

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Diagnóstico Molecular da
Cardiomiopatia Dilatada Canina - Isolamento e Sequenciação Parcial
de um Gene Candidato**

Sara Maria Lopes Carvalhosa

Orientador
Mestre Cláudia Sofia Narciso Fernandes Baptista

Co-Orientadores
Doutor Miguel Ângelo Rodrigues Pinto de Faria

Dr. Luís Pedro Rodrigues de Lima Lobo

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Diagnóstico Molecular da
Cardiomiopatia Dilatada Canina - Isolamento e Sequenciação Parcial
de um Gene Candidato**

Sara Maria Lopes Carvalhosa

Orientador
Mestre Cláudia Sofia Narciso Fernandes Baptista

Co-Orientadores
Doutor Miguel Ângelo Rodrigues Pinto de Faria

Dr. Luís Pedro Rodrigues de Lima Lobo

Agradecimentos

As primeiras palavras de agradecimento terão, necessariamente, de ser dirigidas à Filipa Rio, colega de curso, a quem devo inteiramente a realização deste estágio. Um muito obrigado, Filipa; se não fosses tu, não teria tido esta oportunidade.

Ao Dr. Luís Lobo, mentor do projecto, por me ter permitido lidar com áreas diferentes de tudo aquilo que imaginava fazer e, sobretudo, pela confiança que depositou em mim desde o início.

Ao Doutor Miguel Faria, que pacientemente me orientou em todos os passos do trabalho, a mim que, como boa estudante de Veterinária, não percebia (quase) nada de Biologia Molecular. Um muito obrigada pela disponibilidade que sempre demonstrou.

À Prof. Cláudia Baptista, pela disponibilidade, apoio e segurança que me transmitiu ao longo do tempo; todas as notícias transmitidas por mim foram sempre recebidas com ânimo e motivação.

À Professora Doutora Eugénia Nunes, a minha terceira co-orientadora e, sem dúvida, grande motivadora durante todo o trabalho, pelo incansável apoio e estímulo à independência (não menosprezando as brilhantes analogias com que me brindou ao longo do tempo).

À Joana Rocha, pela maneira descontraída, mas rigorosa com que me transmitiu grande parte dos conhecimentos das técnicas laboratoriais que adquiri e por se ter mantido sempre por perto, disposta a ajudar, em qualquer situação.

Aos professores, que, cada um à sua maneira, contribuíram para a minha formação, não só profissional, mas também pessoal. Aos colegas de curso, alguns dos quais se tornaram amigos, que fizeram deste percurso uma experiência tão enriquecedora. E aos colegas do associativismo, pessoas muito particulares, por terem acreditado nas minhas capacidades e permitido que a minha experiência na faculdade fosse completa.

E como não poderia deixar de ser, à minha família, sobretudo aos meus pais, por me estimularem a fazer sempre mais e melhor. Ao meu namorado que, pacientemente, aguentou todos os momentos de angústia e de desespero que surgiram durante o curso e me ajudou a ultrapassá-los; o final do meu curso será, para ele, um alívio quase tão grande como para mim.

E a todos os outros que posso não ter referido aqui, mas a quem devo, certamente, um agradecimento, por fazerem parte da minha vida e me ajudarem a ser quem sou hoje. Este estágio foi completamente diferente do que eu tinha imaginado que iria fazer no final do curso, mas revelou-se um prazer e uma experiência profundamente enriquecedora. Um muito obrigada a todos.

Lista de Abreviaturas

A - Adenina

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

ARVD2 - Displasia ventricular arritmogénica tipo 2

AV - Atrioventricular

Bp - *Base pairs*, pares de bases

BSA - *Bovine Serum Albumin*, albumina sérica bovina

CCM - *Chemical Cleavage Method*, método de clivagem química

C - Citosina

CSGE - *Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*, electroforese em gel sensível à conformação

CMD - Cardiomiopatia dilatada

CMD1E - Fenótipo de CMD relacionado com problemas de condução

d-NTP - Desoxirribonucleotídeo

dd-NTP - Didesoxirribonucleotídeo

dd-ATP – Didesoxi-adenina trifosfato

dd-CTP – Didesoxi-citosina trifosfato

dd-GTP – Didesoxi-guanina trifosfato

dd-TTP – Didesoxi-timina trifosfato

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, electroforese em gel com gradiente de desnaturação

DHPLC - *Denaturing high-performance liquid chromatography*, Cromatografia Líquida de Alta Performance Desnaturante

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilenodiamino tetra-acético

EMC - *Enzyme Mismatch Cleavage*

F - Fenilalanina

FA - Fibrilhação atrial

G - Guanina

HA - *Heteroduplex Analysis*, análise de heteroduplexes

IC - Insuficiência cardíaca

ICC - Insuficiência cardíaca congestiva

L - Leucina

LQT3 - Síndrome do QT longo de tipo 3

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*, reacção em cadeia da polimerase.

PFGE - *Pulse Field Gel Electroforesis*, electroforese de gel em campo pulsado.

PTT - *Protein Truncation Test*, teste de truncamento de proteínas

S - Serina

SCN5A - Gene da subunidade α do canal de sódio dependente da voltagem

SE - Serra da Estrela

SNPs - *single nucleotide polymorphisms*

SRD - sem raça determinada

SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*, polismorfismo conformacional de cadeia simples

TAE - *Tris Acetate EDTA*

TBE - *Tris Borate EDTA*

T_H - Temperatura de hibridização

T - Timina

UV - Ultra-violeta

VPC's - *Ventricular premature contractions*, contracções ventriculares prematuras

Resumo

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma doença do miocárdio caracterizada por dilatação ventricular e depressão da função sistólica, constituindo a causa mais frequente de insuficiência cardíaca. É uma das doenças cardiovasculares mais comuns da prática clínica, cuja etiologia é complexa e, muitas vezes, difícil de determinar.

O objectivo do trabalho realizado foi o desenvolvimento de uma técnica molecular de diagnóstico da CMD canina que, não permitindo obter resultados definitivos pela escassez de tempo e de meios, pudesse servir de base a estudos posteriores sobre o assunto. Foi pesquisado um gene específico anteriormente descrito em casos de CMD associada a distúrbios de condução em humanos (Olson *et al.* 2005) que codifica um canal iónico, uma abordagem diferente daquela que tem sido empregue em estudos na espécie canina onde a estratégia tem sido pesquisar genes ligados a componentes do citosqueleto. Foi estudada a raça de cães da Serra da Estrela pela presença de uma arritmia de características semelhantes às aquelas observadas em humanos e utilizando dados de diagnóstico clínico e amostras recolhidas num trabalho anterior (Lobo *et al.* 2008). Mais do que chegar a conclusões sobre a influência do gene na CMD, procurou-se ampliar conhecimentos na área da Biologia Molecular através do estudo e aplicação prática de técnicas como extracção de ácido desoxirribonucleico (ADN), amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), sequenciação e análise e interpretação de electroferogramas. Os resultados obtidos são bastantes promissores no que respeita à relação do gene estudado com a doença, todavia mais estudos devem ser continuados para permitir a obtenção de resultados definitivos. Resultaram deste trabalho também a aquisição de competências no âmbito da Biologia Molecular e a aplicação bem sucedida das várias técnicas. Esta é uma ciência que necessariamente adquirirá um papel fundamental na prática clínica onde a sua aplicação é de indubitável relevância.

Índice

Agradecimentos	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Introdução/ Revisão Bibliográfica	1
Cardiomiopatia dilatada	1
Diagnóstico genético	3
Técnicas de Biologia Molecular	5
Extracção de ADN.....	5
Electroforese	6
Sequenciação	10
Material e Métodos.....	14
Escolha dos animais / Exame clínico.....	14
Recolha de amostras.....	14
Escolha de amostras/ organização do estudo	14
Extracção de ADN	15
Amplificação por PCR.....	16
Purificação/ Sequenciação de produtos amplificados	17
Análise de sequências/ electroferogramas	18
Resultados	18
Extracção de ADN	18
Amplificação por PCR.....	18
Electroferogramas	19
Discussão	20
Bibliografia	26
Anexos.....	31

Introdução/ Revisão Bibliográfica

Cardiomiopatia dilatada

A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma patologia miocárdica primária de ocorrência em animais de companhia e em seres humanos que se caracteriza por dilatação das câmaras cardíacas (sobretudo esquerdas), disfunção sistólica (maioritariamente) ou diastólica por perda da força de contracção miocárdica e aumento da esfericidade do coração na ausência de outras patologias cardíacas clinicamente importantes (Tidholm *et al.* 2001) e que, na maioria dos casos, evolui para insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Borgarelli *et al.* 2001). Em cães, existe normalmente uma fase pré-clínica ou assintomática da doença, em que vários mecanismos compensatórios estão a actuar para manter o débito cardíaco e prevenir a ICC, que pode ser detectada por testes clínicos, mas que normalmente passa despercebida ao proprietário e ao clínico. A esta segue-se a fase sintomática após um período de tempo variável, sendo que a taxa de progressão da doença não é conhecida (Borgarelli *et al.* 2001). Na fase sintomática, os sinais são típicos de ICC esquerda ou bilateral, causados por congestão (edema pulmonar, dispneia, tosse) e débito diminuído (depressão, perda de peso, intolerância ao exercício). Podem detectar-se arritmias acompanhando fases avançadas da doença ou ICC, mas que também podem estar presentes antes da ICC em pacientes com CMD hereditária, e que, apesar de serem comuns, não são específicas da doença (fibrilhação atrial (FA) e contracções ventriculares prematuras (VPC's)). O sinal radiográfico mais comum em pacientes sintomáticos é o edema pulmonar, mas também podem ser observados sinais de insuficiência cardíaca (IC) direita (derrame pleural e pericárdico e ascite) (Hershberger *et al.* 2009, Tidholm *et al.* 2001).

A etiologia da hipocinese miocárdica é raramente conhecida no caso da CMD canina isolada, mas têm sido discutidas várias teorias acerca da sua origem: genética, nutricional, metabólica, inflamatória, infecciosa ou induzida por toxinas ou fármacos (Tidholm *et al.* 2001).

A CMD apresenta uma certa uniformidade dentro de determinadas raças de cães, que representam populações fechadas com uma elevada prevalência, levando à classificação de familiar; por isto, há muito que se suspeita que tenha uma origem genética, ao contrário do que tem acontecido na medicina humana onde, só recentemente se assumiu que seria esta a origem em cerca de 30% dos casos. Aliás, foi provado que a CMD é hereditária em várias raças caninas, incluindo Doberman pinscher, Dogue alemão, Terra Nova, Wolfhound Irlandês e Cão de Água Português (Meurs 2010). Por este motivo, tem havido um interesse crescente em investigar a base genética da CMD em raças específicas, sobretudo porque as famílias de cães oferecem vantagens sobre as humanas, uma vez que são maiores, têm um tempo de geração

rápido, facilmente se pode aceder a 3 ou mais gerações ao mesmo tempo e têm uma evolução mais rápida da doença. Face à grande heterogeneidade observada em humanos, o cão surge, assim, como um modelo interessante para este tipo de estudos. No entanto, estes estudos exigem que se faça um diagnóstico correcto da doença; por esse motivo, têm sido feitos esforços para a criação de sistemas de classificação precisos (Dukes-McEwan *et al.* 2003, Distl *et al.* 2007). A elevada percentagem de similaridade entre as espécies torna a relação entre elas vantajosa para ambas as partes, isto é, pesquisas de mutações em cães para patologias de fenótipos semelhantes aos dos humanos fornecem uma base para estudos nesta espécie e vice-versa, permitindo evolução na compreensão da CMD em ambas (Dukes-McEwan *et al.* 2003).

Para estudar as formas genéticas de CMD é primeiro necessário distingui-las das várias causas adquiridas da doença. Após exclusão destes diagnósticos, classifica-se como CMD idiopática, que inclui as causas genéticas. Quando a 2 ou mais membros próximos de uma família é atribuída esta classificação, faz-se o diagnóstico de CMD familiar, prosseguindo com estudos que incluam a história familiar e testes de genética molecular disponíveis em laboratório (Hershberger *et al.* 2007).

Foram descritos vários modos de transmissão da CMD, mas a autossómica dominante é a mais comum em CMD humana não associada a outro tipo de patologias do sistema músculo esquelético, tendo sido descritos 24 *loci* com mutações causadores de CMD (Tabela 1, Anexos); além destes, foram descritos 2 *loci* ligados ao cromossoma X e 1 autossómico recessivo (Hershberger *et al.* 2007). Em cães, a transmissão autossómica dominante foi associada às raças Wolfhound, Terra Nova e Doberman (Dukes-McEwan *et al.* 2003), embora outros modos também tenham sido descritos. Muitas regiões foram mapeadas nesta espécie, mas o gene ainda não foi identificado (Distl *et al.* 2007).

Em humanos, a maioria dos genes identificados como causadores de CMD codificam proteínas estruturais do aparelho contráctil e do citosqueleto. No entanto, recentemente têm sido descritos defeitos genéticos associados a distúrbios da condução com CMD concomitante (Greenlee *et al.* 1986, Kaas *et al.* 1994, Olson & Keating 1996, McNair *et al.* 2004, Olson *et al.* 2005, Bezzina *et al.* 2003, Chen *et al.* 2002, Hoorntje *et al.* 1999, Bienengraeber *et al.* 2004, Tiso *et al.* 2001, Taylor *et al.* 2003, Wolf *et al.* 2007), apesar de as mutações em genes que codificam canais iónicos sejam a base molecular de arritmias atriais e ventriculares normalmente isoladas. As mutações no gene da proteína da membrana nuclear *lamin A/C* têm manifestações pleiotrópicas cardíacas e não cardíacas incluindo CMD (Taylor *et al.* 2003, Wolf *et al.* 2008), FA e distúrbios de condução, apesar do mecanismo exacto pelo qual as mutações causam patologia cardíaca mecânica e/ou eléctrica não ser conhecido (Olson *et al.* 2005).

Também se demonstrou que alterações nas proteínas de canais iónicos HERG (Bezzina *et al.* 2003) e ABCC9 (Bienengraeber *et al.* 2004) conferem susceptibilidade para CMD, pois impedem ajustes do potencial de membrana, bem como alterações na circulação do cálcio intracelular por mutações da proteína fosfolamban (Olson *et al.* 2005, Bienengraeber *et al.* 2004, Hoorntje *et al.* 1999). Mutações no gene codificador do receptor de rianodina provocam um fenótipo semelhante, a displasia ventricular arritmogénica tipo 2 (ARVD2) (Tiso *et al.* 2001) e um fenótipo de CMD relacionado com problemas de condução, CMD1E, também foi descrito (McNair *et al.* 2004). Todos estes estudos levam à possibilidade de a CMD resultar não só de alterações estruturais nos miócitos, mas também de alterações da homeostase iónica. Estudos iniciais não conseguiram localizar a zona da mutação (Greenlee *et al.* 1986), mas a investigação subsequente permitiu restringir áreas associadas a ambas as condições, isto é, distúrbios de automaticidade e condução e CMD. Uma área definida foi a do cromossoma 3p22-p25 (Olson & Keating 1996) que contém o gene da subunidade α do canal de sódio dependente da voltagem (SCN5A), o qual tinha sido associado com vários distúrbios de condução: distúrbio de condução cardíaca progressivo (síndrome de Lenègre), defeito de condução cardíaca isolado, bloqueio atrioventricular (AV), síndrome do seio doente, síndrome da morte súbita infantil, síndrome de QT longo e síndrome de Brugada. Esta região contém ainda o *locus* para CMD ventricular direita, o que a tornou um potencial candidato para CMD relacionada com problemas de canais iónicos, obtendo-se confirmação posteriormente (McNair *et al.* 2004, Hesse *et al.* 2007). A CMD devida a mutações no gene SCN5A foi descrita em síndrome do QT longo de tipo 3 (LQT3) e distúrbio de condução congénito (Hoorntje *et al.* 1999).

Em cães, ainda não foram identificadas mutações associadas a CMD. No entanto, há vários estudos realizados ou ainda em curso (Spier *et al.* 2001, Meurs *et al.* 2001, Stabey *et al.* 2004) e foi feito trabalho com o objectivo de seleccionar genes candidatos (a partir de dados de medicina humana) para que a pesquisa fosse aprofundada, embora se foquem essencialmente em defeitos de componentes do citosqueleto, pois pensa-se que será o mais lógico, dado o fenótipo associado às formas tardias de CMD na maior parte das raças (Wiersma *et al.* 2004).

Diagnóstico genético

Os testes de genética molecular (*molecular genetic testing*), também chamados de testes baseados em ADN ou testes de ADN, envolvem o estudo desta molécula através de análise de associação ou *linkage analysis*, sequenciação ou um dos vários métodos de detecção de mutações (Pagon *et al.* 1993-2007).

Os testes moleculares podem ser divididos em grupos de acordo com o objectivo da sua utilização. Estes testes são usados: (i) para confirmar ou excluir um diagnóstico numa

determinada doença genética num indivíduo sintomático; (ii) em triagem pré-natal e neonatal quando um membro da família está afectado por uma mutação causadora de doença para identificar membros da família que possam estar em risco de ter a mesma mutação ou para discriminar portadores obrigatórios que, sendo assintomáticos, têm a mutação (por análise da história familiar) e podem transmiti-la à sua descendência (sobretudo em autossómicas dominantes e recessivas ligadas ao cromossoma X); (iii) para identificar indivíduos que virão a apresentar a doença hereditária numa fase mais tardia (sobretudo doenças autossómicas dominantes); (iv) para avaliar a susceptibilidade genética a doenças multifactoriais ou complexas; e (v) para testar a resposta a medicamentos (Pagon *et al.* 1993-2007).

Não existe um método padronizado de abordagem deste tipo de estudos, mas, em todos os casos, é essencial que haja uma estreita ligação entre trabalho clínico, testes laboratoriais e análise informática. Todos os métodos convergem para a análise de mutações num gene candidato, tornando, por isso, fundamental, a sua identificação. Os métodos de identificação podem dividir-se naqueles que não exigem que se conheça a localização cromossómica da doença e naqueles que dependem deste conhecimento, mas, na realidade, os projectos tendem a adoptar várias vias paralelas também de acordo com o desenvolvimento das técnicas que possa ocorrer (Strachan & Read 1999).

Os critérios para a escolha de um gene candidato são o padrão de expressão e funções compatíveis com o fenótipo da doença e a homologia com outros genes da mesma espécie ou de outra na qual o gene apresenta os mesmos padrões de expressão ou função (Aguirre-Hernández & Sargan 2005). Este último é particularmente útil devido à elevada percentagem de similaridade estrutural e funcional entre espécies muito pouco relacionadas (e.g., entre humanos e ratos praticamente todos os genes têm um correspondente). Uma maneira bastante utilizada de seleccionar genes candidatos é consultar as bases de dados na procura de genes homólogos naqueles organismos modelo muito bem estudados; se for detectada homologia, pode-se saber aquilo que é está descrito sobre a sua função, permitindo conhecer qual o padrão de expressão e o fenótipo dos mutantes (Strachan & Read 1999). No entanto, este método do gene candidato nem sempre é aplicável, pois a conservação de sintenia (os *loci* têm de estar juntos num mesmo cromossoma em ambos os organismos) em muitos casos não é suficiente para identificar candidatos posicionais (Strachan & Read 1999). Em alternativa, pode-se analisar a percentagem de similaridade entre sequências de ADN através de uma análise BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) seguida de uma análise de associação que consiste em testar polimorfismos na sequência de ADN (variantes normais) que estão próximos ou incluídos num determinado gene de interesse para

avaliar, dentro duma família, a heritabilidade duma mutação causadora de doença. (Pagon *et al.* 1993-2007).

Ao contrário do que habitualmente se pensa, o cão apresenta uma grande semelhança de sequências codificantes com o ser humano, maior do que deste com o rato, apesar dos últimos terem um ancestral comum mais recente. Aliás, das mais de 350 doenças hereditárias descritas no cão, mais de 50% são comuns aos humanos, levando à escolha desta espécie como modelo para estudo de várias doenças (e.g., distrofia muscular, distúrbios de coagulação, entre outras) e desenvolvimento de terapias antes de serem testadas em humanos. Os métodos de pesquisa de mutações são também os descritos anteriormente, havendo estudos que indicam que a análise de associação obtém melhores resultados (Aguirre-Hernández & Sargan 2005).

Após a análise do genótipo, é necessário fazer a reconstituição do fenótipo normal *in vitro* e criação de modelos da doença em animais para se estabelecer a correlação genótipo-fenótipo, isto é, a associação entre uma determinada variação ou variações de sequência e o padrão de anomalias resultante. Uma grande correlação permite a inferência fiável sobre um fenótipo, dado o genótipo. A questão pode ser colocada ao contrário, isto é, perante um fenótipo, qual será o genótipo mais provável? Esta correlação fenótipo-genótipo permite indicar quais os testes indicados para detecção de variações de sequência (Pagon *et al.* 1993-2007). Após confirmação do gene candidato, estuda-se a sua função (Strachan & Read 1999).

Técnicas de Biologia Molecular

Extracção de ADN

Em qualquer estudo que envolva análise de material genético é necessário obter amostras de material biológico que o contenham. Estas podem ser de vários tipos, como sangue, tecidos, fezes, entre outras, nas quais, as moléculas dos ácidos nucleicos não estão livres, mas sim contidas em células. É, por isso, necessário isolar estas moléculas num processo denominado de extracção de ADN.

A extracção é um processo que consiste em isolar as moléculas de ADN. Para isso, é necessário promover a digestão dos tecidos ou células para que estas percam a sua estrutura e exponham o ADN. Este processo pode ser realizado por métodos físicos ou químicos. É igualmente necessário inactivar as nucleases para que não actuem degradando o ADN (adicionando, por exemplo, um agente quelante de metais como o EDTA); segue-se a lise das membranas celulares e a eliminação de proteínas, normalmente por adição de proteases e detergentes; e a remoção do ácido ribonucleico (ARN) residual por adição de ARNases para não interferir com os testes subsequentes. Após estes passos, pode-se provocar a

concentração de ADN por precipitação num meio alcoólico, pois aquele não é solúvel e as suas moléculas agregam-se, permitindo a sua separação por centrifugação. Nos métodos que utilizam colunas com fases sólidas adsorventes do ADN, estas possuem matrizes de sílica ou outras fases às quais o ADN se liga, na presença de um meio salino adequado; são feitas várias lavagens com soluções tamponadas para remoção de impurezas e finalmente o ADN é eluído com água ou com tampões de eluição aquosos com baixa concentração de sal e pH=8 (Invitrogen™ 2007).

Electroforese

A electroforese, apesar da sua simplicidade em termos conceptuais e de técnica, é das principais ferramentas utilizadas em Biologia Molecular. Baseia-se na aplicação de corrente eléctrica sob a acção da qual moléculas electricamente carregadas se movem, separando-se de acordo com o seu tamanho, forma e carga. A electroforese pode ser aplicada a moléculas de ADN e ARN, mas também a proteínas. Permite: separação de ADN com tamanho entre 100 bp e 50 Kbp, incluindo ADN genómico digerido por enzimas de restrição, antes da transferência por *Southern Blot* ou para ARN antes de transferência *Northern Blot*; análise de produtos de PCR para verificar a eficiência da amplificação; estimativa do tamanho de moléculas de ADN usando marcadores ou *ladders* que contêm fragmentos de vários tamanhos conhecidos; estimativa aproximada da quantidade (usando o marcador Lambda ADN) e qualidade de ADN (ausência de produtos inespecíficos e contaminantes); e separação para outras técnicas, incluindo ADN *fingerprinting* (Brown 2002).

Inicialmente, a electroforese era conduzida num meio líquido, mas não era eficiente na separação de ADN, pois, numa solução, os principais factores que influenciam a velocidade de migração são a forma e a carga eléctrica da molécula e, no caso do ADN, as moléculas são maioritariamente de forma linear e não possuem diferenças de carga (que variam com o tamanho da molécula) suficientes para que haja uma separação eficaz (Brown 2002). Assim, é necessário criar uma espécie de crivo através do qual as moléculas têm de passar para atingir o pólo positivo. Isto é possível com um gel (de agarose ou de poliacrilamida), pois este forma uma rede de poros através da qual as moléculas de ADN têm de passar; neste caso, a carga e a forma das moléculas é menos importante e o tamanho da molécula passa a ser determinante para a velocidade de migração; as mais pequenas atravessam a rede mais facilmente e, por isso, movem-se mais rapidamente ao contrário do que acontece com moléculas de maiores dimensões. O gel pode ter diferentes concentrações: mais concentrado forma uma rede mais estreita e, por isso, só moléculas de pequenas dimensões o atravessam (e.g. produtos de PCR); e menos concentrado forma uma rede mais larga e pode ser, por isso, aplicado a moléculas maiores (e.g. amostras de extracção de ADN). Por exemplo, um gel de 0,3% pode

ser usado para moléculas com 5 a 50 kbp e um gel de 5% para moléculas com 100 a 500 bp (Brown 2002). O tipo de gel mais comumente utilizado é o gel de agarose; o gel de poliacrilamida é usado sobretudo em sequenciação, pois tem uma resolução muito superior ao de agarose, permitindo distinguir fragmentos com diferença de apenas 1 nucleótido.

O gel é uma placa horizontal obtida dissolvendo agarose em pó numa solução tampão (TAE (*Tris Acetate EDTA*) ou TBE (*Tris Borate EDTA*)) em proporções que variam com a concentração que se pretende. O TAE é o mais utilizado, pois, apesar de ser o que tem menor efeito tampão e de precisar de uma menor voltagem e de mais tempo, é o que permite melhor resolução para fragmentos de ADN maiores. A solução é, então, colocada em placas que servem de molde para o gel onde este solidifica, sendo colocado um pente para formar diferentes poços onde são depositadas as amostras a serem analisadas simultaneamente. Os poços ficam numa extremidade do gel e são colocados do lado do eléctrodo negativo para que as moléculas de ADN migrem através do gel no sentido do eléctrodo positivo, uma vez que se encontram carregadas negativamente a pH=8 devido à ionização do grupo fosfato. É usado um corante de carregamento que se mistura com as amostras para lhes conferir densidade que faz com que não saiam dos poços e para que se possa visualizar a migração dos fragmentos. Os corantes de carregamento mais usados são o azul de bromofenol e o xileno de cianol; a densidade é conferida por sacarose ou glicerol. Ambos são carregados negativamente e, como tal, migram na mesma direcção do ADN. A electroforese é realizada submergindo o gel no mesmo tampão usado na sua composição. É também colocado, num dos poços, um marcador, uma amostra com fragmentos de ADN conhecidos, para inferir sobre o tamanho dos produtos obtidos.

Esta técnica exige ainda que se use um agente intercalante que se liga às moléculas (intercalando-se com os pares de bases), conferindo-lhes fluorescência para que seja possível observar as bandas sob luz UV. O agente mais usado é o brometo de etídio em forma de solução na qual o gel é submergido após a electroforese. Actualmente, surgiu um outro agente, o GelRedTM da Biotium (Hayward, CA), que é um substituto directo do brometo de etídio, pois possui praticamente o mesmo espectro e é aplicável a ADN e ARN, mas que tem a vantagem de não ter o potencial citotóxico e mutagénico deste, de ter sensibilidade superior e muito boa estabilidade a temperatura ambiente e de ser resistente a altas temperaturas pelo que é aplicado à solução do gel ainda não solidificado.

Para que se dê a migração dos ácidos nucleicos, aplica-se uma diferença de potencial de cerca de 5V/cm de distância entre os 2 pólos. É possível usar diferentes voltagens para se obter diferentes velocidades de migração, mas não se deve correr o gel rapidamente logo no início,

pois isto pode aquecê-lo, levando-o à fusão, comprometendo seriamente a resolução (Brown 2002).

Concluída a electroforese, os géis são observados sob luz UV para que as bandas fiquem fluorescentes e visíveis. Nesta fase, podem ser confirmados os tamanhos dos fragmentos de acordo com o marcador usado e, no caso das extracções destinadas a serem submetidas a amplificação por PCR, decidida a diluição que deve ser feita de acordo com a intensidade da banda.

Amplificação

A amplificação por PCR é um método que permite obter milhões de cópias de um determinado segmento de ADN partindo de uma quantidade diminuta de amostra. A sua descoberta simplificou em larga medida e, em alguns casos, viabilizou, os processos de clonagem, análise e modificação de ADN, sendo talvez a mais importante de todas a sequenciação genómica em grande escala, revolucionando a investigação em Biologia Molecular e a biotecnologia. Surgiram rapidamente melhoramentos e variações no processo, existindo actualmente centenas de aplicações baseadas em PCR utilizadas em diversos campos de investigação. Pode ser usada para gerar quantidades suficientes de ADN utilizado em testes subsequentes (e.g., sequenciação, pesquisa de mutações) ou pode funcionar como um teste em si mesma (por exemplo, *allele-specific amplification*, *nucleotide repeat quantification*).

O método consiste em separar a cadeia dupla de ADN em 2 cadeias simples (*templates*), adicionar 1 par de pequenas sequências oligonucleotídicas específicas iniciadoras de cerca de 20 bp (*primers*), que se ligam às regiões complementares do *template* e que servem de limite do segmento de ADN a amplificar sendo, também, o ponto de partida para a enzima Taq polimerase sintetizar uma cadeia complementar, usando desoxirribonucleótidos (dNTPs) presentes no meio. É necessário, para que ocorra reacção, adicionar ainda um tampão da Taq polimerase, MgCl₂ e água bidestilada ou ultra-pura. Pode ainda ser adicionada BSA (*Bovine Serum Albumin*) com o intuito de reduzir ligação não específica da enzima. À mistura destes reagentes e dos referidos anteriormente chama-se *Master Mix*. Esta é colocada em micro-tubos aos quais se adiciona a amostra do ADN extraído, colocando-se depois os tubos num termociclador que é programado para executar 30-40 ciclos de desnaturação, hibridização e extensão com tempos e temperaturas específicos em função do fragmento a ser amplificado (Figura 1, Anexos).

Os ciclos começam com a desnaturação, um aquecimento até os 94°C durante cerca de 30 segundos que provoca separação das cadeias de ADN por quebra das pontes de hidrogénio e pára todas as reacções enzimáticas. A ADN polimerase proveniente da bactéria *E.coli* usada

inicialmente era destruída nesta fase de desnaturação e, por isso, tinha de ser novamente adicionada a cada ciclo. A Taq polimerase usada actualmente provém da bactéria *Thermophilus aquaticus* Yellowstone type-1 que, sendo termofílica, resiste à temperatura de desnaturação, permitindo a realização de todos os ciclos sem necessidade de ser adicionada a cada ciclo. Segue-se um arrefecimento rápido até à temperatura de hibridização (T_H) ou de *annealing* específica para cada *primer* que, apesar de permitir alguma re-hibridização das cadeias de ADN, permite o emparelhamento dos *primers* com os templates; ligações mais estáveis, isto é, locais onde os *primers* são complementares, permanecem mais tempo. Esta é a fase de hibridização. Neste momento, a temperatura volta novamente a subir para os 72°C, temperatura óptima de actividade da Taq polimerase, que se liga aos *primers* na sua extremidade 3', e começa a adicionar dNTPs complementares às bases do template na direcção 5'→3', sintetizando a cadeia complementar do *template* a partir do *primer* (extensão); à medida que as ligações se vão formando, as forças iónicas tornam-se tão fortes que as ligações entre *primer* e *template* não se perdem; pelo contrário, *primers* que não encontraram a base complementar, separam-se devido às elevadas temperaturas. Em seguida, começa um novo ciclo (Brown 2002). Neste primeiro ciclo, são formados produtos longos com extremidades 5' idênticas, mas 3' aleatórias correspondendo aos locais onde a síntese termina ao acaso. No 2º ciclo, os produtos do 1º servem de template dando origem a produtos curtos ou *amplicons* com as extremidades 5' e 3' definidas pelas posições de emparelhamento dos *primers*. Nos ciclos seguintes, estes produtos curtos são amplificados a uma taxa de replicação exponencial até que um dos reagentes se esgota e param as reacções. Com quantidades diminutas de ADN (e.g. uma única molécula) conseguem-se grandes quantidades de produtos de PCR. Uma visão esquemática da técnica está presente na Figura 1 dos Anexos.

Os resultados podem ser visualizados de várias maneiras, sendo a mais comum a electroforese em gel de agarose que, idealmente, demonstraria uma única banda se o PCR tiver funcionado e se um único segmento do ADN analisado tiver sido amplificado. Como este método é muito sensível, é necessário executá-lo com muito cuidado para que não existam contaminações que seriam igualmente amplificadas, alterando os resultados finais.

Apesar das grandes melhorias que este método trouxe, há algumas desvantagens, como a limitação em termos de tamanhos de produtos, uma vez que não é possível copiar produtos com mais e 100 Kbp (projectos de sequenciação de genomas) e a necessidade de conhecimento das sequências onde os *primers* vão emparelhar para que estes possam ser sintetizados, impedindo a utilização deste método em casos de fragmentos cuja sequência seja desconhecida. No entanto, este último problema pode ser obviado se a clonagem de ADN for

feita através de vectores, pois, desse modo, podem ser usados *primers* universais que correspondem a regiões do vector e não da sequência a amplificar (Brown 2002).

Sequenciação

A sequenciação consiste em determinar qual a sequência de nucleótidos - A, T, G e C - de um determinado fragmento de ADN, sendo considerada o método mais adequado para detecção de mutações (GBTEH 2006). É um método que envolve uma reacção, uma separação, um processo de detecção e análise de dados. As técnicas podem envolver reacções de bases específicas ou extensões enzimáticas através de ADN polimerases. A separação é feita normalmente por electroforese de gel de poliacrilamida ou capilar. Os métodos mais comuns de detecção são feitos por fluorescência, embora a radioactividade também tenha sido usada anteriormente (Nunally 2005).

Dois métodos surgiram, quase que simultaneamente, em 1977, propostos por Sanger (método *chain-termination*), no qual a sequência de ADN de cadeia simples é determinada por síntese enzimática de cadeias polinucleotídicas complementares que terminam em posições nucleotídicas específicas, e por Maxam-Gilbert, (método *chemical degradation*) no qual a sequência é determinada por tratamento com químicos que clivam a molécula em posições nucleotídicas específicas marcadas (Brown 2002). Esta pode ser aplicada a cadeias simples e duplas de ADN e não implica a utilização de ADN polimerases. Quatro amostras de fragmentos marcados radioativamente são clivados quimicamente em bases específicas e separados por electroforese em 4 linhas diferentes com base nas reacções específicas aplicadas (Nunally 2005). O método de Sanger inicia-se com a desnaturação de várias cópias de ADN de cadeia dupla em cadeias simples. Estas eram misturadas com uma ADN polimerase, um *primer*, dNTPs de todas as quatro bases e tampão para minimizar alterações de pH. A mistura era dividida em alíquotas e colocada em 4 tubos diferentes com uma pequena quantidade de didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) que são dNTPs aos quais foi retirado um grupo hidroxilo da extremidade 3' e que eram marcados radioativamente. Quando um destes fragmentos era incorporado na nova molécula, a reacção parava e o fragmento não sofria mais extensão. As reacções eram separadas em 4 tubos, cada um com um tipo de ddNTP, formando produtos de cada um dos grupos (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP). Estes produtos eram depois sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida e ureia com cada um dos grupos numa linha individual. As bandas resultantes eram depois visualizadas por auto-radiografia ou sob luz UV e a sequência era determinada por observação da película de raio-X ou da imagem do gel e comparação de bandas em cada linha, devendo existir uma banda para cada posição; a sequência era lida do fundo do gel (5') para o topo (3') (Nunally 2005).

O método de Sanger (Figura 2, Anexos) tornou-se a técnica de eleição pela sua simplicidade, mas também porque foi mais fácil de automatizar, tornando possível realizar projectos de sequenciação de genomas em períodos de tempo mais curtos (Brown 2002, Nunally 2005). A marcação por produtos radioactivos foi sendo eliminada, pois a revelação por raios-X demorava cerca de 24-36 horas a realizar para obter sequências de 500 bases, requeria licenciamento especial e maiores cuidados de manuseio de substâncias; foi, assim, substituída por fluoróforos que, por apresentarem cores diferentes para cada nucleótido, permitem que as reacções com os 4 ddNTPs sejam feitas em conjunto (Nunally 2005). Além disto, a substituição da electroforese em gel de poliacrilamida por electroforese capilar permitiram aplicar um sistema de leitura de sequências e de análise de dados por computador, resultando em obtenção de dados em tempo real.

Actualmente, a sequenciação é feita através de reacções em tudo semelhantes às de amplificação por PCR, com a diferença de incluir os ddNTPs marcados com fluoróforos para serem detectados. A sequenciação pode ser dividida em 4 fases: preparação do ADN, reacção de sequenciação, electroforese capilar e análise informática. A preparação de ADN é feita por extracção deste, seguida de replicação por vectores (plasmídeos, bacteriófago M13 ou fagomídeo) ou ainda por PCR para obter múltiplas cópias dos fragmentos que o constituem (Brown 2002). Na reacção de sequenciação há desnaturação da cadeia dupla, resultando em 2 cadeias simples; o *primer* liga-se ao *template* (só é usado um *primer*, ao contrário da reacção de PCR); a ADN polimerase sintetiza uma nova cadeia complementar ao *template* começando na extremidade 3' do *primer*; como só existe um *primer*, só uma das cadeias é copiada e, por isso, a taxa de replicação é linear e não exponencial. É nesta fase que surge outra diferença: na síntese da nova cadeia, a ADN polimerase usa os dNTPs que estão disponíveis, mas também os ddNTPs, incluindo-os ocasionalmente, provocando a terminação da síntese da nova cadeia. Os ddNTPs têm de estar em muito menor concentração que os dNTPs para não serem incluídos com tanta frequência, obtendo-se, assim, vários fragmentos com todos os tamanhos possíveis. Esta reacção de sequenciação pode ser realizada em ciclos de aquecimento e arrefecimento num termociclador, permitindo a obtenção de mais produtos sequenciados a partir de uma quantidade diminuta de *template*, sem necessidade de clonagem prévia (Brown 2002). Segue-se a electroforese capilar que permite a separação das moléculas obtidas por tamanhos. A mistura é aquecida por forma a desnaturar as cadeias para impedir a hibridização com o *template*; cada nova cadeia está marcada com uma das 4 cores conferidas por cada um dos ddNTPs. Estas cadeias são colocadas num tubo muito estreito (capilar) contendo um gel de poliacrilamida no seu interior, que possui um comprimento suficiente para que as cadeias sejam separadas por tamanho, diferindo em apenas 1 base. Segundo os princípios já descritos anteriormente, as moléculas mais pequenas migram mais rapidamente

que as maiores, eluindo em primeiro lugar. À medida que vão saindo, passam por um laser que provoca excitação do corante fluorescente ligado ao ddNTP, o que faz com que este emita fluorescência ou brilho num comprimento de onda ou cor específicos. Esta informação é processada sob a forma de electroferogramas, um traçado do sinal recebido por um fotodetector em cada um dos 4 comprimentos de onda emitidos pelos ddNTPs. Além disto, associa a cada cor a letra da base correspondente. Como a sequência de picos do electroferograma corresponde a segmentos de ADN com apenas 1 nucleótido de diferença entre si, a sequência de picos revela a sequência de bases na amostra de ADN inicial (Brown 2002).

Para realizar a sequenciação, é necessário que o produto de PCR ou de clonagem seja o único presente na amostra, sendo, por isso, necessário fazer uma purificação para eliminar restos de reagentes, sobretudo dNTPs, *primers* e enzimas que possam alterar os resultados. Os métodos de purificação existentes são purificação em colunas (baseados na separação de dNTPs e *primers* dos produtos de PCR que são maiores, por filtração) e em gel e precipitação PEG (precipitação em polietilenoglicol e $MgCl_2$) ou em etanol e digestão enzimática dos produtos interferentes.

As principais limitações desta técnica de sequenciação são a fraca qualidade das primeiras 15-40 bases e também a partir de 700-900 bases, a inclusão de partes da sequência do vector, se for este o método usado na clonagem do ADN, ou do intrão, se for um produto de PCR cujos *primers* foram desenhados na região intrónica e a limitação da sequenciação a moléculas relativamente pequenas (300-1000 bp) em cada reacção, pois, acima disso, o poder de resolução é insuficiente (Brown 2002). As técnicas de sequenciação continuam a evoluir na tentativa de diminuir a quantidade de amostra e de tempo necessários para gerar uma sequência e de melhorar a precisão, incluindo métodos com outros tipos de detecção de fluorescência, uso de espectrofotometria de massa e detecção de moléculas únicas (Nunally 2005).

Mutation scanning

As mutações são alterações do gene em relação ao seu estado natural que podem ser causadoras de ou predisponentes para doenças, de significado desconhecido ou variantes normais benignas (normalmente designadas por polimorfismos) (Pagon *et al.* 1993-2007). Existem mutações espontâneas ou induzidas por mutagénios (agentes químicos ou físicos) que podem ser classificadas de acordo com o seu efeito na estrutura da molécula de ADN, na função, na heritabilidade, no padrão de heritabilidade e na sequência proteica, e nas consequências para o organismo.

Como foi referido anteriormente, o método padrão para identificação de mutações em segmentos de ADN é a sequenciação, pois é aquele que fornece melhor resolução ao permitir analisar cada um dos nucleótidos da sequência. No entanto, a limitação no número de bases sequenciadas por este método leva a que, em genes de maiores dimensões, o custo da sua aplicação seja muito elevado. Assim, podem ser usadas como alternativa algumas técnicas de *mutation scanning*, um processo que consiste em analisar um segmento de ADN com o intuito de identificar regiões variáveis num gene. É necessário amplificar os segmentos de ADN em estudo para obter ADN/*amplicons* suficientes para proceder à análise. Os *amplicons* são comparados entre si por um dos métodos referidos a seguir, ficando em evidência quais os que apresentam variações. Como estes métodos não indicam especificamente os nucleótidos envolvidos, é necessário prosseguir a análise daquelas regiões, por sequenciação ou por análise de mutações, para confirmar a alteração específica na sequência. Pode ser analisado todo o gene ou só regiões específicas (e.g., exões, as regiões codificantes dos genes presentes no ARN mensageiro maduro após *splicing*) (Pagon *et al.* 1993-2007).

As técnicas de *mutation scanning* podem ser divididas em grupos, de acordo com os princípios aplicados. Algumas baseiam-se nas diferenças de mobilidade em electroforese de fragmentos com sequências de ADN *wild-type* e mutante: DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), HA (*Heteroduplex Analysis*) e CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*) (GBETH 2006). Outras técnicas têm por princípio a clivagem de bases não emparelhadas em heteroduplexes (CCM – *Chemical Cleavage Method* e EMC – *Enzyme Mismatch Cleavage*). E outras ainda que detectam alterações na proteína transcrita por um determinado fragmento de ADN (PTT – *Protein Truncation Test*) (GBETH 2006, Pagon *et al.* 1993-2007).

As mais utilizadas são a SSCP e a HA, mas recentemente tem sido utilizada também a técnica de DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) na análise de heteroduplexes. Nesta técnica, são comparados 2 ou mais cromossomas como uma mistura de *amplicons* de PCR desnaturados e re-hibridizados, revelando a presença de uma mutação pela retenção diferencial de homo e heteroduplexes da fase sólida da cromatografia em condições parcialmente desnaturantes (Xiao & Oefner 2001). Esta técnica tem a vantagem de possibilitar a automação de uma boa parte das suas reacções e a análise de um grande número de amostras, permitindo a detecção de mutações e descoberta de SNPs em grande escala (Yu *et al.* 2006). Além disso, como possibilita a análise simultânea de mutações conhecidas e desconhecidas, assumiu um papel preponderante na análise genética de diversas doenças (Frueh & Noyer-Weidner 2003).

Neste projecto, pretendeu-se fazer o isolamento e a sequenciação parciais do gene SCN5A com o intuito de pesquisar variações de sequência em alguns dos exões do gene (descritos em humanos como estando associados a CMD (Olson *et al.* 2005)) que pudessem estar implicados na CMD canina, através da aplicação de várias técnicas de biologia molecular, permitindo também a aquisição de conhecimentos nesta área. Posteriormente, dever-se-á aprofundar a análise para determinar se as variações de sequência observadas são responsáveis pelo fenótipo de CMD nos cães da raça da Serra da Estrela (SE) e, eventualmente, noutras raças caninas.

Material e Métodos

Escolha dos animais / Exame clínico

Foram incluídos no projecto cães da raça SE provenientes de criadores e proprietários particulares que tinham sido incluídos num estudo prospectivo onde se analisava a história natural da CMD na raça, e cães de raças diferentes (Boxer, Pastor Alemão e SRD) para servirem de controlo (Tabela 2, Anexos). Os animais foram submetidos a um exame físico geral e a um exame dirigido ao aparelho cardiovascular, tendo sido realizados exames electrocardiográfico, ecocardiográfico e medição da pressão arterial. Os cães foram classificados como normais ou como doentes (com CMD) de acordo com as directivas propostas por Dukes-McEwan *et al.* 2003 e com os valores de referência ecocardiográficos publicados para a espécie em questão (Lobo *et al.* 2008).

Recolha de amostras

Foram recolhidas previamente amostras de sangue dos animais usando tubos com ou sem anticoagulante, por forma a obter amostras de sangue total, soro e plasma. Todas as amostras foram devidamente identificadas, através de números, e conservadas a -18°C.

Escolha de amostras/ organização do estudo

Numa primeira fase, foram escolhidas amostras dos vários tipos de material biológico (sangue total, soro e plasma) para testar a viabilidade do trabalho com os 2 últimos tipos de amostra (que teriam quantidades diminutas de ADN) e animais com diversas classificações (SE doente, SE não doente, controlos) para observar a qualidade dos produtos de PCR e das sequências obtidas (Grupo 1). Numa segunda fase, foram feitas extracções de todos os animais classificados como doentes e dos controlos (excluindo o Boxer que é uma raça onde a CMD ocorre com elevada prevalência e que, por isso, poderia ter alguma alteração no gene) para servirem de controlo (Grupo 2). Foram escolhidas 4 amostras específicas (incluídas no grupo 1) que serviram de base ao estudo: três cães de raça SE (dois doentes partindo de uma amostra de sangue total num deles e de plasma no outro, e um não doente partindo de uma

amostra de sangue total) e um controlo (partindo de uma amostra de sangue total). A amplificação por PCR foi realizada primeiro para o Grupo 1 e para os exões 6, 9, 13, 17, 21 e 27; depois amplificaram-se só as 4 amostras principais para testar os *primers* 2, 14 e 20.

Extracção de ADN

Todas as amostras estudadas foram processadas para extracção de ADN com o Purelink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen™ seguindo as instruções do fabricante. Este kit consiste na extracção através de centrifugação repetida com colunas com fases sólidas adsorventes do ADN que possuem uma matriz de sílica à qual este se liga selectivamente (na presença de sais caotrópicos) durante os procedimentos de lavagem e da qual se separa na fase de eluição, resultando num produto apropriado para PCR, enzimas de restrição ou *Southern Blotting* (Invitrogen™ 2007). Escolheu-se um kit de extracção que, apesar de indicado apenas para sangue total, proporcionou bons resultados em ensaios preliminares em soro e plasma. Isto pôde ser comprovado, não imediatamente pelos géis de extracção, mas pelos primeiros produtos de amplificação por PCR. Mesmo não apresentando bandas visíveis na extracção e, por isso, usando-as puras, as amostras foram amplificadas com sucesso.

Foram seguidas as instruções do fabricante, realizando-se uma centrifugação adicional após a adição da 2ª solução tamponada de lavagem para eliminar todo o etanol presente, usando-se um volume de eluição de 50 µL e realizando-se uma 2ª eluição com o mesmo volume, tendo estes dois produtos finais sido armazenados em separado. Para os testes subsequentes, foi usado essencialmente o produto da primeira eluição, ficando o produto da segunda reservado para casos em que o primeiro fosse insuficiente. Todos os produtos de extracção foram armazenados a 4°C.

A presença de ADN foi testada através de electroforese num gel de 7x15 cm de 0,8% de agarose preparado com TAE 1X e com 1µL Gel Red™ por cada 50µL de gel como agente intercalante, usando uma corrente de 120 volt, durante cerca de 30 minutos, numa tina de electroforese de aproximadamente 30 cm de comprimento igualmente com TAE 1X. O número de poços foi ajustado ao número de amostras. O gel foi carregado com 5 µL de amostra e 3 µL de corante (azul de bromofenol). Utilizaram-se 2 µL de 100 bp DNA *ladder* (Solis BioDyne), um marcador com 12 fragmentos de ADN entre 100 bp e 3000 bp pronto a usar (já com o corante azul de bromofenol incorporado). Observou-se o gel sob luz UV num transiluminador Gel Doc XR+ da Bio-Rad Laboratories, obtendo-se imagens em formato digital. Fez-se a análise qualitativa das amostras de extracção com base na intensidade da banda obtida, procedendo-se à subsequente diluição dos produtos de acordo com essa análise. Produtos que não apresentassem bandas visíveis, foram amplificados não diluídos.

Amplificação por PCR

A sequência completa e os exões do gene em estudo foram consultados na base de dados GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; NCBI Reference Sequence: NC_006605.2). Foram desenhados *primers* para 9 dos 28 exões do gene em estudo (Figura 3, Anexos) sendo 4 aqueles nos quais tinham sido identificadas mutações em humanos (exões 6, 16, 17 e 21) (Olson *et al.* 2005), recorrendo ao software online Primer 3 Input, resultando em sequências de 18 a 23 bp (Tabela 2, Anexos) e fornecendo também a informação relativa ao tamanho dos produtos de PCR esperados. No caso do exão 21, as 4 primeiras sequências dos *primers* resultantes continham *hairpins*, pelo que teve de se optar pelo 5º oligonucleótido. O exão 16 foi excluído, apesar de ser um dos indicados em humanos (Olson *et al.* 2005), por ser de tamanho diminuto (8 bp). A produção dos *primers* foi feita pela Invitrogen™ e os produtos foram enviados na forma de liofilizados e conservados a uma temperatura de 4°C até hidratação. Após hidratação, foram conservados a -18°C em alíquotas.

A ADN polimerase ideal deve ter uma rápida taxa de incorporação de dNTPs, ausência de actividade exonuclease e não discriminar análogos nucleotídicos, sendo que a alta fiabilidade também é importante (Nunally 2005). Assim, a escolha recaiu sobre a Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen™ fornecida a 5 U/μL), uma vez que esta está associada a um anticorpo que bloqueia a actividade de polimerase à temperatura ambiente, sendo que é restaurada após o passo de desnaturação a 94°C, realizando um *hot start* que aumenta a especificidade, sensibilidade e quantidade de produto obtido. O uso deste anticorpo ajuda a reduzir os requisitos de optimização de PCR, o tempo e o esforço de preparação, manipulação de componentes da reacção e risco de contaminação.

As concentrações dos componentes das reacções de PCR iniciais foram as seguintes: 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen™ fornecida a 10mM), 0,5 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2 U/tubo de Platinum Taq e 0,4 μg/μL de BSA. Foi ainda usado tampão Taq a 1X. Cada tubo de PCR tinha, inicialmente, 9μL de *Master Mix* e 1μL de ADN, passando depois a ter 19μL e 1μL respectivamente. As condições de PCR foram desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridização a 48-54°C (dependendo da T_H dos *primers*) durante 30 segundos e uma extensão a 72°C durante 1 minuto terminando com uma extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos foram mantidos a 4°C após a reacção. Todas as reacções de PCR foram realizadas no termociclador T3 Thermocycler da Biometra GmbH. As T_H para cada *primer* foram obtidas usando o software online Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), tendo sido escolhida a temperatura indicada como *nearest neighbor*, para cada par de *primers* (*forward* e *reverse*). A temperatura usada nas reacções de PCR foi calculada subtraindo 5°C à

temperatura mais baixa do par de *primers*. Partindo destas condições iniciais e consoante os resultados obtidos, foram tentadas novas concentrações de $MgCl_2$ (2,5mM) e de T_H (aumentos ou diminuições de 2-3°C) para aqueles *primers* nos quais o primeiro protocolo não tivesse resultado (exões 9, 13, 17, 20, 21, 27). Numa primeira fase, para efeitos de controlo, usou-se água; numa fase seguinte, usou-se o controlo das extracções.

Começou por se fazer a amplificação para os exões indicados como tendo mutações em humanos (6, 17, 21 e 27) e também dos exões 9 e 13 para as amostras do grupo 1 e, numa 2ª fase, foram testados os restantes pares de *primers* (2, 14 e 20) para as 4 amostras principais até se optimizarem as condições de PCR. Os exões 9 e 20 foram descartados, pois não tiveram produtos de PCR satisfatórios (Figura 4, Anexos). Após a obtenção de bons produtos de PCR para todos os restantes *primers*, fez-se a amplificação de extractos de ADN do Grupo 2 das amostras (todos os animais classificados como doentes). Nesta fase, e para ultrapassar alguns resultados menos bons, tentaram-se várias alterações: para fazer face aos controlos positivos, fizeram-se novas soluções de trabalho dos pares de *primers*, novas dNTP *mixes*, usaram-se novos tubos de água e mudaram-se, ainda, as caixas de pontas de pipetas e de *eppendorfs* e microtubos; para obter produtos de PCR com bandas da intensidade desejada, fez-se o mesmo em relação aos *primers* e aos dNTPs, mas também se mudou o tubo de BSA e fez-se novas extracções das mesmas amostras, uma vez que as iniciais poderiam estar degradadas depois de vários meses a serem usadas.

A presença dos produtos de PCR foi testada através de electroforese num gel de 7x15 cm de 2% de agarose preparado com TAE 1X e com 1µL Gel Red™ por cada 50µL de gel como agente intercalante, usando uma corrente de 120 volt, durante cerca de 60 minutos, numa tina de electroforese de aproximadamente 30 cm de comprimento igualmente com TAE 1X. O gel foi carregado com 5 µL de produto de PCR e 3 µL de corante (azul de bromofenol). Utilizaram-se 2 µL do mesmo marcador descrito anteriormente para confirmar os tamanhos dos fragmentos dos produtos de PCR. Observou-se o gel sob luz UV num transiluminador Gel Doc XR+ da Bio-Rad Laboratories, obtendo-se imagens em formato digital. Produtos que apresentassem bandas pouco visíveis ou ausentes, foram repetidos adicionando 2µL de ADN em vez de 1.

Purificação/ Sequenciação de produtos amplificados

Após amplificação, os produtos de PCR foram purificados para retirar o excesso de dNTPs, *primers* e restantes reagentes. Foi usado o Jetquick PCR Product Purification Spin Kit/50 da Genomed GmbH de acordo com as indicações do fabricante, usando TE *Buffer* (fornecido com o Kit) aquecido a uma temperatura de 65°C para eluição e partindo dum volume de PCR de 15 µL. Após purificação, as amostras foram conservadas a 4°C durante o menor tempo possível e

depois enviadas para o laboratório StabVida para sequenciação. Foram igualmente enviados os *primers* respectivos a 10 pmol/μL. As amostras escolhidas foram as 4 principais. Numa primeira fase, foram unicamente pedidas as sequências *forward* dos exões 6, 13, 17, 21 e 27, apesar de, sozinhas, não serem válidas, de forma a verificar a qualidade das sequências e fazer um *screening* inicial dos exões. Após essa fase e mantendo as mesmas 4 amostras, foram pedidas as sequências *reverse* dos mesmos exões e as *forward* e *reverse* dos exões 2 e 14.

Análise de sequências/ electroferogramas

As sequências obtidas foram comparadas com a sequência de referência publicada na base de dados GenBank do NCBI (NCBI Reference Sequence: NC_006605.2). Os electroferogramas foram analisados recorrendo a diversas ferramentas informáticas. Para alinhar as sequências das várias amostras entre si e com a sequência referência, corrigi-las e localizar zonas de variabilidade, foi usado o programa BioEdit (Hall 1999). Para analisar as zonas dúbias dos electroferogramas e comparar entre as várias amostras, foram usados os *softwares* Codon Code Aligner e Finch TV. Para definir as zonas a traduzir e analisar as sequências de aminoácidos obtidas, foi usado o programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007), definindo o *gene domain* para cada exão.

Foi feita a análise do tipo de aminoácido presente em cada caso quanto às suas propriedades físico-químicas e quanto à sua estrutura.

Resultados

Extracção de ADN

Foram obtidas bandas de várias intensidades no gel resultante da electroforese das extracções, mas, em geral, obedecendo a um padrão: bandas mais fortes para amostras de sangue total e bandas mais fracas ou ausentes para amostras de soro e plasma. Apesar disso, todas as amostras resultaram em produtos de PCR com bandas visíveis. A Figura 5 dos Anexos corresponde ao gel da primeira fase das extracções; as fases seguintes apresentaram padrões semelhantes. Com base na intensidade das bandas, foram feitas diluições das amostras: 1:10 nas amostras 501 ST, 142 ST, 189 ST, 197 ST, 202 ST e 209 ST; 1:20 na amostra 502 ST; 1:2 na amostra 089 P; e as restantes foram usadas não diluídas.

Amplificação por PCR

Após amplificação por PCR, foram feitos géis de agarose a 2% para confirmar a presença dos produtos, usando o marcador referido para confirmar os tamanhos dos produtos esperados (dados pelos *software* online Primer 3 Input). O objectivo foi obter um gel com todas as amostras amplificadas, sem produtos inespecíficos e com controlos negativos (exemplo da

Figura 6-C, Anexos). Nem todos os géis cumpriram estes requisitos e, como referido anteriormente, foi necessário ajustar as condições de PCR, nomeadamente em termos de concentração de $MgCl_2$ e da T_H , tendo o aumento da concentração de $MgCl_2$ mostrado os melhores resultados (Figura 6, Anexos). Em alguns casos, o aumento da concentração de $MgCl_2$ levou ao aparecimento de produtos inespecíficos; para os eliminar, associou-se ao aumento de $MgCl_2$ o aumento da T_H .

Para a primeira fase de amostras (Grupo 1), conseguiu-se com sucesso obter produtos de PCR para todos os exões, com excepção do 9, que, mesmo com os ajustes de condições referidos, nunca produziu nenhuma banda visível, tendo sido, por isso, descartado. Na segunda fase de amostras e apesar de os pares de *primers* terem funcionado bem na primeira, os resultados foram inconstantes, tendo sido necessário tentar todas as hipóteses referidas anteriormente. Apesar destes problemas, conseguiu-se amplificar, para as 4 amostras principais, 7 dos 9 exões testados (foram eliminados o 9 e o 20, que apesar de apresentar bandas visíveis, tinha produtos inespecíficos que não se conseguiram eliminar (Figura 4, Anexos).

Até ao final do período de estágio, não foram concluídos todos os PCRs para o Grupo 2 de amostras, pelo que os resultados das sequenciações se cingem unicamente às 4 amostras principais.

Electroferogramas

Os electroferogramas obtidos na primeira fase (só *forward*) apresentavam boa qualidade (Figura 7, Anexos) e, das 20 reacções sequenciadas, só 1 não resultou numa boa sequência e outra resultou numa sequência parcial. O resumo das mutações observadas encontra-se descrito na Tabela 3 dos Anexos. Para os exões 17, 21 e 27 não foram detectadas zonas de variabilidade. No exão 6, foram observadas 2 variações de sequência: uma dos 4 animais em relação à sequência de referência (NC_006605.2:g. 21278T>C) que resulta numa mudança de aminoácido Leucina (L) → Serina (S) (NC_006605.2:p.Leu7093Ser), e uma (NC_006605.2:g.21323C>T) em que os animais SE doentes eram heterozigóticos (Y = Citosina (C) ou Timina (T)) e o SE não doente era homozigótico (TT), resultando numa mudança de aminoácido S → Fenilalanina (F) (NC_006605.2:p.Ser7108Phe) (Figura 8, Anexos). No exão 13, foi detectada uma zona de variabilidade (NC_006605.2:g.33686C>T) em que um dos SE doentes era heterozigótico (Y = C ou T) e o SE não doente era homozigótico (TT) resultando numa alteração de aminoácido S → L (NC_006605.2:p.Ser11229Leu).

A segunda fase de sequenciação apresentou novamente sequências de boa qualidade com a excepção das do exão 2 e de uma amostra na sequenciação *reverse* do exão 17. Estas

sequências confirmaram a variabilidade observada nos exões 6 e 13 e não demonstraram nenhuma variação de sequência no exão 14.

Discussão

Este projecto de investigação tinha como objectivo delinear um protocolo de pesquisa de mutações que pudessem estar associadas à CMD canina. Utilizou-se o método do gene candidato, partindo de vários estudos de medicina humana que o identificaram como causador de um fenótipo de CMD secundário a arritmias e distúrbios de condução (CMD1E) (Greenlee *et al.* 1986, Olson & Keating 1996, McNair *et al.* 2004, Olson *et al.* 2005, Ge *et al.* 2010, Bezzina *et al.* 2003, Chen *et al.* 2002) ou mesmo de CMD como patologia primária (Hesse *et al.* 2007). Pretendeu-se criar uma técnica para o estudo do referido gene, adequando os procedimentos laboratoriais ao projecto em questão e fazer um *screening* inicial dos exões. Um estudo conclusivo implicaria um período de tempo superior, um maior investimento e meios técnicos de um nível mais elevado.

Existe alguma variabilidade na apresentação clínica da CMD em cães, mas, por norma, é detectado um ritmo de galope protodiastólico (S_3), de baixa frequência à auscultação cardíaca, sons broncovesiculares, estertores e crepitações à auscultação pulmonar devidas a IC esquerda e edema pulmonar e pulso fraco, rápido, irregular e assíncrono quando existe arritmia associada. É importante identificar a presença ou não de arritmia e o tipo através do exame electrocardiográfico. As diferentes raças podem ter resultados diferentes, podendo alguns ser normais, enquanto outros podem ter sinais de dilatação das câmaras cardíacas. As arritmias mais frequentes são a FA (raças gigantes e onde podemos incluir o cão SE) e VPCs (e.g., em Dobermans e Boxers). O monitor ambulatorio (*Holter*) também pode ser útil para fazer uma detecção precoce da doença (na fase pré-clínica), evidenciando presença de arritmias, a sua frequência e complexidade (Lobo & Pereira 2002). No exame radiográfico pode-se fazer a avaliação do tamanho das câmaras cardíacas e observar a presença de edema pulmonar ou derrame pleural, sendo comum a presença de cardiomegália generalizada (mais ou menos marcada) ou dilatação do átrio esquerdo. Normalmente, o diagnóstico definitivo é feito pelo exame ecocardiográfico, pela presença de ambos os seguintes critérios: dilatação ventricular esquerda, observada mais comumente por ecocardiografia em modo M ou bidimensional (2-D), e disfunção sistólica por diminuição da força de contracção do miocárdio. Para este último, as medidas mais usadas são a fracção de ejeção do ventrículo esquerdo em 2-D, a fracção de encurtamento e a velocidade média de encurtamento circunferencial, todas elas diminuídas na CMD. O Doppler pode ajudar a determinar a função cardíaca (Hershberger *et al.* 2007, Lobo &

Pereira 2002). Um diagnóstico clínico assertivo é essencial em estudos genéticos, pois é muito importante a distinção entre animais doentes e não doentes.

O desenvolvimento de um teste genético para a CMD humana actualmente é complicado pela heterogeneidade de *locus* e alélica e pela evidência de que uma proporção significativa dos casos não é atribuível a nenhum dos genes conhecidos. Ainda assim, esta patologia tem sido extensivamente estudada, adoptando-se abordagens a mecanismos diferentes que expliquem a CMD, tendo-se conseguido identificar alterações em 25 *locus* (Tabela 1, Anexos) que incluem proteínas estruturais do sarcómero (que transmitem força contráctil) e proteínas associadas à homeostase do cálcio. Recentemente, tem-se feito associação da CMD com mutações em genes de canais iónicos (ABCC9 (canal de potássio) e SCN5A (subunidade α do principal canal de sódio cardíaco)). O gene SCN5A já foi identificado em problemas de condução e outros fenótipos electrofisiológicos, como síndrome de QT longo (por mutações que causam ganho de função) e de Brugada (perda de função), mas a implicação na CMD não é pacífica, pois esta pode ser secundária a arritmias atriais prolongadas ou induzida por taquicardia. As diferenças da média de idades dos vários estudos, assim como dos resultados observados, indicam um efeito intrínseco aos miócitos provocado pelas mutações no gene SCN5A que causa perda de contractilidade e alterações cardiomiopáticas que, por sua vez, levam a dilatação. No entanto, um estudo realizado em ratos, identificou a CMD como patologia primária numa mutação no gene SCN5A resultante na expressão reduzida da subunidade α do canal de sódio, mas com uma ligação temporal entre a redução das correntes de sódio e a CMD progressiva, isto é, quanto maior a redução na corrente, mais rápida a instalação da CMD (Hesse *et al.* 2007). Uma explicação avançada por Olson *et al.* 2005 para a influência de mutações no canal de sódio na CMD foi que: (i) a entrada diminuída de sódio nos miócitos leva a actividade aumentada compensatória dos trocadores de sódio e cálcio e de sódio e hidrogénio e consequente diminuição do cálcio intracelular e do pH, tornando deficitárias a produção de força de contracção miocelular mediada por cálcio e de energia pelas mitocôndrias; (ii) os agonistas dos canais de sódio aumentam a contractilidade miocárdica, enquanto os bloqueadores a diminuem; (iii) mutações no gene homólogo dos canais de sódio esqueléticos (SCN4A) causa uma doença caracterizada por fraqueza muscular e miopatia degenerativa progressiva análogas à doença muscular cardíaca observada na CMD; e (iv) foram relatados 2 casos isolados de cardiomiopatia em famílias pequenas com distúrbios do ritmo que tinham mutações do SCN5A heterozigóticas ou heterozigóticas compostas.

A elevada prevalência da CMD canina e as características distintivas que exhibe dentro de algumas raças ou famílias de determinada raça levam à suspeita de uma origem genética. Já foram feitos vários estudos, inclusivamente alguns deles análogos a testes em humanos, mas

sem sucesso (Lobo & Pereira 2002). A abordagem tende a ser focada em proteínas estruturais do citosqueleto e, até agora, não se conseguiu, ainda, fazer uma associação positiva desta doença com algum gene ou *locus*. Parece, por isso, útil tentar abordagens diferentes, seguindo os passos da investigação em humanos, até pela percentagem de similaridade existente entre as 2 espécies, que, no caso específico do gene SCN5A, é de 94,6% (Figura 9, Anexos) (Unigene NCBI).

No que toca à execução do projecto, há várias considerações que podem ser feitas. A selecção dos cães da raça SE prendeu-se com o facto de estar a ser conduzido um projecto de doutoramento sobre a CMD nestes animais (Lobo *et al.* 2007, Lobo *et al.* 2010), tendo sido estendida a análise à genética. Desta forma, os dados e as amostras utilizados por nós foram recolhidos nesses estudos. É uma raça grande que tem tido grande expansão nos últimos anos, levando à identificação e descrição da CMD nestes animais.

A escolha de um modo de pesquisa baseado na amplificação de alguns dos exões de um gene candidato e subsequente sequenciação dos produtos de PCR deveu-se ao conhecimento das regiões a amplificar por transposição das zonas identificadas em seres humanos, não havendo necessidade de recorrer nenhum processo de *mutation* scanning entre os 2. Os exões escolhidos para serem testados foram os descritos num artigo de medicina humana – 6, 17, 21 e 27 - (Olson *et al.* 2005), tendo sido excluído o 16 por ser demasiado pequeno (8 pb). Foram acrescentados a estes os exões 2, 9, 13, 14 e 20 e não outros, pois tinham um tamanho apropriado para o desenho de *primers* e amplificação, isto é, não eram muito pequenos nem demasiado grandes (119 – 570 pb).

O tipo de amostras utilizado foi definido pela impossibilidade destes animais estarem presentes na altura do estudo, uma vez que, dos animais com CMD, só 1 estava ainda vivo. Assim, as amostras foram recolhidas previamente no decurso de outros projectos (Lobo *et al.* 2007, Lobo *et al.* 2010) ao longo de 5 anos, foram processadas e armazenadas. Teoricamente, as amostras usadas para extracção de ADN teriam de ser de sangue total, pois o ADN encontra-se nas células e estas não entram na constituição do soro nem do plasma. No entanto, os processos utilizados para separação do soro e do plasma têm uma componente manual que, apesar de eficaz para os propósitos habituais, permite que algumas células nucleadas (leucócitos) permaneçam neste tipo de amostras. Começou-se por utilizar um pequeno grupo de animais com várias classificações em relação à doença e com os vários tipos de amostra precisamente para testar a viabilidade da utilização destes materiais biológicos. As amostras de plasma obtiveram resultados mais convincentes do que as de soro e, por isso, após a primeira fase de amplificações, estas foram abandonadas.

A escolha de poucos animais numa fase inicial prendeu-se com o facto de haver uma necessidade de testar a viabilidade do estudo. Ele foi todo concebido por transposição directa dos dados de medicina humana e, como tal, não se sabia até que ponto as técnicas iriam resultar. Não se achou, por isso, conveniente analisar logo uma grande quantidade de amostras. Este foi também o motivo da testagem dos *primers* em duas fases, começando por aqueles que tinham sido indicados em estudos de medicina humana (Olson *et al.* 2005). Por estes motivos, nesta fase os animais foram escolhidos independentemente de terem ou não a doença; só após optimização das condições de isolamento dos exões pretendidos se analisaram unicamente animais doentes. No entanto, esta segunda fase não foi concluída antes do final do período de estágio.

Ainda sobre o kit de extracção, a escolha de um kit baseado em colunas com fases sólidas adsorventes do ADN trouxe grandes vantagens em termos de qualidade do ADN extraído e também da rapidez do método. Foi realizada uma centrifugação adicional após adição das soluções tamponadas de lavagem para ser retirado todo o etanol, uma vez que poderia interferir com estudos subsequentes. Foi também efectuada uma segunda eluição para aumentar o rendimento de uma mesma amostra e para que existisse uma fonte de ADN adicional e mais puro, caso os produtos das primeiras extracções se deteriorassem, o que se veio a verificar. Na segunda fase de amplificações por PCR, após mudança de todos os reagentes, os resultados foram manifestamente insatisfatórios, pensando-se que o problema estaria precisamente nas amostras das extracções. Como estas foram usadas muitas vezes e, de cada vez, retiradas do frigorífico por períodos de tempo de cerca de 30-60 minutos, provavelmente perderam qualidade e tiveram de ser substituídas por novas extracções, uma vez que os produtos da 2ª eluição também não obtiveram resultados satisfatórios; mesmo quando usado puros, resultaram em bandas relativamente ténues, apesar de não ser claro se foi este o factor determinante ou se outros reagentes tiveram influência. Teria sido vantajoso fazer alíquotas dos produtos de extracção para não serem sujeitos a tantas variações de temperatura.

Em todos os processos de confirmação de obtenção de fragmentos de ADN, quer fossem de extracção ou de amplificação por PCR, foi usado gel de agarose na concentração adequada e utilizado Gel RedTM como agente intercalante. A concentração do gel foi ajustada aos produtos em questão (0,8% para extracções e 2% para produtos de PCR). Muitas vezes, os géis foram reutilizados, isto é, re-dissolvidos por aquecimento, adicionando-se sempre o agente intercalante, apesar da indicação de resistência a temperaturas altas. Os resultados foram bons, não se tendo observado nenhum problema com esta técnica, com excepção da diminuição de volume aquando de re-dissoluções subsequentes (uma parte do gel ficava

aderida aos *erlenmeyers*), o que foi perfeitamente ultrapassado usando mais quantidade de gel previamente utilizado. O único efeito observado foi o aparecimento de pequenos detritos na visualização sob UV (visíveis nas Figuras 4 e 6, Anexos), mas que não prejudicou em nada os resultados. A escolha do agente intercalante, em detrimento do Brometo de Etídio deve-se sobretudo à simplicidade da sua utilização, à maior segurança e também à disponibilidade no laboratório.

O tamanho dos *primers* e a sua sequência são muito importantes para o sucesso de uma amplificação e ambos fazem variar a T_H , um factor crucial na execução de PCR. Deve-se procurar desenhar *primers* com sequências complexas o suficiente para que não hibridizem com outras zonas do template que não as pretendidas. Neste aspecto, também a T_H tem um papel importante, uma vez que, se for muito baixa (mais de 5°C abaixo da temperatura do par de *primers* mais baixa), pode haver hibridização não específica. Pelo contrário, se for muito alta, vai-se formar muito pouco produto, pois a probabilidade de hibridização do *primer* diminui. Aconselha-se a utilização de *primers* de 17-28 bp para amplificação de ADN genómico. Deve-se evitar criar *primers* com sequências complementares nas extremidades 3' para evitar a formação de *primer dimers* e não devem ser complementares a eles próprios para evitar a formação de *hairpins* (Rybicki *et al.* 2001). Para o desenho dos *primers* recorrendo ao software Primer 3 Input, usou-se a sequência de referência (NCBI Reference Sequence: NC_006605.2), procurando incluir uma porção relativamente extensa da região intrónica. Isto foi feito para evitar perda de informação relativa aos limites do exão, uma vez que as sequências tendem a apresentar as zonas inicial e final com pouca qualidade, e também para permitir a obtenção de vários *primers*, caso os primeiros tivessem problemas (por ex. *hairpins*) (Figura 10, Anexos). Assim, estariam presentes as regiões exónicas e de transição intrão-exão nas quais é mais comum ocorrerem mutações (Pagon *et al.* 1993-2007). No entanto, os produtos da sequenciação *forward* e da *reverse* apresentaram tamanhos diferentes, pelo que, essa análise ficou limitada em alguns casos. Cada par de *primers* tem uma T_H óptima dependente da constituição dos mesmos, sobretudo no que diz respeito à percentagem de G-C. Quanto ao protocolo utilizado, há autores que defendem que a desnaturação inicial e a extensão final são opcionais e que a sua ausência não afecta o produto final (Yale University 1997). No entanto, também não lhes apontam nenhum efeito deletério, pelo que, por norma, muitos investigadores as usam, tendo acontecido o mesmo com o este estudo.

A escolha da ADN polimerase revelou-se acertada, pois os produtos de PCR obtidos foram bons, como se pôde comprovar pela qualidade das sequências.

O $MgCl_2$ é um elemento importante na constituição da *Master Mix* para o PCR, pois este afecta a hibridização dos *primers* e a temperatura correspondente, a especificidade dos produtos e a

actividade da enzima. A sua concentração deve ser ajustada de forma a que, mesmo com o efeito quelante dos restantes produtos sobre este catião, a concentração se mantenha suficiente para a actividade da Taq polimerase; assim, deve-se procurar ter uma concentração de $MgCl_2$ 0,5-2,5mM superior à de dNTPs (Rybicki 2001), o que foi cumprido neste estudo. Pudemos também comprovar a influência que este elemento tem na formação de produtos inespecíficos, mas também na amplificação de produtos que de outra forma não tinha sido conseguida.

As sequências obtidas foram, regra geral, duma qualidade muito superior à que se esperava e puderam ser identificadas 3 variações de sequência, duas num dos exões referidos em humanos (exão 6) (Olson *et al.* 2005) e uma num exão adicional (exão 13). No entanto, o que seria de esperar era um genótipo diferente só para os animais doentes e tal não se verificou. À variação de sequência NC_006605.2:g. 21278T>C do exão 6 não foi dada muita relevância, porque se trata duma diferença de todos os animais testados em relação à sequência de referência (NC_006605.2). No caso da variação de sequência NC_006605.2:g.21323C>T do exão 6, o facto de os doentes serem heterozigóticos constituiria uma evidência interessante (nos casos reportados em humanos, o padrão é igual), não fosse o facto de o animal não doente ser homozigótico para a variação. Poder-se-ia pensar que um genótipo homozigótico mutante tivesse um fenótipo mais grave (e.g., morte súbita, um acontecimento relativamente frequente em casos de CMD), mas aqui acontece o oposto. Na variação de sequência do exão 13 (NC_006605.2:g. 33686C>T), o padrão é semelhante ao caso anterior, com a excepção de um dos animais doentes não ter variabilidade. Estas variações de sequência resultaram em alterações dos aminoácidos da sequência polipeptídica, sendo que, no exão 6, o resultado foram 2 mudanças de aminoácidos, uma de L para S (NC_006605.2:p.Leu7093Ser) e outra de S para F (NC_006605.2: p.Ser7108Phe), e, no exão 13, a alteração foi de S para L (NC_006605.2:p.Ser11229Leu). Tratando-se de um canal iónico, a alteração do aminoácido na cadeia proteica pode levar a alterações na capacidade funcional daquele, isto é, a cadeia lateral do aminoácido pode influenciar o fluxo de iões através do canal (Figura 11, Anexos). A fenilalanina e a leucina são aminoácidos apolares, enquanto a serina é polar. Além disto, a leucina e a fenilalanina são moléculas hidrofóbicas, sendo esta última também aromática, enquanto a serina é electricamente neutra. Não foi possível determinar neste projecto a localização das variações de sequência no canal de sódio, pelo que não sabemos que tipo de influência poderão ter na sua estrutura.

Com os dados disponíveis até ao momento, não é possível tirar conclusões definitivas sobre a influência do gene em causa (SCN5A) na CMD. Seria necessária uma análise mais aprofundada com mais amostras sequenciadas de animais doentes, não doentes e controlos,

com separação com base no exame electrocardiográfico e também com testes fisiológicos que pudessem demonstrar a associação genótipo-fenótipo. Pensamos, por isso, que este trabalho constitui uma base importante para estudos subsequentes sobre este gene. Apesar de, em cães, não se fazerem abordagens a problemas de condução e de canais iónicos, mas unicamente a alterações do citosqueleto e das proteínas contrateis, pensamos que aqui pode estar alguma evidência de que há associação daquelas com a CMD nesta espécie.

Bibliografia

- Aguirre-Hernández J., Sargan D. R. (2005) "Evaluation of Candidate Genes in the Absence of Positional Information: A Poor Bet on a Blind Dog!" *in Journal of Heredity*, 96(5):475–484
- Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM. (2003) "Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system" *in Circulation Research*, 92(2):159-68
- Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coirlain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE, Terzic A. (2004) "ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating" *in Nature Genetics*, 36(4):382-7
- Borgarelli M, Tarducci A, Tidholm A, Häggström J, (2001) "Review: Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part II: Pathophysiology and therapy" *in The Veterinary Journal* 162:182-195
- Brown TA (2002) "Genomes" 2nd edition, Wiley-Liss, Part 2 Chapters 4 and 6, Chapter 2 Box 2.1
- Chen S, Chung MK, Martin D, Rozich R, Tchou PJ, Wang Q (2002) "SNP S1103Y in the cardiac sodium channel gene SCN5A is associated with cardiac arrhythmias and sudden death in a white family" *in Journal of Medical Genetics*, 39(12):913-5
- Distl, O, Vollmar, AC, Broschk, C, Hamann, H, Fox PR, (2007) "Complex segregation analysis of dilated cardiomyopathy (DCM) in Irish wolfhounds" *in Heredity* 99:460–465
- Dukes-McEwan, J, Borgarelli, M, Tidholm, A, Vollmar, AC, Häggström, J (2003) "Proposed Guidelines for the Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy - The ESVC Taskforce for Canine Dilated Cardiomyopathy" *in Journal of Veterinary Cardiology*, 5(2), November 2003

- Frueh FW, Noyer-Weidner M (2003) "The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics" *in* **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 41(4):452-61
- GBETH - Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários (2006) "DHPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance Denaturante" *in* **GBETH Newsletter**, Volume 04 Número 16
- Ge J, Sun A, Paajanen V, Wang S, Su C, Yang Z, Li Y, Wang S, Jia J, Wang K, Zou Y, Gao L, Wang K, Fan Z.(2008) "Molecular and clinical characterization of a novel SCN5A mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy" *in* **Circulation, Arrhythmia and Electrophysiology**, 1(2):83-92
- Greenlee, PR, Anderson, JL, Lutz, JR, Lindsay, AE, Hagan, AD (1986) "Familial automaticity-conduction disorder with associated cardiomyopathy" *in* **The Western Journal of Medicine**, 144(1):33-41.
- Hall TA, (1999) "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" *in* **Nucleic Acids Symposium**, Series 41:95-98
- Hershberger, RE, Kushner, JD, Parks, SB (Initial Posting: July 27, 2007; Last Revision: March 19, 2009) "Dilated Cardiomyopathy Overview" *in* Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. **GeneReviews** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2007 Jul 27
- Hesse M, Kondo CS, Clark RB, Su L, Allen FL, Geary-Joo CT, Kunnathu S, Severson DL, Nygren A, Giles WR, Cross JC (2007) "Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel Scn5a" *in* **Cardiovascular Research**, 75(3):498-509
- Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P, van der Lip K, Sreeram N, van der Wal A, Mannens M, Wilde A (1999) "Homozygous premature truncation of the HERG protein : the human HERG knockout" *in* **Circulation**, 100(12):1264-7
- Kass S, MacRae C, Graber HL, Sparks EA, McNamara D, Boudoulas H, Basson CT, Baker PB 3rd, Cody RJ, Fishman MC, *et al.* (1994) "A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1" *in* **Nature Genetics**, 7(4):546-51.

- Lobo L, Canada N, Bussadori C, Gomes JL, Carnevalheira J (2008) "Transthoracic echocardiography in Estrela Mountain dogs: Reference values for the breed" in **The Veterinary Journal** 177:250–259
- Lobo L, Carnevalheira J, Canada N, Bussadori C, Gomes JL, Faustino AMR (2010) "Histologic Characterization of Dilated Cardiomyopathy in Estrela Mountain Dogs" in **Veterinary Pathology** 47(4):637-642
- Lobo, LL, Pereira, R. (2002) "Cardiomiopatia dilatada canina" in **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 97(144):153-159
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L (2004) " SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia" in **Circulation**, 110(15):2163-7
- Metallinos DL (2001) "Canine molecular genetic testing" in **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 31(2):421-31
- Meurs, KM, (2010) "Genetics of Cardiac Disease in the Small Animal Patient" in **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 40:701–715
- Meurs KM, Magnon AL, Spier AW, Miller MW, Lehmkuhl LB, Towbin JA (2001) "Evaluation of the cardiac actin gene in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy" in **American Journal of Veterinary Research**, 62:33-36
- Nunally, BK (2005) "Analytical Techniques in ADN Sequencing", Taylor & Francis Group, Chapter 1
- Ogino S, Gulley ML, den Dunnen JT, Wilson RB; Association for Molecular Pathology Training and Education Committtee (2007) "Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges" in **The Journal of Molecular Diagnosis**, 9(1):1-6.
- Olson TM, Keating MT (1996) "Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25" in **The Journal of Clinical Investigation**, 97(2):528-32.
- Olson,TM, Michels, VV, Ballew, JD, Reyna, SP, Karst, ML, Herron, KJ, Horton, SC, Rodeheffer, RJ, Anderson, JL (2005) "Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation" in *Journal of American Medical Association*, Vol. 293(4):491-3
- Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, (1993-2007) "Illustrated Glossary" in **GeneReviews** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington

- Rybicki E (2001) "PCR Primer Design and Reaction Optimisation" in Coyne VE, James MD, Reid SJ, Rybicki EP **"Molecular Biology Techniques"**, Third Edition
- Spier AW, Meurs KM, Coover DD, Lehmkuhl LB, O'Grady MR, Freeman LM, Burghes AH, Towbin JA (2001) "Use of western immunoblot for evaluation of myocardial dystrophin, alpha-sarcoglycan, and beta-dystroglycan in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy" in **American Journal of Veterinary Research**, 62:67-71
- Stabej P, Imholz S, Versteeg S.A, Zijlstra C, Stokhof AA, Domanjko-Petric A, Leegwater PAJ, Van Oost BA (2004) "Characterization of the canine desmin (DES) gene and evaluation as a candidate gene for dilated cardiomyopathy in the Doberman" in **Gene** 340:241–249
- Stabej P, Leegwater PA, Imholz S *et al.* (2004) "The giant myofilament protein Titin is associated with dilated cardiomyopathy in the Doberman" in **Proceedings of the 2nd International Conference on Advances in Canine and Feline Genomics Utrecht**
- Strachan, T, Read, AP (1999) **"Human Molecular Genetics"** 2nd edition, Wiley-Liss, Chapters 6, 15 and 21
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0" in **Molecular Biology and Evolution**, 24:1596-1599
- Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel E, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moss AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, Mestroni L (2003) "Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations" in **Journal of the American College of Cardiology**, 41(5):771-80
- Tidholm, A, Häggström, J, Borgarelli, M, Tarducci, A, (2001) "Review: Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology" in **The Veterinary Journal** 162:92-107
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2001) "Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)" in **Human Molecular Genetics**, 10(3):189-94.

- Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Arts T, Schreuder JJ, Vanagt WY, Cleutjens JP, Reneman RS (1998) "Asynchronous electrical activation induces asymmetrical hypertrophy of the left ventricular wall" in **Circulation**, 11;98(6):588-95.
- Wiersma, AC, Leegwater, PAJ, Van Oost, BA., Ollier, WE, Dukes-McEwan, J (2007) "Canine candidate genes for dilated cardiomyopathy: annotation of and polymorphic markers for 14 genes" in **BMC Veterinary Research**, 3:28
- Wolf CM, Wang L, Alcalai R, Pizard A, Burgon PG, Ahmad F, Sherwood M, Branco DM, Wakimoto H, Fishman GI, See V, Stewart CL, Conner DA, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG (2008) "Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease" in **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 44(2):293-303
- Xiao W, Oefner PJ. (2001) "Denaturing high-performance liquid chromatography: A review" in **Human Mutation**, 17(6):439-74
- Yu B, Sawyer NA, Chiu C, Oefner PJ, Underhill PA (2006) "ADN mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)" in **Current Protocols in Human Genetics**, Chapter 7:Unit7.10.
- Invitrogen™ (2007) "PureLink™ Genome ADN Kits: User Manual", pp. 1-15
- Yale University (1997) "PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting": <http://medicine.yale.edu/labs/henegariu/tavi/PCR.html> - consultado a 01/04/2011

Anexos

Gene	Nome da proteína	Distúrbios alélicos*
Autossômica dominante		
ACTC1	Actina, α músculo cardíaco 1	FHC (cardiomiopatia hipertrófica familiar)
DES	Desmina A	Desminopatia, miopatia fibrilar
LMNA	<i>Lamin-A/C</i>	Lipodistrofia parcial, CMT2B1, distrofia muscular Emery-Dreifuss, Síndrome <i>progeria Hutchinson-Gilford syndrome</i> , LGMD1B
SGCD	Delta-sarcoglicano	δ -sarcoglicanopatia Delta (LGMD2F)
MYH7	Miosina-7	Miopatia distal de Laing, FHC
TNNT2	Troponina T, músculo cardíaco	FHC
TPM1	Tropomiosina cadeia α -1	FHC
TTN	Titina	Miopatia distal de Udd
VCL	Vinculina	
MYBPC3	Proteína C <i>miosin-binding</i> , tipo cardíaco	FHC
PLN	Fosfolamban cardíaca	
LDB3	<i>LIM domain-binding protein 3</i>	
ACTN2	α -actinina-2	
CSRP3	Proteína 3 rica em cisteína e glicina	
MYH6	Miosina-6	FHC
ABCC9	<i>ATP-binding cassette transporter</i> sub-família C membro 9	
TNNC1	Troponina C, músculos esqueléticos e cardíacos lentos	
TCAP	Teletonina	LGMD2G
SCN5A	Proteína do canal de sódio tipo 5 subunidade α	Síndrome QT Longo tipo 3, Síndrome de Brugada, Fibrilhação ventricular idiopática, Síndrome do seio enfermo, doença do sistema de condução cardíaco
EYA4	<i>Eyes absent homolog 4</i>	
TMPO	Thymopoietin	
PSEN1	Presenilina-1	Alzheimer precoce
PSEN2	Presenilina-2	Alzheimer precoce e tardio
FCMD	Fukutina	Distrofia muscular congénita de Fukuyama
Ligada ao cromossoma X		
DMD	Distrofina	Distrofinopatias (distrofias musculares de Duchenne e de Becker)
TAZ	Tafazina	<i>Barth syndrome</i> , fibroelastose endocárdica tipo 2, <i>non-compaction</i> isolada do miocárdio ventricular esquerdo
Autossômica recessiva		
TNNI3	Troponina I, músculo cardíaco	CHF e cardiomiopatia restritiva

Tabela 1: Genética Molecular de CMD Familiar (adaptado de Hershberger *et al.* 2007); * outros fenótipos causados por mutações no mesmo gene

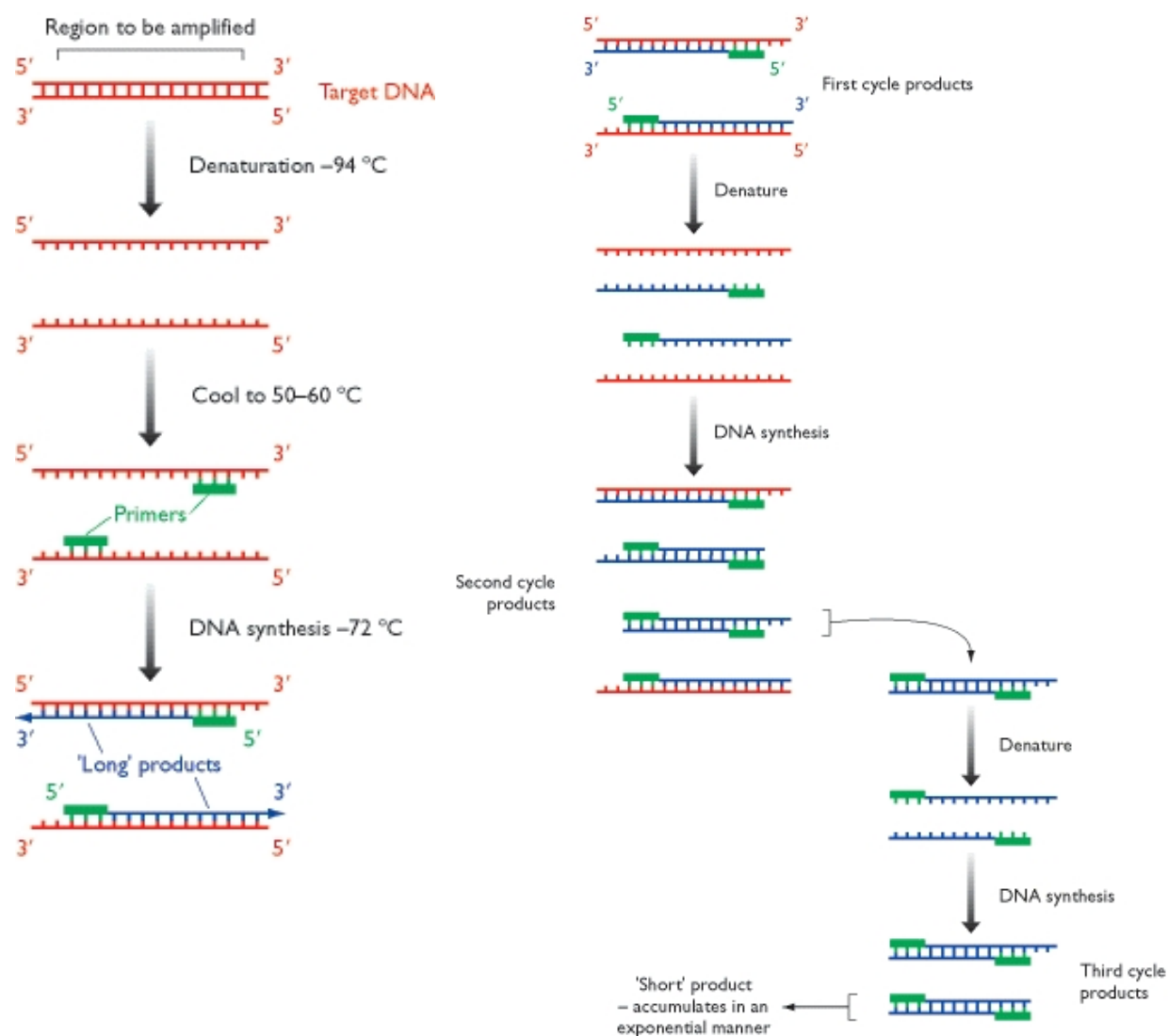


Figura 1: Primeira (esquerda) e 2ª fases da reacção de PCR (adaptado de Brown 2002)

Amostra	Código	Eco	Amostra	Código	Eco	Amostra	Código	Eco
1	089 S	CMD-A	13	221 ST	CMD	25	178P	CMD-S
2	089 P	CMD-A	14	011P	CMD-S	26	192ST	CMD-S
3	007 S	N	15	034P	CMD-S	27	196ST	CMD-S
4	007 P	N	16	038P	CMD-S	28	199ST	CMD-S
5	004 ST	N	17	044P	CMD-S	29	200ST	CMD-S
6	142 ST	N	18	062P	CMD-S	30	501 ST	Controlo
7	189 ST	N	19	070P	CMD-S	31	502 ST	Controlo
8	197 ST	N	20	078P	CMD-S	32	503ST	Controlo
9	202 ST	N	21	082ST	CMD-S	33	504ST	Controlo
10	209 ST	N	22	085P	CMD-S	34	505ST	Controlo
11	210 ST	CMD-A	23	110P	CMD-S	35	506ST	Controlo
12	052 ST	CMD-A	24	146P	CMD-S	36	507ST	Controlo

Tabela 2: Amostras usadas no estudo. Legenda: CMD-A – CMD assintomática; CMD-S – CMD sintomática; Eco – Classificação com base no exame ecocardiográfico; N – Normal; S – soro; P – Plasma; ST – sangue total

FLUORESCENT MARKERS IMPROVE SEQUENCING EFFICIENCY.

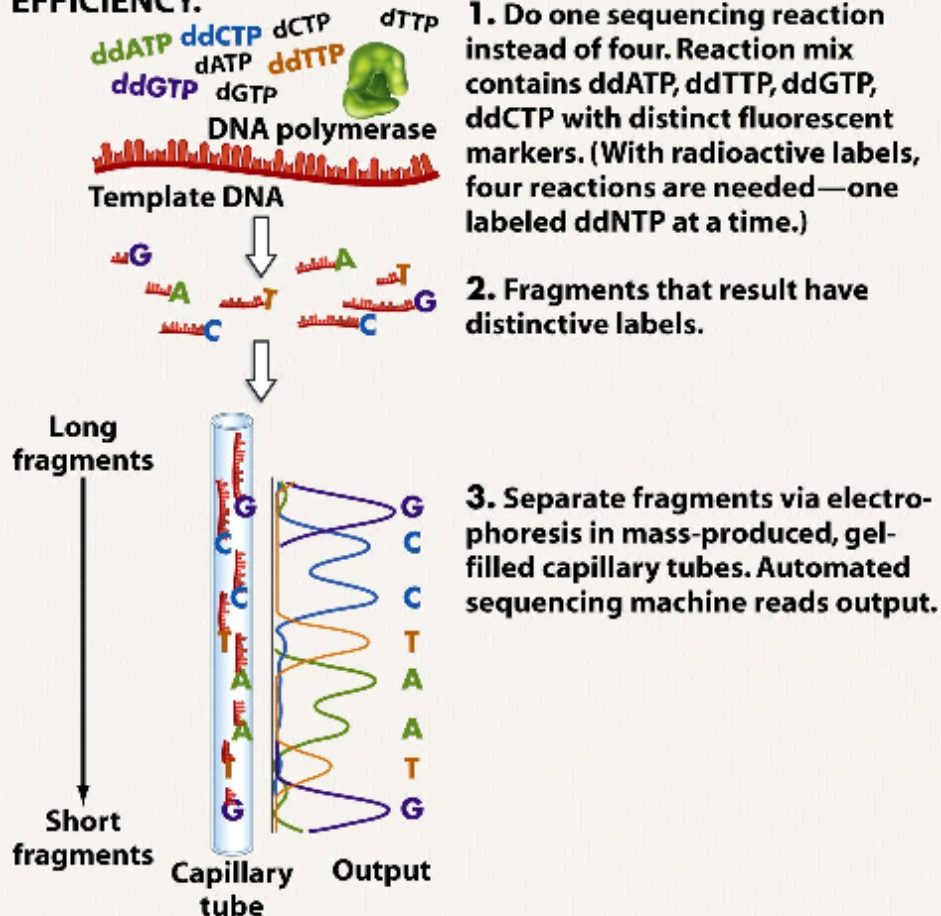


Figura 2: Sequencição pelo método de Sanger com uso de fluorescência (adaptado de <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/techniques.htm>)

Exão	Primer Forward	Primer Reverse
2	5'-CCC AAA ATC CTC TCT CCA CA-3'	5'-GAA ACT CGT GGC AGG GAC T-3'
6	5'-GTG ACA CCC CTG CTC ATT CT-3'	5'-GGG GGA AGG TCT ATC TCT GG-3'
9	5'-GAT AAC CTC TGT TGC CTT ACT CC -3'	5'-CTT GGC TGC ATG CTC ACT C-3'
13	5'-CTG TCA CAT AGC AGC CCT GA-3'	5'-CCA TTT GAC AGT TGG CTG GT-3'
14	5'-TGG GAA CCC TGA TCT CTC TG-3'	5'-CCC CTA TAG TGG ACC CAG TTG-3'
17	5'-CCT GAC AAG CCT GAT CCA TT-3'	5'-CTG CCT CTA CCT CCA CCC TA-3'
20	5'-CAT ATG CAG GCC CTG ACC-3'	5'-CCC TTC TCC ATC CCT CTC C-3'
21	5'-ACA TCC TGT CCC CCT TGT C-3'	5'-GAT CTC CCC TGG CCT CTT C-3'
27	5'-TCC TTT GCC TCT CCT TTC AG-3'	5'-TTA AGT CCA GAC CCC AGA CG-3'

Tabela 3: Sequência dos primers para amplificação dos exões

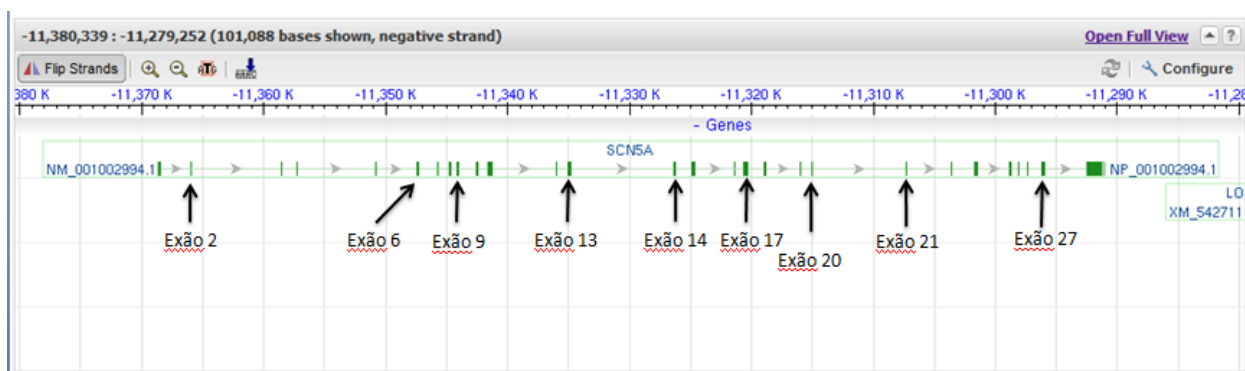


Figura 3: Gráfico da estrutura do gene SCN5A canino; os exões estudados foram marcados com setas (adaptado de *GenBank NCBI*)

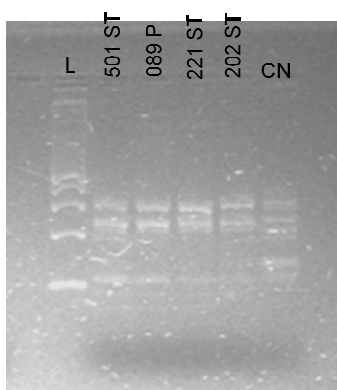


Figura 4: Bandas resultantes da amplificação por PCR do exão 20 de amostras de sangue, soro e plasma. Legenda: números – identificação do animal; CN – controlo negativo; L – marcador (*ladder*); P – plasma; S – soro; ST – sangue total.

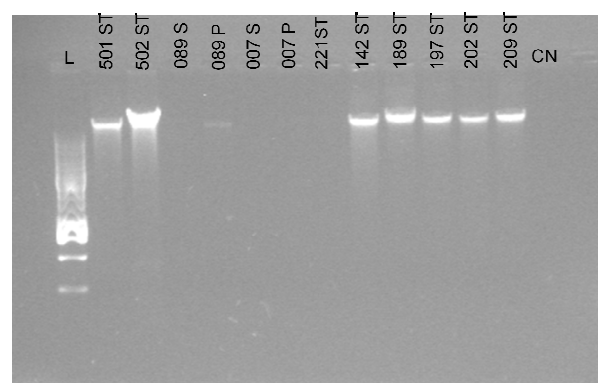


Figura 3: Bandas resultantes da extracção de DNA de amostras de sangue, soro e plasma. Legenda: números – identificação do animal; CN – controlo negativo; L – marcador (*ladder*); P – plasma; S – soro; ST – sangue total.

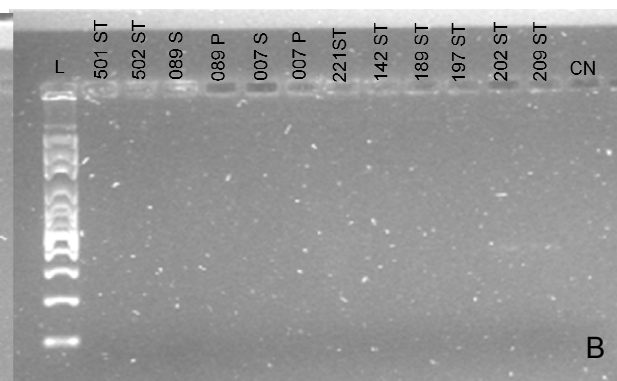
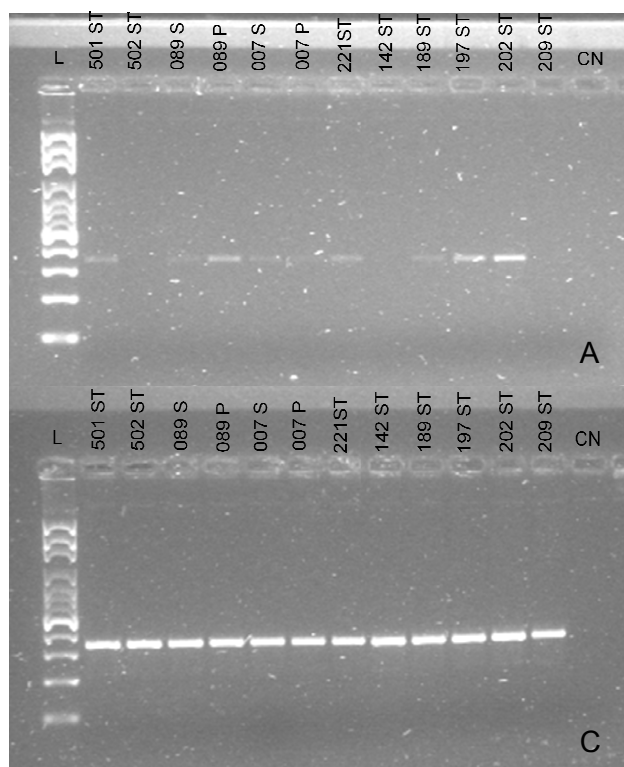


Figura 6: Bandas resultantes da amplificação por PCR do exão 27 de amostras de sangue, soro e plasma. A: $[MgCl_2] = 1,5mM$; $T_H = 51^\circ C$; B: $[MgCl_2] = 1,5mM$; $T_H = 48^\circ C$; C: $[MgCl_2] = 2,5mM$; $T_H = 51^\circ C$; Legenda: números – identificação do animal; CN – controlo negativo; L – marcador (*ladder*); P – plasma; S – soro; ST – sangue total.

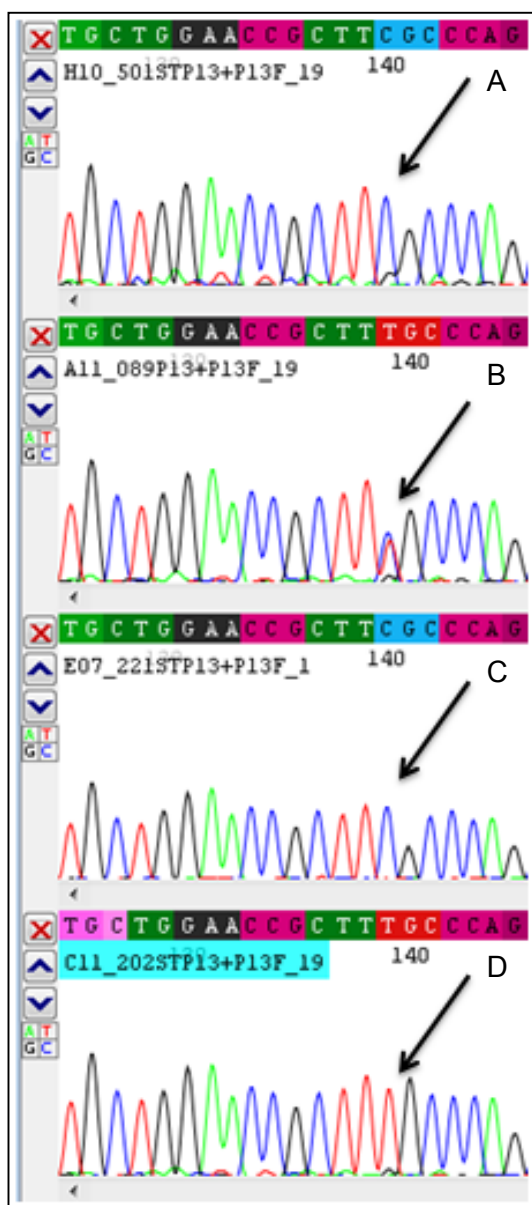


Figura 7: Output de um alinhamento das sequências *forward* do exão 13 (Codon Code Aligner). As setas indicam o local de variabilidade. Legenda: A – controle; B e C – cães SE doentes; D – cão SE não doente

	Nucleótido	A.A.	Nucleótido	A.A.	Nucleótido	A.A.
Ref	T	L	C	S	C	S
501 ST	C	S	C	S	C	S
089 P	C	S	Y	?	Y	?
221 ST	C	S	Y	?	C	S
202 ST	C	S	T	F	T	L
Varição	g.21278T>C	p.Leu7093Ser	g.21323C>T	p.Ser7108Phe	g.33686C>T	p.Ser11229Leu
Local	Exão 6				Exão 13	

Tabela 4: Resumo das mutações observadas nas sequências analisadas (exões 6 e 13); Legenda: Ref – sequência de referência (NC_006605.2); 501 ST – animal controle; 089 P e 221 ST – cães SE doentes; 202 ST – cão SE não doente; A.A. – aminoácido; T – timina; C – citosina; Y – C ou T; L – leucina; S – serina; F – fenilalanina

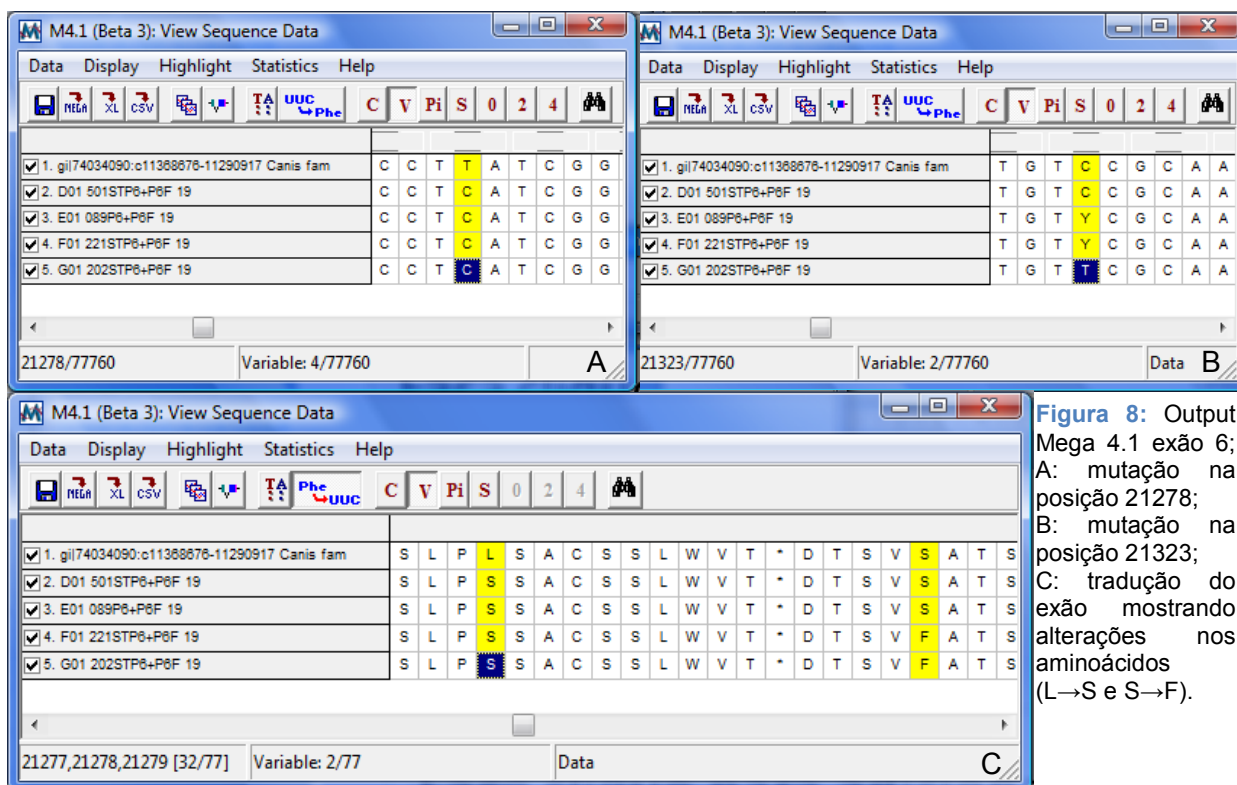


Figura 8: Output Mega 4.1 exão 6; A: mutação na posição 21278; B: mutação na posição 21323; C: tradução do exão mostrando alterações nos aminoácidos (L→S e S→F).

SCN5A, *H.sapiens*
sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit

SCN5A, *C.lupus*
sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit

NP_001092874.1
2016 aa

NP_001002994.1
2013 aa

Figura 9: Similaridade entre a sequência dos domínios conservados da proteína associada ao gene SCN5A de *Homo sapiens* e de *Canis lupus*; a ver de claro estão os domínios ligados ao transporte de iões, a azul os associados ao transportede do ião sódio e a verde escuro os de função desconhecida (adaptado de HomoloGene).

AGCCAGGGTACAGTCAGAGCTTGCAGCCCAGGAGGGGGACCTGTGGGAGCAAGAGTCAG
AAAGCAGGGCACCCCTCCTGGCCCAAGGGTCTTTCCAGCCCAAATAC**TGGGAACCCTGAT**
CTCTCTGTTCCTCACCAG**GTCTTCA**CAGGGAT**CTTCA**CCGCAGAGAT**GACTTTCA**AGATC
ATCGCTCTGGACCCCTACTACTACTTCCAGCAGGGCTGGAACATCTTTGACAGCATCATT
GTCATCCTGAGCCTCATGGAGCTGGGCCTGTCCCGCATGGGCAACCTCTCAGTGCTGCGC
TCCTTCCGCCTGTTACC**CAACTGGGTCCA**CTATAGGGGGGCAGGGTGGGGGTATGGGGCA
CTAAGGCAACTCCCTCTGAGGTCACCGCTCAGTCACCCCTACTCTGATCCATCTTGACTT

Figura 10: Exemplo da localização dos primers em relação à sequência do exão; o exão 14 está sombreado a rosa e os primers a amarelo (adaptado de GenBank NCB).

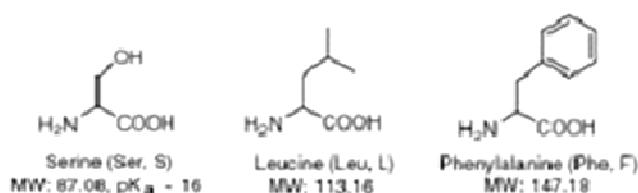


Figura 11: Aminoácidos envolvidos nas alterações observadas e respectivos pesos moleculares (adaptado de HubPages: Building Blocks of Life: Amino Acids)