confirmar o

genótipo estas duas amostras foram sequenciadas por *Sanger*. Os resultados da sequenciação indicaram que a amostra 1 tinha genótipo CT e a 18 CC. Esta sequenciação ainda foi repetida para confirmar o genótipo e para perceber se tinha ocorrido troca das amostras. A sequenciação deu novamente os mesmos genótipos para cada uma das amostras e, sem margem para dúvidas, prosseguiu-se a otimização da técnica AS-PCR para o ACE_rs8075924 a partir das amostras 1 e 18. Estas passaram a ser os controlos positivos para as restantes amostras, deixando de parte os fragmentos de controlo positivo C e T.

iii.i.vi. Otimização dos controlos positivos (D1 e D18)

Para iniciar a nova otimização utilizaram-se as condições iniciais: 0,10 μ M de *primers forward* específicos, 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos com temperatura de *annealing* de 60°C e 1ng/ μ L de DNA (Figura 25).

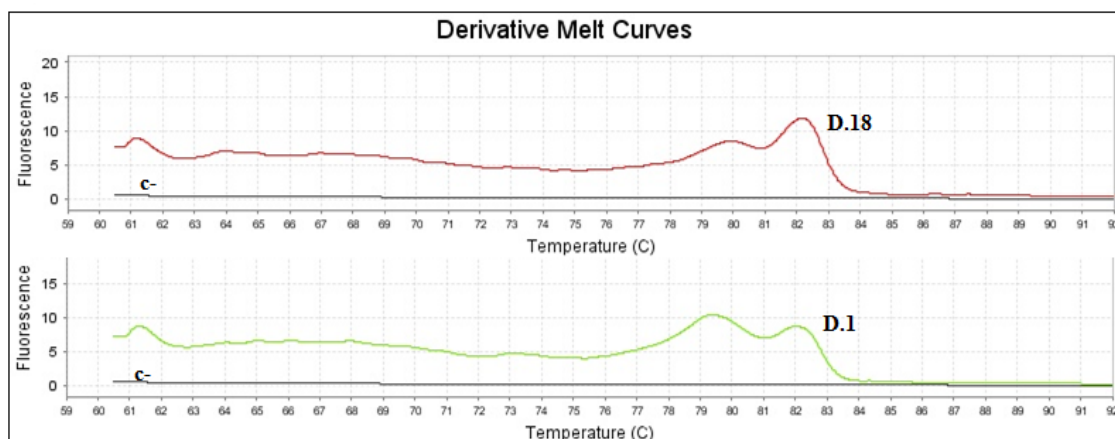


Figura 25: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs8075924. Reações com 0,10 μ M *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 1ng/ μ L de DNA. A curva D.18 representa um DNA com pico homozigótico para C a 82°C e a curva D.1 um DNA heterozigótico com picos a 79,5°C e 82°C. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Os resultados da Figura 25 já mostram um perfil de curvas de *melting* mais próximas do genótipo correto das amostras 1 (curva D.1) e 18 (curva D.18), no entanto é necessário melhorar a curva da amostra 18 que ainda se pode confundir com um DNA heterozigótico. Nestas reações ainda se utilizaram os fragmentos de controlo positivo para comparar o comportamento das curvas de *melting* do seu produto amplificado em relação aos DNAs, cujos resultados (dados não mostrados) deram semelhantes aos da Figura 22 (curvas T, C e CT), como seria de esperar. É de notar que o comportamento dos fragmentos é bem diferente dos DNAs.

O passo seguinte da otimização foi o aumento da quantidade de *primer* específico para o alelo C para aumentar a intensidade do sinal das curvas de *melting*, principalmente para a amostra 18, ficando estas como as condições ótimas de reação: 0,25µM e 0,10µM de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20µM de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR, 60°C de temperatura de *annealing* e 1ng/µL de DNA (Figura 3.16, 3.18 e 3.20, Capítulo 3 - Resultados).

Pela genotipagem dos 149 indivíduos do fenótipo C foram encontrados os 3 genótipos e, por isso, foram genotipados todos os doentes dos fenótipos A e B. Nestas genotipagem foram encontrados vários DNAs homozigóticos para T, cuja representação gráfica é dada pela amostra 305 (curva e, TT, da Figura 3.18, Capítulo 3 – Resultados). Posteriormente foi confirmado o genótipo da amostra 305 por sequenciação.

Neste SNP não houve necessidade de desenhar outros *primer*, porque estes permitiram a genotipagem por AS-PCR sem dúvidas.

iii.ii. rs4357 (C/T)

Para a otimização do ACE_rs4357 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

iii.ii.i. Primers específicos no mesmo poço de reação de PCR

A Figura 26 representa as curvas de *melting* dos produtos amplificados das amostras de controlo positivo correspondentes ao SNP ACE_rs4357. As condições comuns às 2 reações foram: 0,10µM de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', 0,20µM de *primer reverse* e 40 ciclos de PCR com 60°C de temperatura de *annealing*. As alterações que ocorreram foram ao nível da concentração dos fragmentos de controlo positivo: a e b – 0,001ng/µL e c e d – 0,000004ng/µL. As curvas CT (Figura 26 b e d) correspondem a um controlo positivo heterozigótico e o “c-“, o controlo negativo.

Tal como ocorreu no ACE_rs8075924, a Figura 26 apresenta curvas de *melting* de controlos heterozigóticos com Tm dos picos semelhantes ao valor teórico. Para estes controlos a técnica está otimizada. No entanto, os controlos positivos para os alelos C e

T (Figura 26, curvas T e C) possuem um pico na T_m correspondente ao alelo contrário, isto é, os *primers* não são muito específicos, pois ambos participam nas reações quando só existe um fragmento homozigótico para um dos alelos.

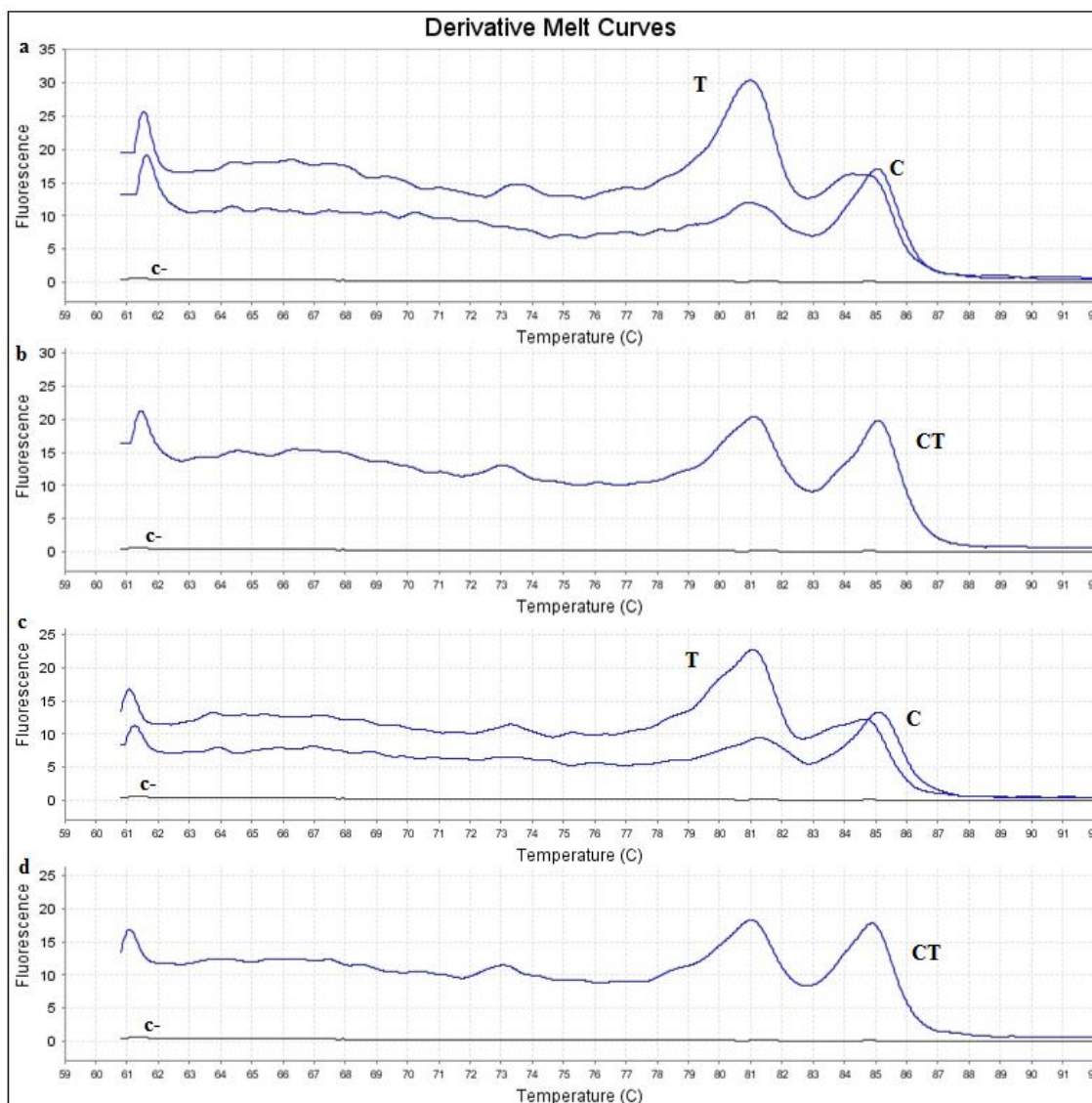


Figura 26: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – A curva do fragmento, de controlo positivo, homozigótico para T apresenta dois picos, um a 81°C e outro menos definido a 84,5°C (curva T) e a curva do fragmento, de controlo positivo, homozigótico para C apresenta dois picos, um a 85°C e outro menos definido a 81°C (curva C). b e d – Picos do controlo heterozigótico a 81°C e 85°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

iii.ii.ii. Variação da quantidade de *primers* nas reações de PCR

De forma a diminuir a intensidade dos picos adicionais das curvas de *melting* do fragmento C e T, diminuiu-se a quantidade de *primer reverse* nas reações. Para obter os resultados da Figura 27 foram utilizados 0,10 μ M de *primer forward* específicos e *primer reverse*, nas mesmas condições de PCR da figura anterior, e optou-se pela utilização de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo a partir deste ponto.

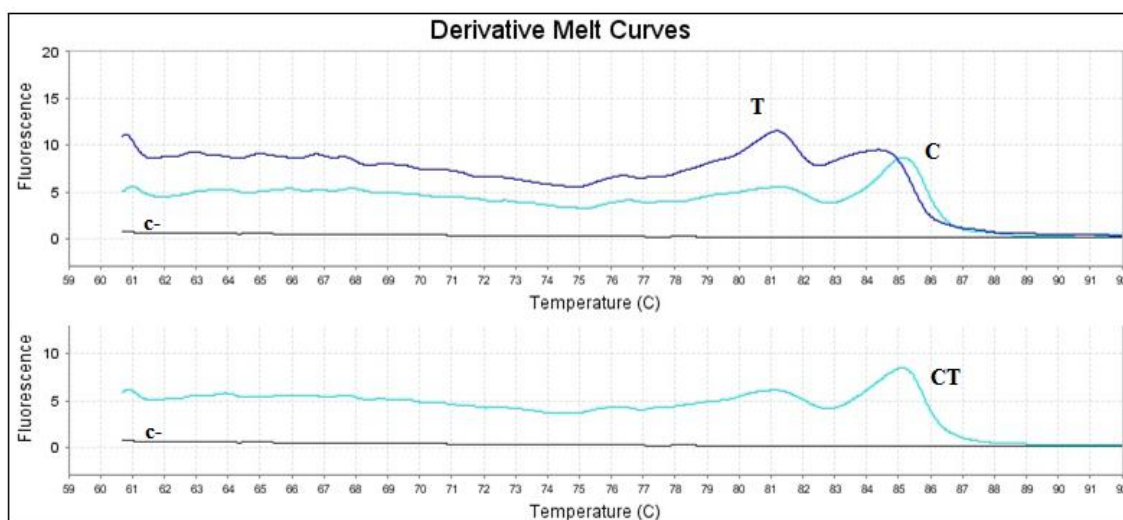


Figura 27: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. A curva do fragmento, de controlo positivo, homozigótico para T apresenta dois picos, um a 81°C e outro a 84,5°C (curva T) e o pico homozigótico para C está presente a 85°C (curva C). Picos do controlo heterozigótico a 81°C e 85°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Esta alteração da quantidade de *primer reverse* em relação às reações anteriores resultou na diminuição de fluorescência dos picos de todas as curvas. Para o fragmento de controlo positivo do alelo C (curva C), nota-se que continua a ter maior intensidade o pico referente a esse alelo mas, por outro lado, na curva correspondente ao alelo T (curva T) já apresenta dois picos com a mesma intensidade. Nestas condições a curva do controlo heterozigótico (CT) sobrepõe-se com a da correspondente ao alelo C, podendo confundir-se com esta. Assim, foi necessário alterar novamente a quantidade de *primers*.

Efetuarão-se reações com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,10 μ M de *primer reverse*, mas apenas aumentou a intensidade da curva C e não permitiu que os picos adicionais dos fragmentos C e T desaparecessem (dados não mostrados).

Posteriormente testaram-se ainda quantidades menores de *primer* específico: 0,05 μ M de *primers forward* específicos e 0,10 μ M de *primer reverse* (Figura 28), nas mesmas condições de PCR apresentadas para a Figura 27.

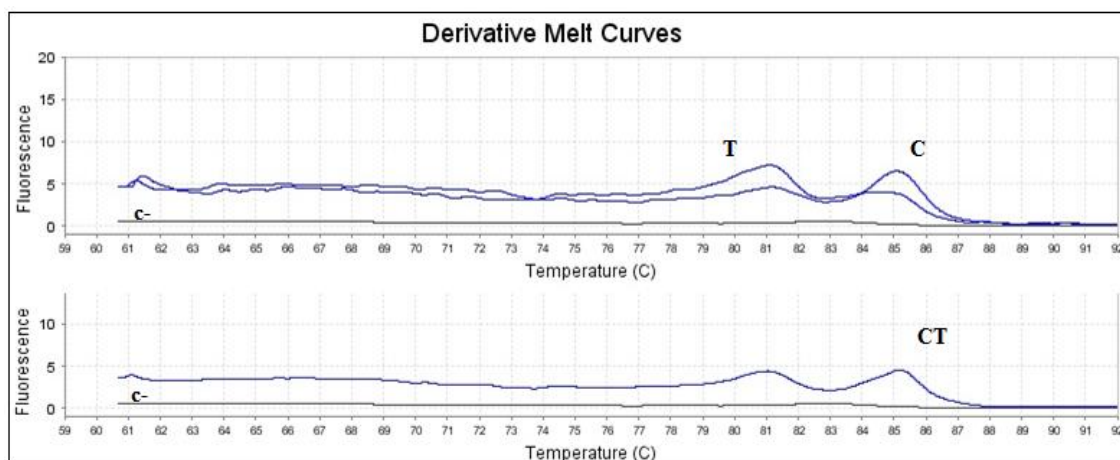


Figura 28: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,05 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,10 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para T a 81°C e para C a 85°C (curvas T e C, respetivamente). Picos do controlo heterocigótico a 81°C e 85°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Estas curvas definem muito melhor os alelos, mas possuem uma intensidade dos picos muito baixa. Ainda se realizaram reações com 0,10 μ M e 0,05 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20 μ M *primer reverse* que, apesar de levarem ao aumento da intensidade dos picos, também tornou a curva T semelhante a um heterocigótico e a curva C com o pico adicional com intensidade mais elevada (dados não mostrados). Numa outra tentativa efetuaram-se reações com 0,05 μ M de *primers forward* específicos e 0,20 μ M de *primer reverse*, nas mesmas condições de PCR (dados não mostrados), mas os resultados foram muito semelhantes aos da Figura 26, portanto a estratégia já não passa por alterar a quantidade de *primers*, mas sim por alterar outras condições de PCR.

iii.ii.iii. Alteração da temperatura de *annealing*

Para tentar aumentar a especificidade dos *primers* realizaram-se reações de PCR com 40 ciclos mas com um aumento da temperatura de *annealing* para 62°C e com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse*. O resultado encontra-se na Figura 29. Antes destas reações também se experimentou com 0,10 μ M de *primers* específicos e 0,20 μ M de *primer*

reverse, mas o resultado foi parecido com o da Figura 29, apenas com intensidade dos picos ligeiramente menor (dados não mostrados).

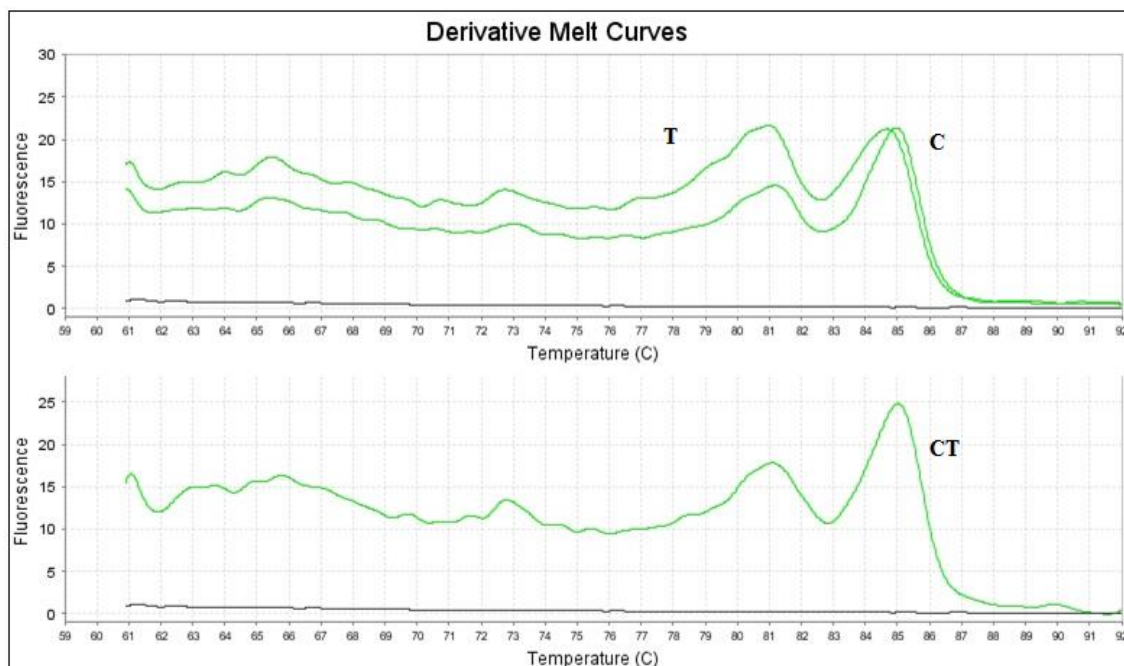


Figura 29: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. A curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para T apresenta dois picos, um a 81°C e outro a 84,5°C (curva T) e a curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para C apresenta também dois picos, um a 85°C e outro menos definido a 81°C (curva C). Picos do controlo heterocigótico a 81°C e 85°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 62°C de temperatura de *annealing*.

Com estas condições, a curva de *melting* do fragmento T (curva T) confunde-se com um heterocigótico (curva CT) e a do C (curva C) sobrepõe-se à curva CT. Assim conclui-se que o aumento da temperatura de *annealing* também não é solução.

iii.ii.iv. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

Visto que ainda não foi possível otimizar a técnica AS-PCR com a utilização de *primers* específicos na mesma reação de PCR, foram testados os resultados com os *primers* específicos em reações de PCR independentes. As condições de PCR, quantidade de *primers* e de fragmentos de controlo positivo foram os mesmos que para os SNPs dos genes NOS1e ACE e os perfis das curvas (dados não mostrados) foram semelhantes aos da Figura 3 do NOS1_rs77074921. Mais uma vez, as reações com *primers* específicos em duas reações independentes não permitem determinar o alelo em causa.

iii.ii.v. *Primers sem mismatch vs primers com mismatch*

A Figura 28 já quase expressa curvas de *melting* de controlos positivos otimizados, apesar de apresentar uma baixa intensidade das curvas. Como com diferentes quantidades de *primers* não se conseguiu um resultado melhor, para contornar isso foram desenhados mais *primers* específicos para a deteção dos dois alelos, partindo dos *primers* anteriores. O *primer reverse* manteve-se o mesmo em todas as reações. Foram então desenhados *primers* sem *mismatch* e com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', com uma cauda de 15 bases GC (Tabela VI). A diferença de T_m entre os fragmentos com os alelos C e T é na mesma de 3°C como inicialmente, porque como se pode observar nas curvas de *melting* mostradas anteriormente, os picos apresentam uma separação visível, não existindo, assim, necessidade de aumentar a diferença de T_m . O *primer reverse* está novamente apresentado na Tabela VI.

Tabela VI: Pares de *primers* (F=*forward* e R=*reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica AS-PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplicão e respectivo tamanho do amplicão em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas e o número de bases que a compõem está indicado na coluna imediatamente antes da sequência dos *primers*. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T_m	T_m amplicão	Tamanho amplicão
			(°C)		
ACE_ rs4357	F-15	5'-ggcggcgcgcggcGCAGGAGAATGGGGTGCC-3'	60	85	134/148 pb
	F	5'-CGCAGGAGAATGGGGTGCT-3'	62	82	
	F-15	5'-ggcggcgcgcggcCGCAGGAGAATGGGGTCC-3'	62	85	135/149 pb
	F	5'-ACGCAGGAGAATGGGGTACT-3'	62	82	
	R	5'-CTGGTACTTCAGCCTGTCGA-3'	62	-	-

Seguidamente estão apresentadas diferentes reações, e os seus resultados, que puderam ser efetuadas com as várias combinações de *primers*. Na prática foram sempre repetidos os ensaios com 0,001ng/ μ L e 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo, mas aqui apenas estão apresentados os resultados com uma das concentrações: a que resultou em picos mais definidos ou com mais intensidade quando os resultados nas duas deram semelhantes.

iii.ii.v.i. *Primers* específicos sem *mismatch*

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 30, foram utilizados 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch*, 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR com 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo.

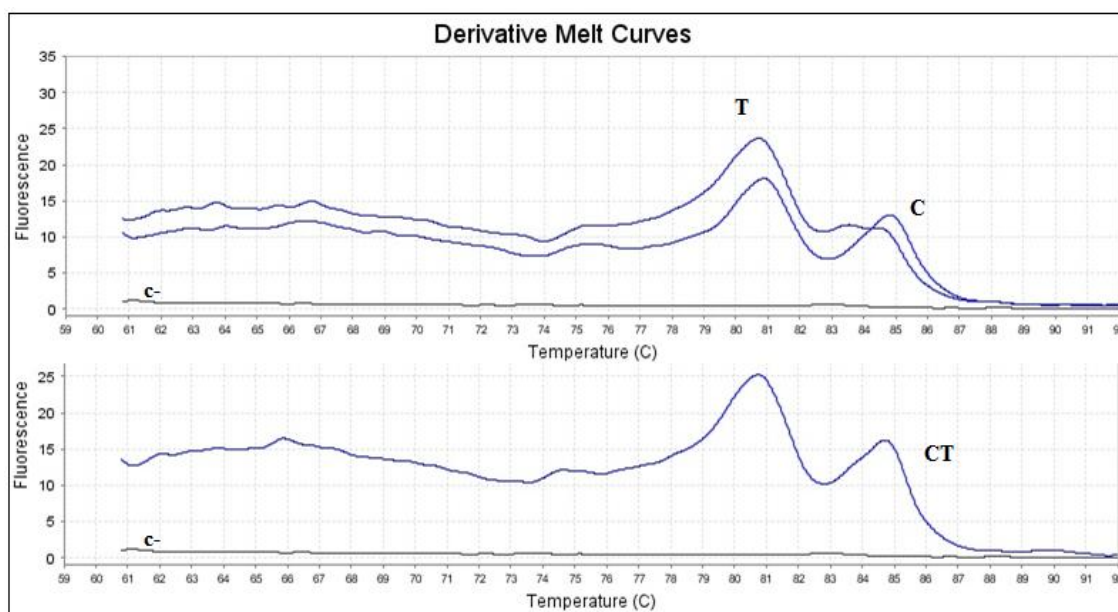


Figura 30: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch* e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para T a 81°C (curva T) e a curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para C apresenta dois picos, um a 85°C e outro a (curva C). Picos do controlo heterocigótico a 80,5°C e a 84,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*

A Figura 30 ilustra as curvas de *melting* do produto amplificado com os *primers* específicos sem *mismatch*, cuja curva C continua a ter dois picos e agora com a mesma intensidade, a 81°C e 85°C. A curva T possui um pico aos 81°C, um valor mais próximo da T_m teórica e a curva CT possui dois picos ($T_m=80,5^\circ\text{C}$ e $84,5^\circ\text{C}$) e, mais uma vez, possui um perfil semelhante ao apresentado para o alelo C. Os *primers* sem *mismatch* não são específicos porque amplificam os fragmentos todos, independentemente de possuírem o alelo correspondente ao *primer*.

iii.ii.v.ii. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3'

Os resultados da Figura 31, dizem respeito a reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', 0,20 μ M de *primer reverse*, nas mesmas condições que o ponto anterior (iii.ii.v.i.).

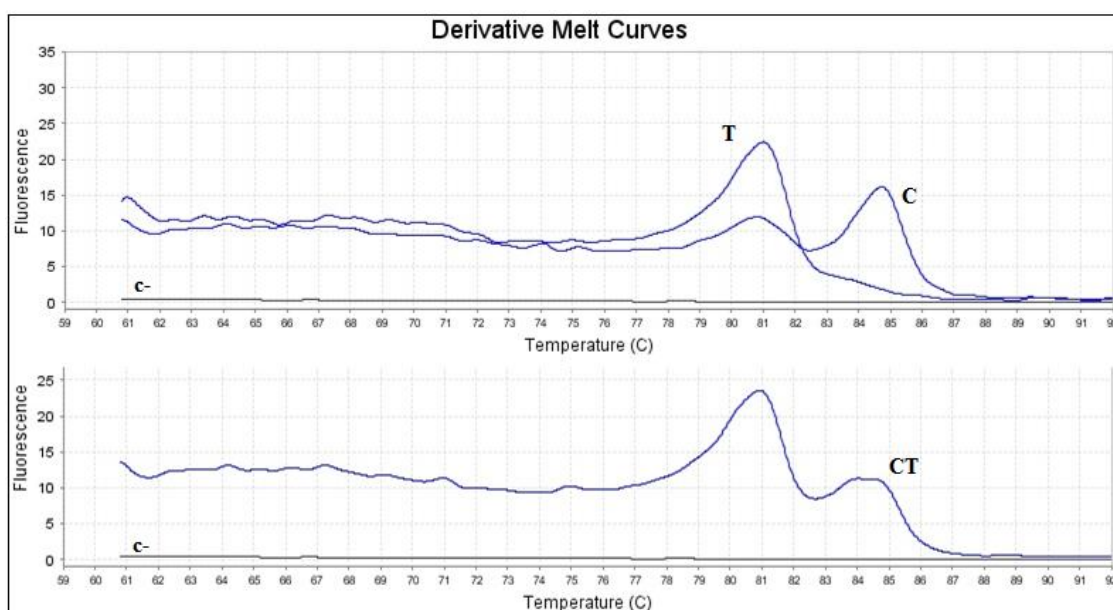


Figura 31: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs4357. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para T a 81°C (curva T) e a curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para C apresenta dois picos, um a 84,5°C e outro a 81°C (curva C). Picos do controlo heterocigótico a 81°C e a 84,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Neste caso de reações com *primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base os resultados já foram mais próximos dos verdadeiros, com uma curva exemplar para o alelo T e uma curva para o alelo C bem diferente do controlo heterocigótico (curva CT).

Com o objetivo de aumentar a intensidade do pico correspondente ao alelo C, na curva de *melting* do heterocigótico, realizaram-se reações nas mesmas condições das anteriores, mas com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', e 0,30 μ M de *primer reverse*. Os resultados (dados não mostrados) foram muito semelhantes aos da Figura 31, apenas se deu um aumento da intensidade das curvas.

A Figura 31 já apresenta um resultado próximo do otimizado, mas em vez de se continuar a otimizar com *primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base, ainda se experimentaram outras combinações de *primers*.

iii.ii.v.iii. *Primers* específicos com *mismatch* na penúltima (alelo C) e na antepenúltima base (alelo T) da extremidade 3'

Os resultados obtidos com a combinação de 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T com *mismatch* na penúltima e antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse*, nas mesmas condições de PCR apresentadas na figura anterior podem ser visualizados nas Figuras 3.23, 3.25 e 3.26 (Capítulo 3 – Resultados) onde se encontram as curvas de *melting* dos controlos positivos e de alguns DNAs. Estas foram as condições otimizadas para a deteção do ACE_rs4357 nas amostras de DNA.

Após a obtenção destas curvas ainda se realizaram reações nas mesmas condições, mas com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e antepenúltima bases da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer reverse*, que resultou no aumento da intensidade de todos os picos das curvas, mas também do pico adicional do fragmento C a 81°C (dados não mostrados). E posteriormente ainda se efetuaram reações com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e antepenúltima bases da extremidade 3', respetivamente, e 0,40 μ M de *primer reverse*, cujos resultados surgiram com aumento ainda maior da intensidade dos picos das curvas de *melting*, mas tanto do pico adicional do fragmento C aos 81°C, como do fragmento T aos 85°C, um resultado que ainda não tinha ocorrido para este *primer* específico para T com *mismatch* na antepenúltima base (dados não mostrados).

Uma vez que estas tentativas não melhoraram os resultados apresentados nas Figuras 3.23, 3.25 e 3.26 (Capítulo 3 – Resultados), as condições utilizadas para essas reações foram consideradas otimizadas, apesar do pico menos definido presente na curva do fragmento C.

iii.iii. rs121912703 (C/T)

Para a otimização do ACE_rs121912703 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

iii.iii.i. *Primers* específicos no mesmo poço de reação de PCR

A Figura 32 apresenta as curvas de *melting* do produto amplificado das amostras de controlo positivo correspondentes ao SNP ACE_rs121912703 nas mesmas condições também utilizadas no ponto iii.ii.i. (ACE_rs4357).

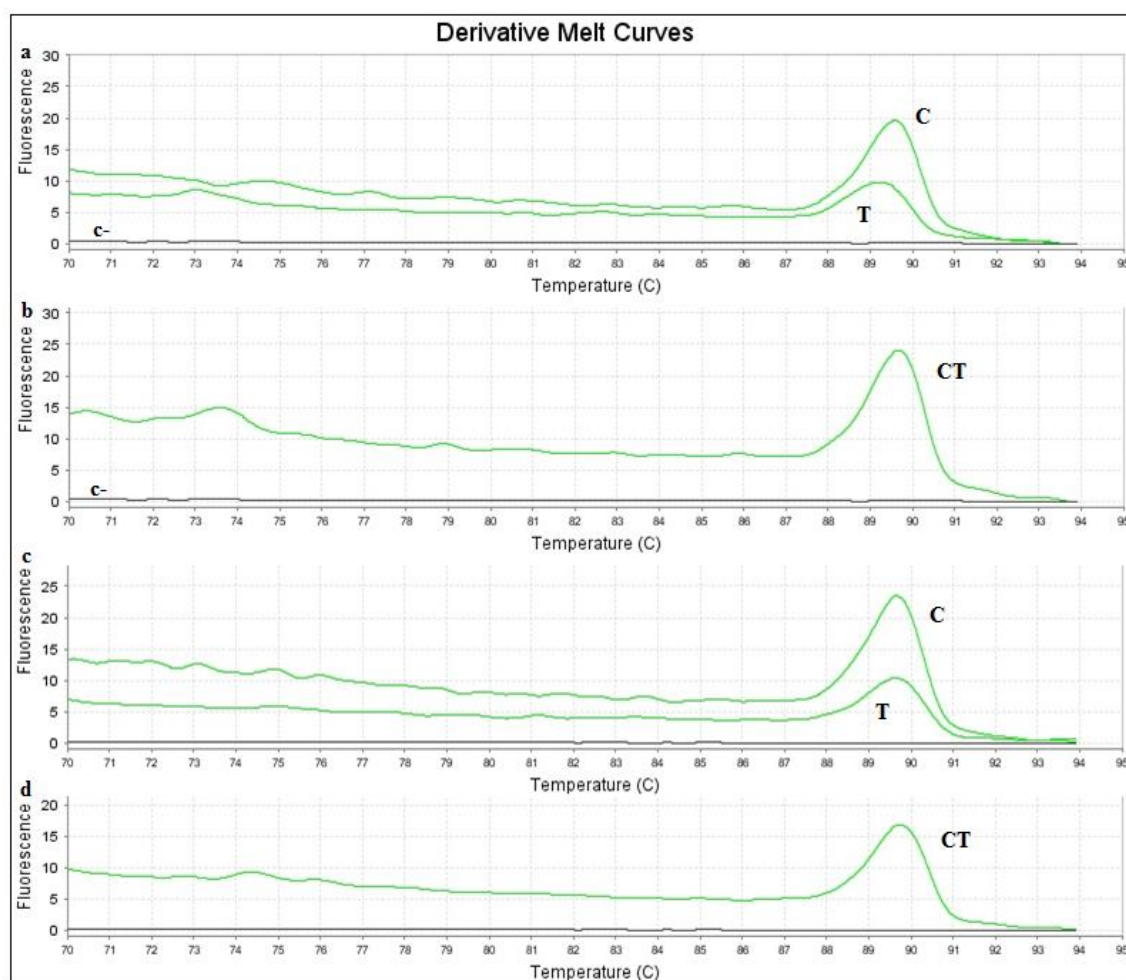


Figura 32: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs121912703. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – Pico homozigótico para C e T aproximadamente aos 89,5°C (curvas T e C). b e d – O pico heterozigótico apenas é apresentado aos 89,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Como se pode ver na Figura 32, os resultados são iguais para ambas as concentrações dos fragmentos controlo. Não há separação dos picos nas T_m respetivas, indicativas de cada produto de amplificação, possivelmente devido à pequena diferença entre as T_m dos fragmentos que é somente de 2°C. Apenas a curva de *melting* correspondente ao alelo T (curva T) está na posição correta, todas as outras estão sobrepostas a essa mesma posição.

Como estratégia inicial optou-se por fazer nova diluição dos fragmentos de controlo positivo e dos *primers* a partir do *stock* -80°C com nova água Milli-Q, pois poderia ter havido contaminação. No entanto, após a realização de novas reações com esses *primers* e fragmentos, mantiveram-se as curvas de *melting* tal como na Figura 32, apenas ocorrendo maior intensidade dos picos para a concentração de 0,001ng/μL e menor para a 0,000004ng/μL dos fragmentos (dados não mostrados).

iii.iii.ii. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

A próxima opção foi testar os resultados com os *primers* específicos em reações de PCR independentes, de modo a perceber se um dos *primers* estava a ser mais específico que o outro, nomeadamente por não aparecerem dois picos no fragmento heterozigótico. As reações foram realizadas nas mesmas condições que os SNPs anteriores, tal como os perfis das curvas (dados não mostrados) foram semelhantes aos da Figura 3 (NOS1_rs77074921).

Como estas reações, com *primers* específicos em poços independentes, não resultaram nestas condições, foram ainda realizadas reações a 58°C de temperatura de *annealing* com 0,10μM de *primer* específico para o alelo C e *primer reverse* e 0,20μM de *primer* específico para o alelo T e *primer reverse*, mas os resultados (dados não mostrados) voltaram a ser muito semelhantes aos da Figura 3 (NOS1_rs77074921), sendo a diferença apenas registada no aumento de intensidade dos picos.

iii.iii.iii. Alteração da temperatura de *annealing* e da quantidade de *primers*

Foram realizadas reações com os *primers* específicos juntos no mesmo poço de reação, a 58°C de temperatura de *annealing*, 40 ciclos, 0,10μM e 0,20μM de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, 0,20μM de *primer reverse* e 0,001ng/μL de fragmentos de controlo positivo (Figura 33).

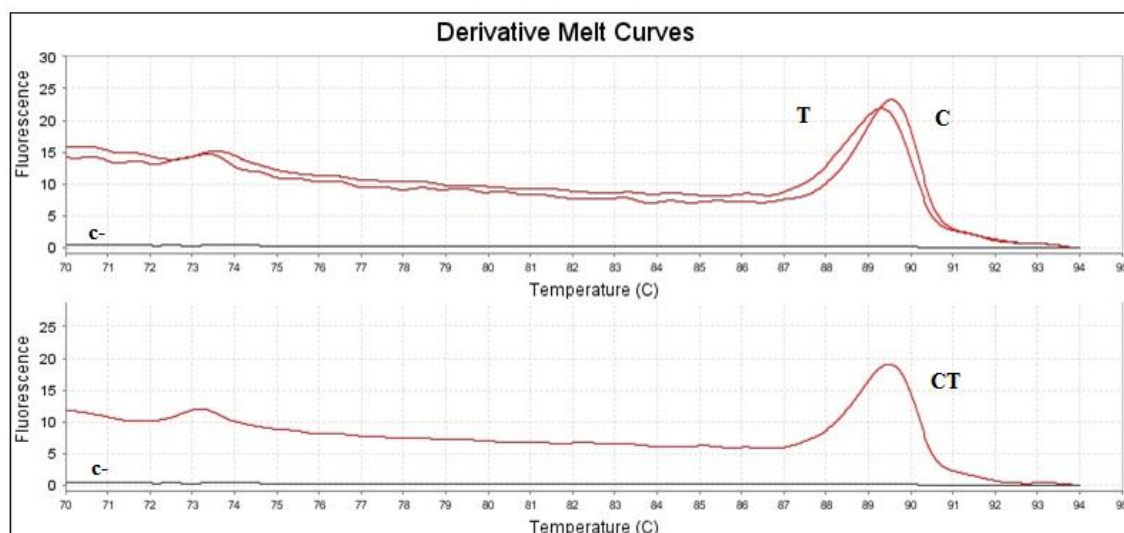


Figura 33: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs121912703. Reações com 0,10 μ M e 0,20 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para C e T aproximadamente a 89,5°C (curvas T e C). O pico heterocigótico apenas é apresentado a 89,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 58°C de temperatura de *annealing*.

A diminuição da temperatura de *annealing* não ajudou a separar os picos nas T_m teóricas, permanecendo todas as curvas com picos à T_m de aproximadamente 89,5°C. A curva do fragmento heterocigótico (curva CT) é igual às curvas homocigóticas e continua a não haver separação em dois picos.

Visto que as tentativas até aqui não resultaram, foram desenhados mais *primers*.

iii.iii.iv. *Primers sem mismatch vs primers com mismatch*

Para aumentar a especificidade dos *primers* nas reações com os *primers* específicos combinados, nomeadamente no que diz respeito às T_m dos *primers* específicos que até aqui eram muito próximas e do facto do produto amplificado do fragmento heterocigótico nunca ter separado em dois picos, foram utilizados os *primers* anteriores, mas desenhados sem *mismatch* e com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', como está indicado a verde na Tabela VII. De modo a aumentar mais a diferença entre as T_m foram acrescentados resíduos G e C na cauda da extremidade 5' dos *primers* específicos, regra geral no de T_m superior: 25 bases GC para o *primer* sem *mismatch* e 26 para o *primer* com *mismatch* na antepenúltima base, permitindo uma diferença de até 3°C entre as T_m dos *primers* específicos. Foram na mesma adquiridos *primers* com uma cauda com 15 bases GC de forma a testar qual o melhor conjunto de

primers. O *primer reverse* manteve-se o mesmo e encontra-se novamente apresentado na Tabela VII.

Tabela VII: Pares de *primers* (F=*forward* e R=*reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica AS-PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplicão e respectivo tamanho do amplicão em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas e o número de bases que a compõem está indicado na coluna imediatamente antes da sequência dos *primers*. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T_m	T_m amplicão	Tamanho amplicão
			(°C)		
ACE_ rs121912703	F-15	5'-ggcgccgcgcggcGCAGTACAACCTGGACGCC-3'	58	91	166/180- 190 pb
	F-25	5'-cgcgccgcgcggcggcgcgcggcGCAGTACAACCTGGACGCC-3'	58	92	
	F	5'-CGCAGTACAACCTGGACGCT-3'	60	89	
	F-15	5'-ggcgccgcgcggcCGCAGTACAACCTGGACTCC-3'	60	91	166/181- 192 pb
	F-26	5'-gcggcgccgcggcggcgcgcggcCGCAGTACAACCTGGACTCC-3'	60	92	
	F	5'-CGCAGTACAACCTGGACACT-3'	58	89	
	R	5'-CAAGGAGACAGCATGGGCA-3'	60		

As reações e os seus resultados, que se efetuaram com as várias combinações de *primers*, encontram-se de seguida. Na prática foram sempre repetidos os ensaios com 0,001ng/ μ L e 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo, mas aqui apenas estão apresentados os resultados com uma das concentrações: a que resultou em picos mais definidos ou com mais intensidade quando os resultados nas duas deram semelhantes.

iii.iii.iv.i. *Primers* específicos sem *mismatch* com cauda GC de 15 bases

Nas reações, cujos resultados são semelhantes aos apresentados na Figura 32 (dados não mostrados), foram utilizados 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch*, com o *primer* específico para a deteção do alelo C com 15 bases GC, 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR com 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Os resultados são semelhantes àqueles onde se utilizaram *primers* com *mismatch* na penúltima base, talvez porque neste caso voltou-se a utilizar um *primer* específico com cauda de 15 GC o que possibilitou, da mesma forma, uma diferença de T_m de 2°C, não suficiente para separar os picos. Assim, a T_m dos picos obtidos continua a ser só a correspondente ao fragmento T.

iii.iii.iv.ii. *Primers* específicos sem *mismatch* com cauda GC de 25 bases

Posteriormente foram utilizados *primers* específicos sem *mismatch*, mas com uma cauda de 25 bases GC na extremidade 5' do *primer* para o alelo C. A reação foi realizada com 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch*, 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo (Figura 34).

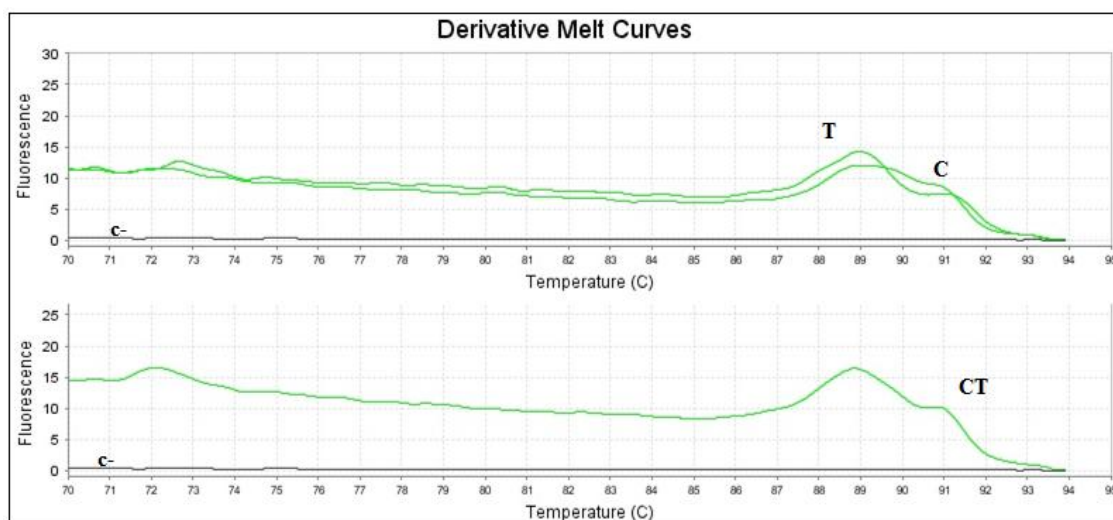


Figura 34: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs121912703. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos sem *mismatch*, com *primer* específico para o alelo C com 25 bases GC na extremidade 5', e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para T a 89°C (curva T). Não existe pico para o alelo C (curva C). O pico heterocigótico apenas é apresentado a 89°C (curva CT). Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Os resultados da Figura 34 mostram que, tal como já acontecia anteriormente, quando a cauda era maior que 15 bases GC o alelo correspondente ao *primer* que possui a cauda não aparece numa curva bem definida. Neste caso as curvas dos produtos de amplificação dos fragmentos T e CT voltaram a ser semelhantes.

iii.iii.iv.iii. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 15 bases

Nestas reações utilizaram-se *primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e com o *primer* específico para o alelo C com cauda de 15 bases GC na extremidade 5'. Foram utilizados 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base, 0,20 μ M de *primer reverse* e nas

mesmas condições que o ponto anterior. Os resultados (dados não mostrados) foram semelhantes aos da Figura 32.

iii.iii.iv.iv. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 35, foram utilizados 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', com o *primer* específico para a detecção do alelo C com 26 bases GC na extremidade 5', 0,20 μ M de *primer reverse*, com adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo e nas mesmas condições que o ponto anterior.

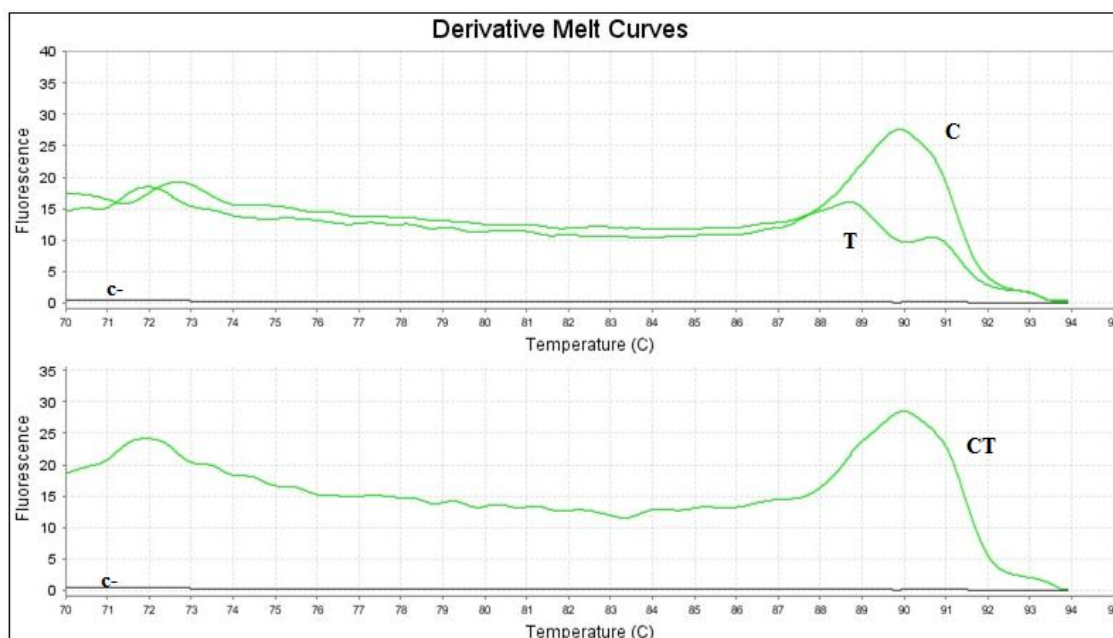


Figura 35: Curvas das derivadas de *melting* para ACE_rs121912703. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', com *primer* específico para o alelo C com 26 bases GC na extremidade 5', e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homozigótico para C a 90°C (curva C). A curva do fragmento, de controlo positivo, homozigótico para T apresenta dois picos, aproximadamente a 89°C e a 91°C (curva T). O pico heterozigótico apenas é apresentado a 90°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

A cauda de 26 bases GC permitiu uma diferença de 3°C entre as T_m dos fragmentos, mas mesmo assim, pela análise das curvas da Figura 35, conclui-se que ainda não é uma diferença significativa para separar, de forma visível, os picos das curvas C e T. Um aumento ainda maior da cauda não será a solução, pois embora aumentasse a diferença entre as T_m, provocaria dificuldades na amplificação como já se pôde ver em SNPs apresentados anteriormente, em que o produto amplificado do *primer*

que continha o alelo não possuía pico na curva de *melting*. No entanto estes resultados são melhores que os anteriores nesse aspeto, pois o fragmento heterozigótico continua a possuir só um pico e desta vez sobrepõe-se com a curva do fragmento C. Também se aumentou a quantidade de *primers* (0,10 μ M e 0,20 μ M de *primers* específicos para aos alelos C e T, respetivamente, e 0,30 μ M de *primer reverse*) mas o resultado (dados não mostrados) foi muito semelhante ao da Figura 35.

iii.iii.iv.v. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases (alelo C) e na penúltima base (alelo T)

Ainda foram realizadas outras combinações de *primers* com o objetivo de melhorar os resultados até então obtidos. Assim, combinaram-se 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T com *mismatch* na antepenúltima e na penúltima base, respetivamente, com o *primer* específico para a deteção do alelo C com 26 bases GC na extremidade 5', 0,20 μ M de *primer reverse*, 40 ciclos de PCR com 60°C de temperatura de *annealing* e com adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo, nas mesmas condições de PCR que no ponto anterior. Os resultados dessas reações (dados não mostrados) foram semelhantes aos obtidos na Figura 35, apenas se verificando uma diminuição da intensidade das curvas, principalmente da curva T que praticamente eliminou os picos da curva, ou seja, verifica-se a ausência de amplificação do fragmento T.

iii.iii.iv.vi. *Primers* específicos com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' com cauda GC de 26 bases (alelo C) e sem *mismatch* (alelo T)

Como até agora ainda não se obteve um resultado ótimo, continuaram-se as reações com outras combinações de *primers*. Assim, combinaram-se 0,10 μ M de *primers forward* específicos para os alelos C e T com *mismatch* na antepenúltima base e sem *mismatch*, respetivamente, com *primer* específico para C com 26 bases GC na extremidade 5', 0,20 μ M de *primer reverse* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo nas mesmas condições do ponto anterior. Os resultados das reações encontram-se na Figura 36.

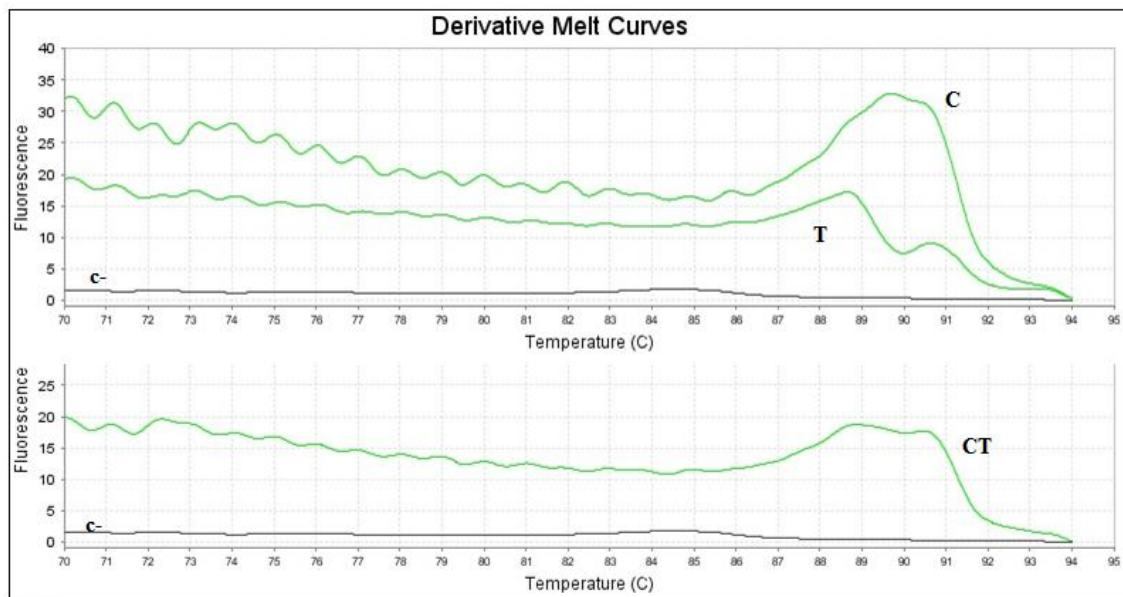


Figura 36: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs121912703. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos para C e T com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3' e sem *mismatch*, respectivamente, com *primer* específico para o alelo C com 26 bases na extremidade 5', e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. A curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para T apresenta dois picos, aproximadamente a 88,5°C e a 90,5°C (curva T) e pico homocigótico para C aproximadamente a 89,5°C (curva C). O controlo heterocigótico não possui picos nas suas curvas de *melting* (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Em resumo, para o ACE_rs121912703, alguns produtos de amplificação de alguns alelos não possuíram pico nas curvas correspondentes o que se deve, provavelmente, à enorme cauda GC (maior ainda que o próprio *primer*). Visto que depois de várias tentativas não se conseguiu otimizar, desistiu-se de genotipar este SNP por AS-PCR. O falhanço da genotipagem, por esta técnica, deve-se à região complicada onde o SNP está localizado na sequência, como se pode confirmar na Figura 3.29 do Capítulo 3 – Resultados.

Como não foi possível genotipar os indivíduos por AS-PCR a opção foi sequenciar algumas amostras de DNA, 40 no total: 25 do fenótipo C, 8 do fenótipo B e 7 do fenótipo A (Anexo III). Devido ao custo associado à sequenciação não se genotiparam mais indivíduos para este SNP.

iii.iv. rs113110741 (G/C)

Devido à localização do SNP ACE_rs113110741, que se situa numa região de grande proximidade entre o ACE_rs121912703 e o ACE_rs12720744 (a sequência está apresentada na Figura 3.29 do Capítulo 3 – Resultados), não foi possível desenhar *primers* para a deteção deste SNP. Caso se procedesse ao desenho de *primers* estes

incluiriam sempre um SNP, o que vai contra as regras de desenho de *primers*, uma vez que o *primer* poderá ser inespecífico por causa disso. Foi também pela mesma razão que não se pode utilizar o sistema de genotipagem *TaqMan*[®] *Openarray*[®] para este SNP.

iii.v. rs12720744 (C/T)

Por fim, para a otimização do ACE_rs12720744 foram inicialmente utilizados os *primers* representados na Tabela I, cujos específicos possuem *mismatch* na penúltima base da extremidade 3'.

iii.v.i. Primers específicos no mesmo poço de reação de PCR

Procedendo do mesmo modo que tem sido feito até aqui, foram realizadas reacções com 0,10µM de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3', 0,20µM de *primer reverse*, 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/µL (Figura 37 a e b) e 0,000004ng/µL (Figura 37 c e d) de fragmentos de controlo positivo.

Embora as T_m das curvas apresentadas sejam um pouco diferentes dos valores teóricos, as curvas representativas dos fragmentos C e T (curvas C e T, respetivamente) separam visivelmente os seus picos sendo possível detectar o alelo, de cada fragmento, pela sua interpretação. Como também já aconteceu anteriormente, a curva correspondente ao fragmento heterozigótico (curva CT) não separou em dois picos e sobrepôs-se à curva do fragmento com o nucleótido T na posição do SNP. Como se pode ver em (c) e (d) (Figura 37) os resultados com 0,000004ng/µL de fragmento apresentam maior intensidade e, por isso, foi a concentração escolhida para continuar a otimização.

iii.v.ii. Variação da quantidade de primers nas reacções de PCR

Com o intuito de aumentar a intensidade dos picos das curvas de *melting*, principalmente o correspondente ao alelo C de forma a tentar igualar a sua fluorescência ao de T, e para ultrapassar o facto do controlo heterozigótico apenas ter um pico, aumentou-se a quantidade de *primers* nas reacções: 0,20µM e 0,10µM de *primers*

reverse específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward*. As condições de PCR foram as mesmas utilizadas no ponto anterior, com adição de 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. O resultado está apresentado na Figura 38.

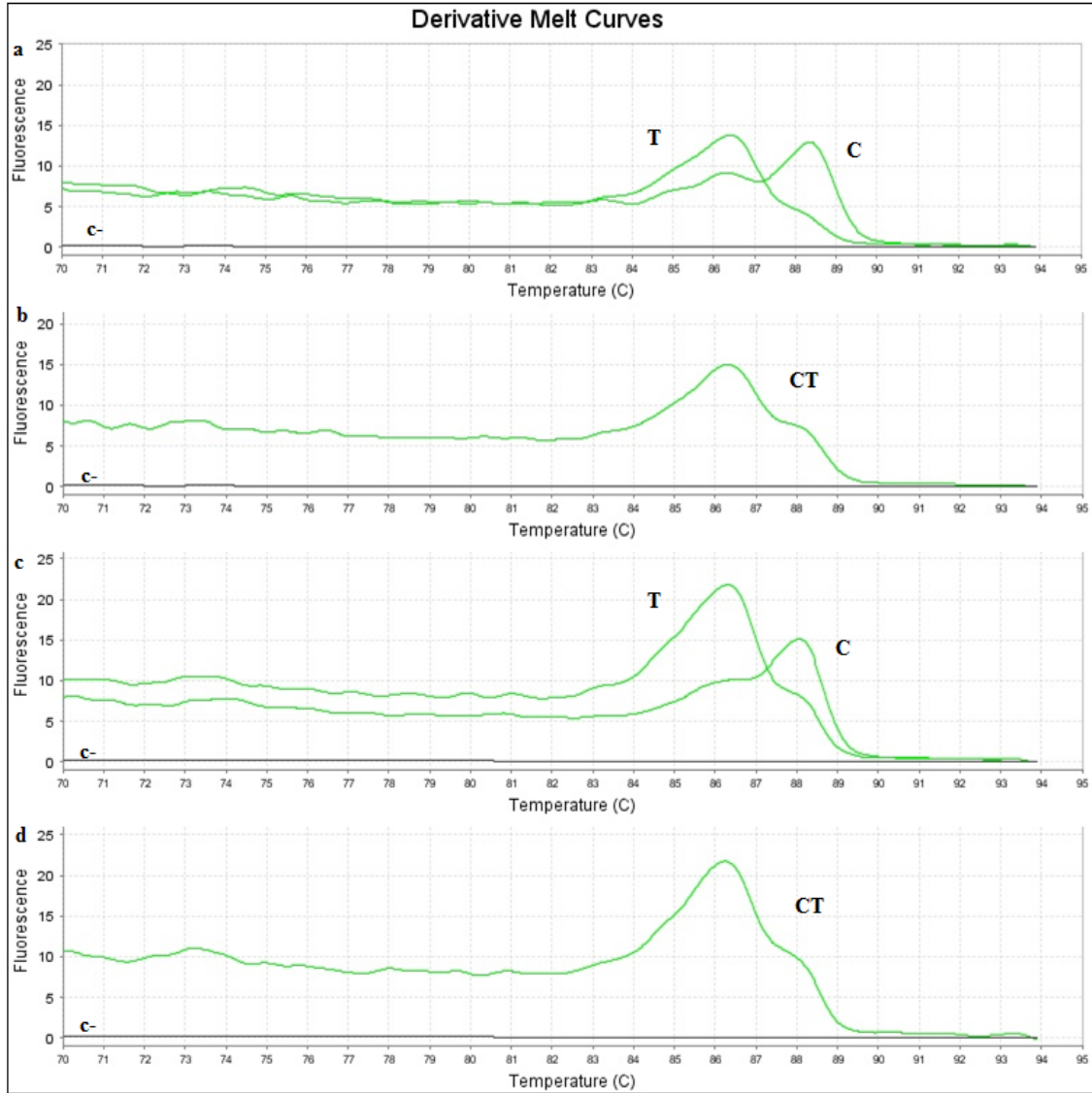


Figura 37: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,10 μ M de *primers forward* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer reverse* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – Pico homozigótico para T a 86,5°C e para C a 88,5°C (curvas T e C, respetivamente). b e d – O pico heterozigótico apenas é apresentado aproximadamente a 86,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

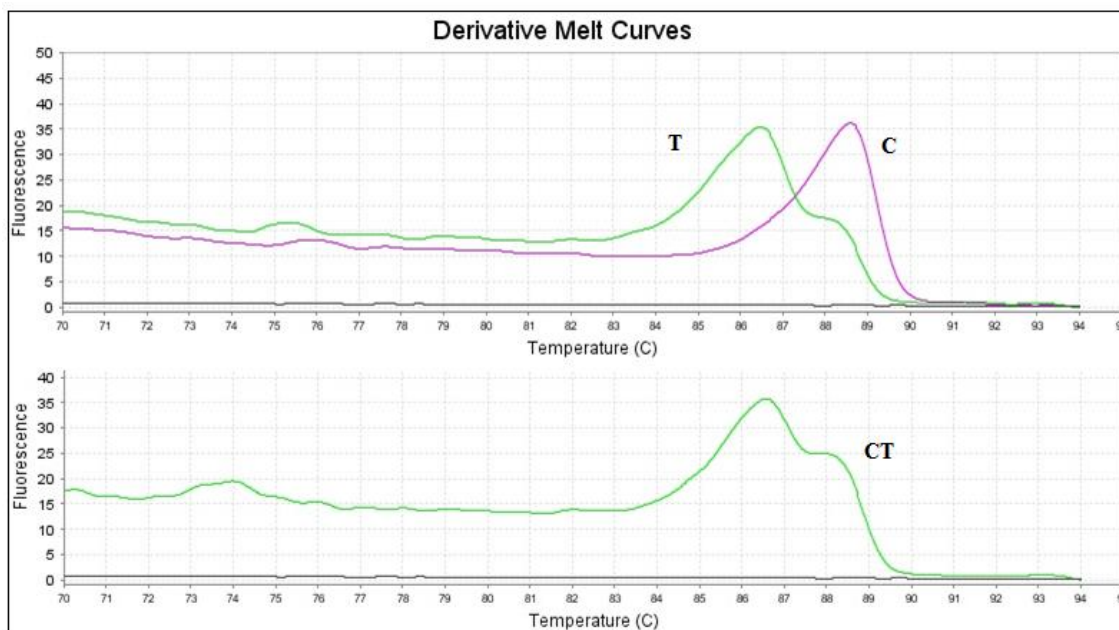


Figura 38: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homocigótico para T a 86,5°C e para C a 88,5°C (curvas T e C, respetivamente). Picos do controlo heterocigótico aproximadamente a 86,5°C e 88°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Estas curvas já representam melhores resultados que os da Figura 37 pelo fato do fragmento heterocigótico começar a ser amplificado com os dois *primers* e o alelo C apenas possuir um pico bem definido aos 88,5°C, representativo desse alelo. No entanto, este SNP ainda não está otimizado, pois ao observar a Figura 38 verifica-se que a curva T e CT ainda são muito semelhantes, podendo induzir em erro quanto aos alelos presentes na amostra.

Ainda se realizaram reações com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, respetivamente, 0,30 μ M *primer forward*, nas mesmas condições de PCR que a Figura 38, mas apenas levou ao aumento da intensidade do fragmento C, em comparação com essa mesma Figura, pois nem a curva do fragmento heterocigótico se alterou (dados não mostrados).

Posteriormente efetuaram-se reações nas mesmas condições que as anteriores mas com 0,30 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward*, cujo aumento do *primer reverse*, específico para C, tinha como objetivo separar a curva do fragmento heterocigótico em dois picos, o que foi bem-sucedido, mas o pico da curva correspondente ao fragmento T ficou com uma intensidade muito baixa (dados não mostrados). Como última tentativa

nestas condições, realizaram-se reações com 0,30 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, respetivamente, e 0,30 μ M de *primer forward* (Figura 39).

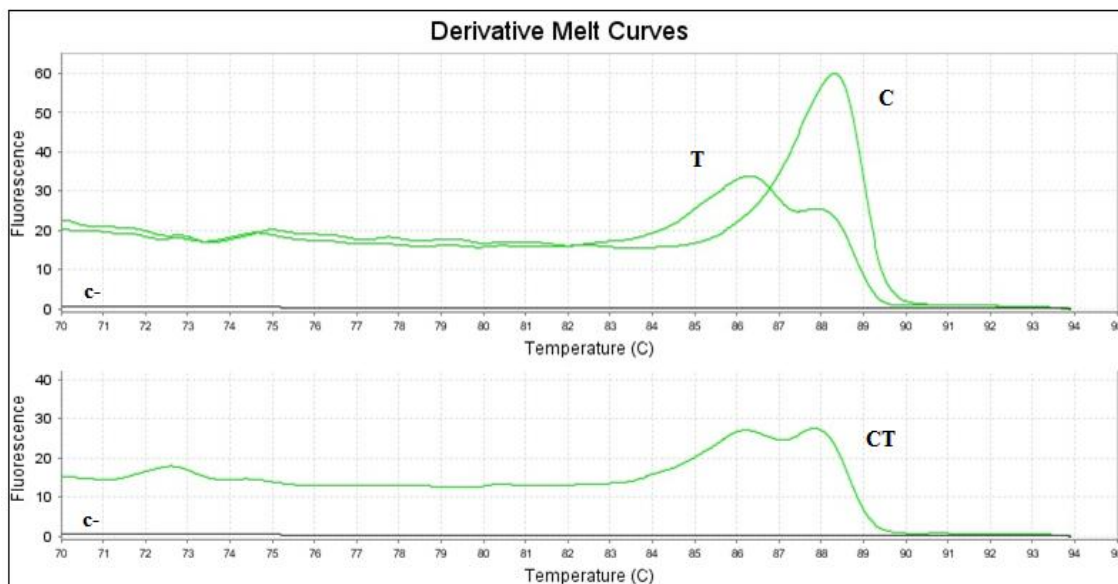


Figura 39: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,30 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, respetivamente, com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e 0,30 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,000004ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. A curva do fragmento, de controlo positivo, homocigótico para T apresenta dois picos, aproximadamente a 86,5°C e a 88°C (curva T). Pico homocigótico para C aproximadamente a 88,5°C (curva C). Picos do controlo heterocigótico presentes aproximadamente a 86°C e 88°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Pela observação da Figura 39 verifica-se um aumento da intensidade dos picos em relação às reações com 0,20 μ M de *primer forward* e a separação em dois picos da curva correspondente ao fragmento heterocigótico.

iii.v.iii. Alteração da temperatura de *annealing*

Para tentar aumentar a especificidade dos *primers* realizaram-se reações de PCR com 40 ciclos de PCR mas com um aumento de temperatura de *annealing* para 62°C. Foram utilizadas as mesmas condições e quantidades de *primers* e fragmentos que para as reações da Figura 38. Os resultados foram semelhantes aos da Figura 38, ocorrendo apenas uma diminuição da intensidade da curva C e da curva CT, mas os perfis continuaram iguais.

Visto que a T_m dos *primers* é entre 60°C e 58°C, efetuaram-se também reações exatamente nas mesmas condições anteriores, mas com temperatura de *annealing* de 58°C. Os resultados foram semelhantes aos da Figura 39, ocorrendo somente uma diminuição da intensidade da curva T, permanecendo os perfis das curvas iguais. Visto que os resultados a uma temperatura de *annealing* de 58°C ou 60°C são semelhantes, não favorece realizarem-se reações a uma temperatura diferente.

iii.v.iv. *Primers* específicos em reações de PCR independentes

Foram testados os resultados com os *primers* específicos em reações de PCR independentes de modo a perceber se um dos *primers* estava a ser mais específico que o outro. As reações foram realizadas nas mesmas condições que anteriormente para as reações de PCR independentes e utilizaram-se 0,000004ng/μL de fragmentos de controlo positivo. Os perfis das curvas foram semelhantes aos da Figura 3 (NOS1_rs77074921) (dados não mostrados).

Mais uma vez os *primers* específicos em reações independentes não permitem detectar o alelo presente na amostra.

Visto que até aqui ainda não se tinha otimizado a técnica para este SNP foi necessário desenhar mais *primers*.

iii.v.v. *Primers* sem *mismatch* vs *primers* com *mismatch*

De forma a aumentar a especificidade dos *primers* nas reações com os *primers* específicos no mesmo poço de reação, foram utilizados os *primers* anteriores, mas desenhados sem *mismatch* e com *mismatch* na antepenúltima base da extremidade 3', como está indicado a verde na Tabela VIII. Foram apenas desenhados *primers* para deteção do alelo T, visto que o *primer* para deteção do alelo C, com *mismatch* na penúltima base, levou à obtenção de curvas de *melting* perfeitamente capazes de indicar o alelo presente no fragmento. Com estes novos *primers* a diferença de T_m entre os fragmentos manteve-se igual. O *primer forward* manteve-se o mesmo e encontra-se novamente apresentado na Tabela VIII.

Tabela VIII: Pares de *primers* (F=*forward* e R=*reverse*) utilizados para a genotipagem dos SNPs em estudo pela técnica AS-PCR. Temperatura de *melting* (T_m) para cada *primer* e para cada amplificação e respectivo tamanho do amplificação em pares de bases (pb) sem e com cauda GC estão indicada(o)s. Cauda de GC encontra-se representada por letras minúsculas e o número de bases que a compõem está indicado na coluna imediatamente antes da sequência dos *primers*. Nucleótidos a vermelho – específicos para os alelos sob estudo, nucleótidos a verde – *mismatch* na antepenúltima base.

ID SNP	Sequência de <i>primers</i>		T_m	Tm amplificação	Tamanho amplificação
			(°C)		
ACE_ rs12720744	R	5'- AGGTGGGGTGGGTGGCA-3'	58	85	125-140pb
	R	5'- GAGGTGGGGTGGGTGTCA-3'	60	85	126-141pb
	F	5'- CATGTTGAGCTACTTCAAGC-3'	58	-	-

As reações e os seus resultados que se efetuaram, com as várias combinações de *primers*, encontram-se de seguida.

iii.v.v.i. *Primers* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' (alelo G) e sem *mismatch* (alelo A)

Nas reações, cujos resultados estão apresentados na Figura 40, foram utilizados 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e sem *mismatch*, respetivamente, 0,20 μ M de *primer forward*, 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L (Figura 40 a e b) e 0,000004ng/ μ L (Figura 40 c e d) de fragmentos de controlo positivo.

Com a combinação destes *primers* observa-se que, desta vez, o resultado da amplificação com o *primer* específico para o alelo T apresenta uma curva definida (curva T), melhor para 0,001ng/ μ L, mas a curva de deteção do alelo C (curva C) não tem 1 pico tão definido como anteriormente possuía. Ainda se verifica outra desvantagem, a curva do fragmento heterozigótico (curva CT) é semelhante à do fragmento T.

iii.v.v.ii. *Primers* específicos com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' (alelo C) e com *mismatch* na antepenúltima base (alelo T)

A Figura 41 representa os resultados das reações onde foram utilizados 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na

antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, 0,20 μ M de *primer forward*, 40 ciclos com 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Também se realização as mesmas reações com adição de 0,000004ng/ μ L, mas os resultados (dados não mostrados) foram semelhantes aos da Figura 41, mas com menor intensidade das curvas e, por isso, a concentração escolhida para prosseguir com a otimização foi de 0,0001ng/ μ L.

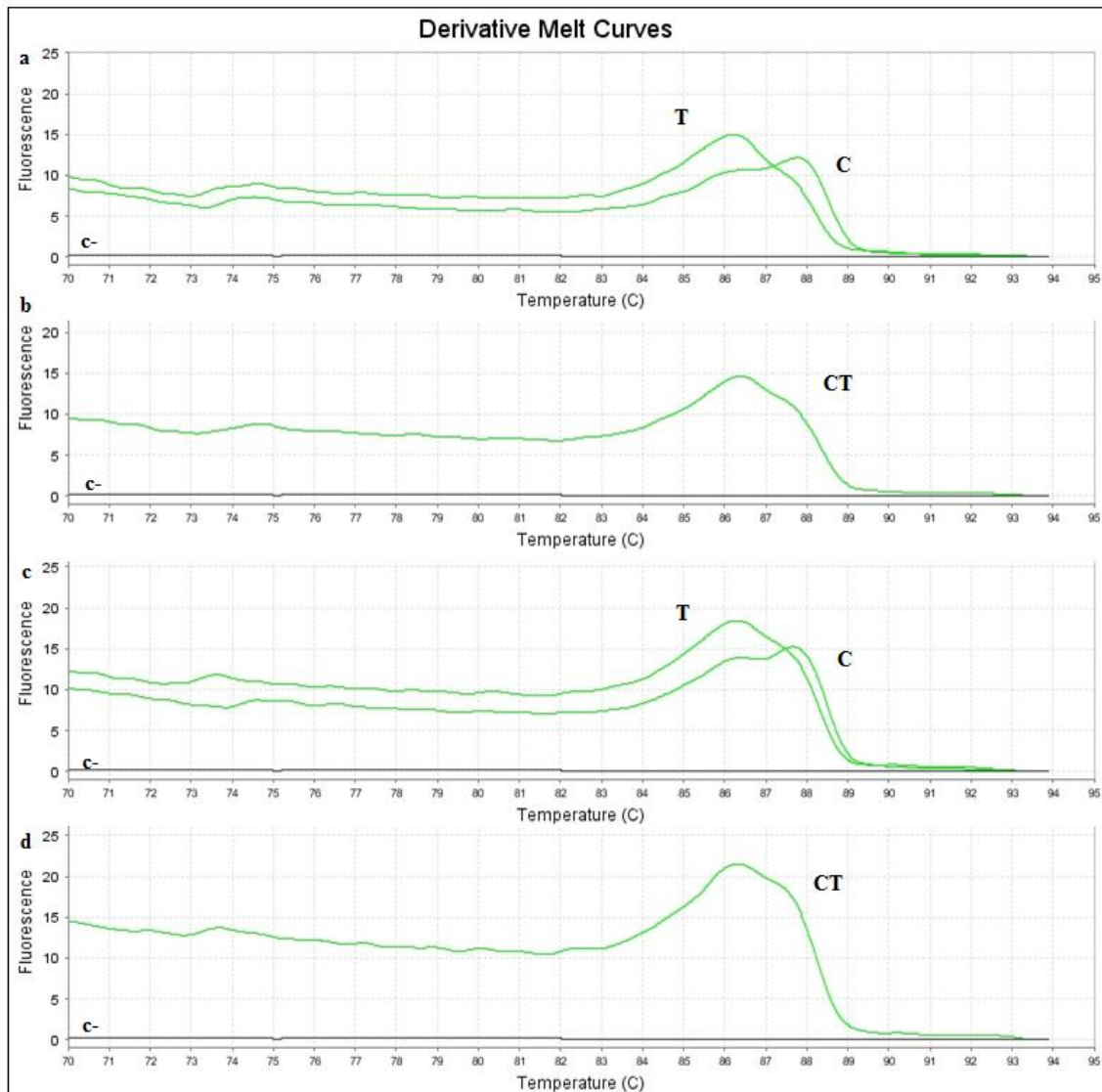


Figura 40: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T com *mismatch* na penúltima base da extremidade 3' e sem *mismatch*, respetivamente, 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L (a e b) e 0,000004ng/ μ L (c e d) de fragmentos de controlo positivo. a e c – Pico homocigótico para T a 86°C e para C a 88°C (curvas T e C, respetivamente). b e d – O Pico heterocigótico apenas é apresentado aproximadamente a 86,5°C (curva CT). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

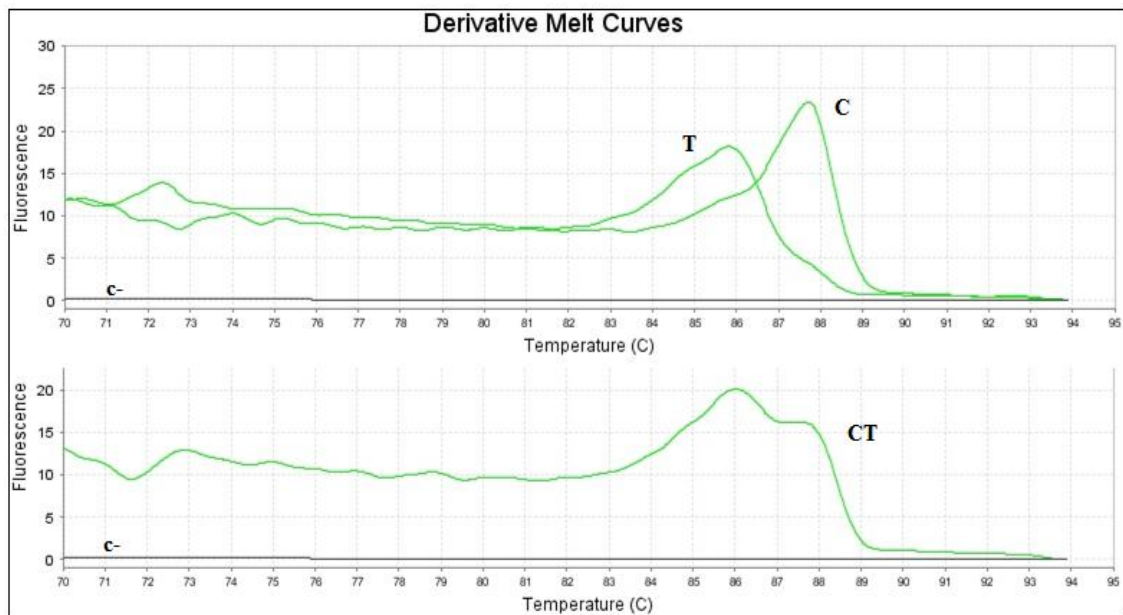


Figura 41: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. Pico homozigótico para T a 86°C e para C aproximadamente a 87,5°C (curvas T e C, respetivamente). A curva do fragmento heterozigótico consegue, aparentemente, separar em dois picos, um a 86°C e outro a 88°C (curva CT). Controlo negativo representado por "c-". Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Neste caso o produto de amplificação do fragmento heterozigótico apresenta dois picos, um a cada T_m correspondentes aos alelos em estudo, 86°C para o alelo T e 88°C para o alelo C.

Ainda se realizaram reações com 0,20 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward*, mas nestas condições deu-se um aumento acentuado da intensidade do pico correspondente ao alelo C, cuja curva do fragmento heterozigótico apenas ficou com um pico correspondente a esse alelo (dados não mostrados).

Numa próxima tentativa testou-se 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M *primer forward*, 40 ciclos, 60°C de temperatura de *annealing* e 0,0001ng/ μ L de fragmentos controlo positivo cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 42. Estas foram as condições ótimas a que se chegaram para este SNP.

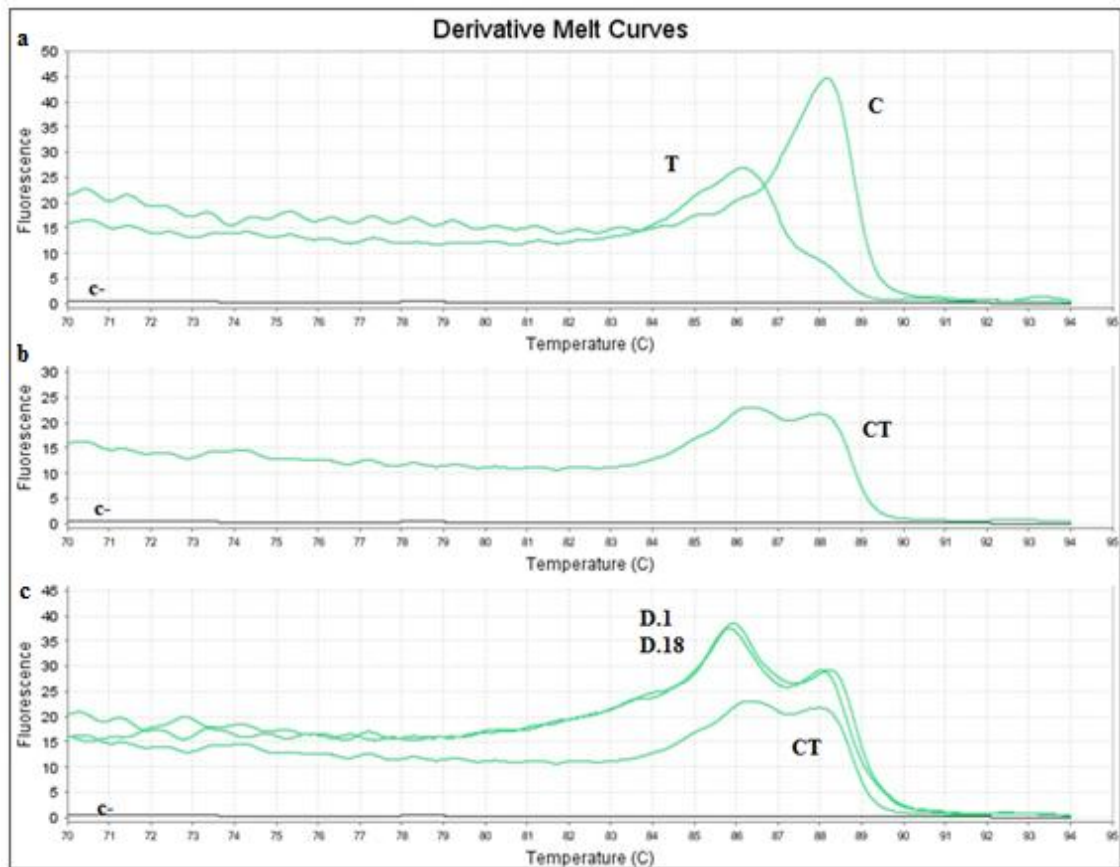


Figura 42: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Pico homocigótico para T a 86°C e para C a 88°C (curvas C e T, respetivamente). b – Picos do controlo heterocigótico a 86°C e a 88°C (curva CT). c – Sobreposição do controlo heterocigótico (curva CT) com as amostras 1 e 18 (curva D.1 e D.18) que possuem picos nas mesmas T_m. Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Como os resultados da Figura 42 mostravam que as amostras de DNA eram heterocigóticas, sequenciaram-se 10 amostras do fenótipo C (1, 18, 35, 41, 43, 45, 137, 198, 247, 264) para comprovar o seu genótipo. Da sequenciação resultou o genótipo CC para todas elas, à exceção da amostra 198 que é CT.

Visto que a sequenciação deu resultados diferentes da genotipagem pela técnica AS-PCR, foram tentadas otimizar as amostras 18 e 198 que passaram a ser os controlos positivos para as restantes amostras, tal como já foi feito no ACE_rs8075924.

iii.v.vi. Otimização dos controlos positivos (D18 e 198)

Para iniciar esta nova otimização experimentaram-se as condições iniciais: 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na

penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respectivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação, 40 ciclos de *annealing* com 60°C de temperatura de *annealing* e adição de 0,0001ng/ μ L de fragmento de controlo positivo e 1ng/ μ L de DNA (Figura 43). As amostras utilizadas na genotipagem por AS-PCR foram a 18 e 198.

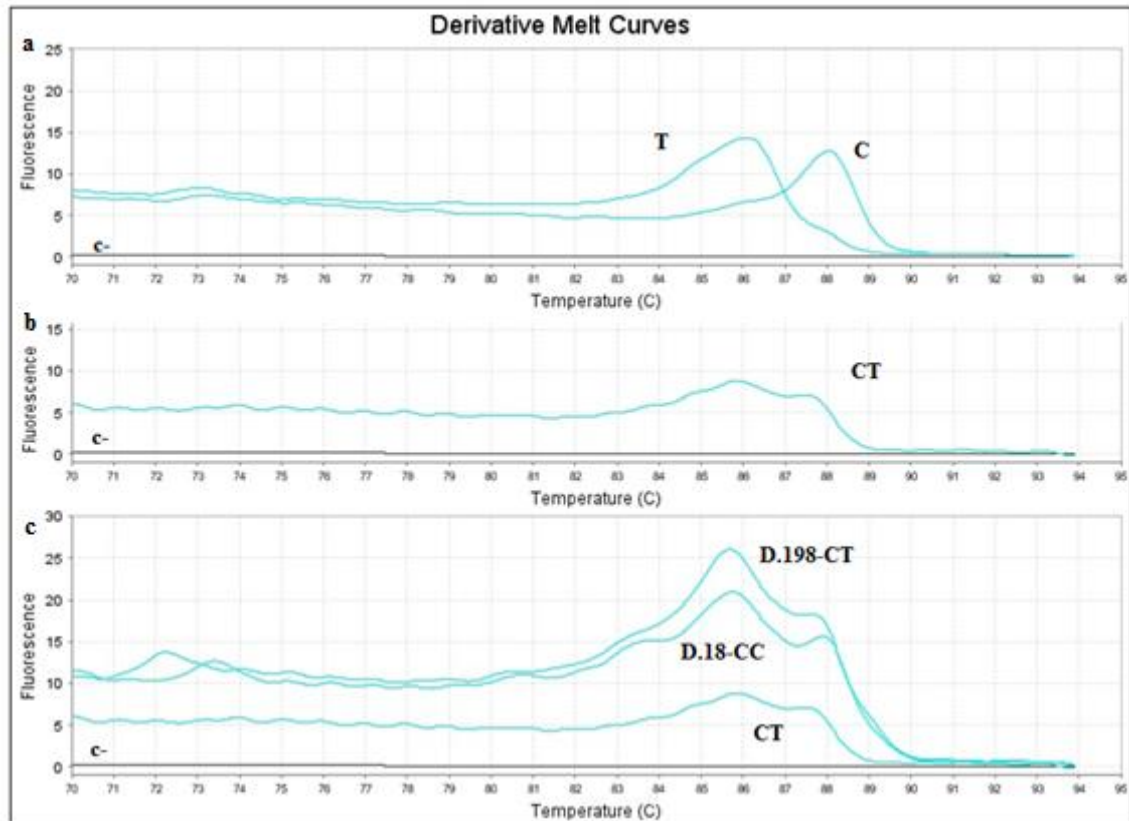


Figura 43: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respectivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de controlo positivo. a – Pico homocigótico para T a 86°C e para C a 88°C (curvas C e T, respetivamente). b – Picos do controlo heterocigótico a 86°C e a 87,5°C (curva CT). c – Sobreposição do controlo heterocigótico (curva CT) com as amostras 18 e 198 (curvas D.18-CC e D.198-CT), que possuem picos nas mesmas T_m, embora a 18 tenha genótipo CC por sequenciação (D.18-CC). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Apesar de ter sido comprovado, por sequenciação, que a amostra 18 tinha genótipo CC e a 198 TT, as condições de genotipagem realizadas por AS-PCR indicam novamente que ambas as amostras são heterocigóticas.

Foi alterada a quantidade de *primer* para melhorar os resultados: 0,15 μ M e 0,10 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respectivamente, e 0,25 μ M de *primer forward*, mas os resultados (dados não mostrados) foram muito semelhantes aos da Figura 43.

Entretanto ainda se realizaram reações com 0,15 μ M e 0,05 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* (Figura 44).

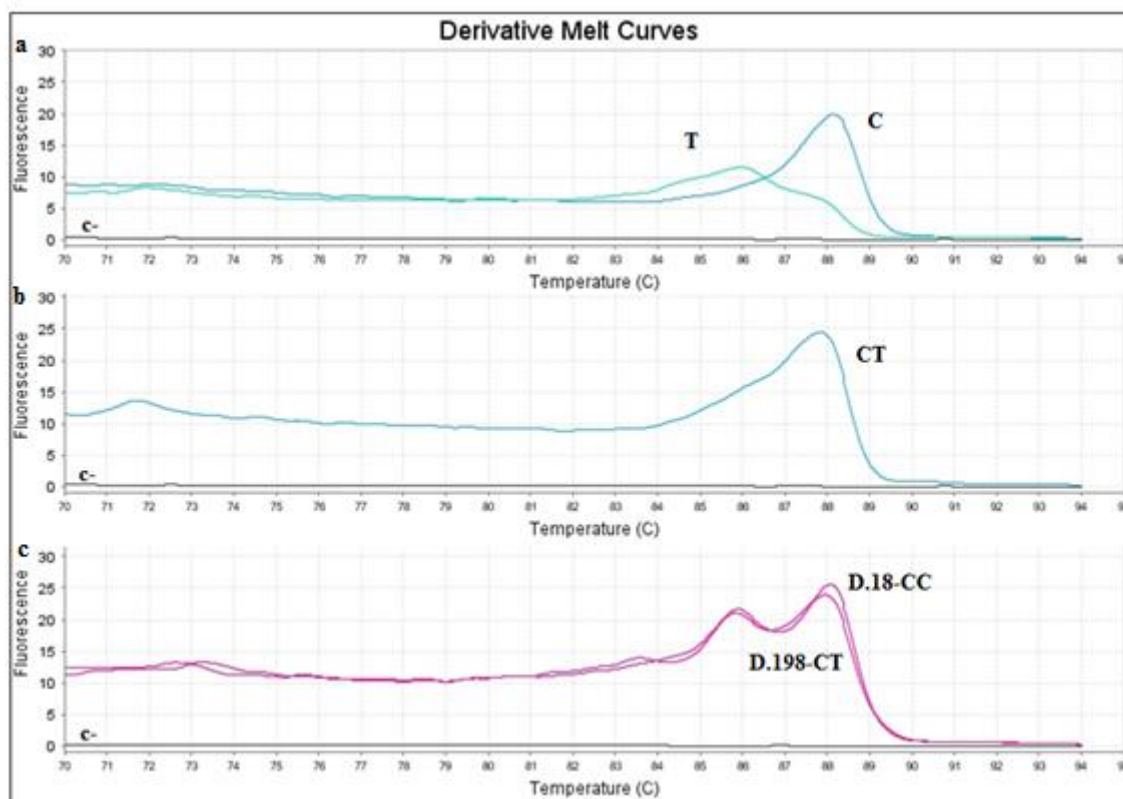


Figura 44: Curvas das derivadas de *melting* para o ACE_rs12720744. Reações com 0,15 μ M e 0,05 μ M de *primers reverse* específicos para os alelos C e T, com *mismatch* na penúltima e na antepenúltima base da extremidade 3', respetivamente, e 0,20 μ M de *primer forward* no mesmo poço de reação. Adição de 0,001ng/ μ L de fragmentos de controlo positivo. a – Pico homocigótico para T a 86°C e para C a 88°C (curva C e T, respetivamente). b – O pico do controlo heterocigótico apenas é apresentado a 88°C. c – Sobreposição das amostras 18 e 198 (curvas D.18-CC e D.198-CT), com picos a 86°C e a 88°C, embora a 18 tenha genótipo CC por sequenciação (D.18-CC). Controlo negativo representado por “c-”. Programa de PCR com 40 ciclos e 60°C de temperatura de *annealing*.

Aqui verifica-se que devido à baixa quantidade de *primer* específico para o alelo T (em relação ao C), não houve separação dos picos da curva representativa do controlo heterocigótico (curva CT). No entanto a amostra 18 já aparece com um pico com maior intensidade na T_m correspondente ao alelo C.

Após estas tentativas desistiu-se de genotipar este SNP por AS-PCR e uma das causas para o insucesso poderá estar no facto destes *primers* específicos possuírem uma percentagem elevada em conteúdo GC (entre 66 e 70%).

Visto que os indivíduos não foram genotipados por AS-PCR, sequenciou-se um conjunto maior de DNAs, 40 no total: 25 do fenótipo C, 8 do fenótipo B e 7 do fenótipo A (Anexo III). Os *primers* de sequenciação utilizados para este SNP permitiram sequenciar também os SNPs ACE_rs113110741 e ACE_rs12720744, devido à proximidade destes 3 SNPs na sequência do gene.