



Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Farmácia



**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NAS ISOFORMAS 1 E 2 DA  
ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM UMA POPULAÇÃO AMOSTRAL  
DA CIDADE DE OURO PRETO, MINAS GERAIS**

GABRIEL JOSÉ LUCAS MOREIRA

Ouro Preto, Novembro de 2018



Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Farmácia



**GABRIEL JOSÉ LUCAS MOREIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia ao curso de Farmácia da  
Universidade Federal de Ouro Preto

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Guerra de Sá Cota  
Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup> Natália Rocha Barboza

Ouro Preto, Novembro de 2018.

M835a      Moreira, Gabriel José Lucas .  
Avaliação dos polimorfismos nas isoformas 1 e 2 da enzima superóxido  
dismutase em uma população amostral de Ouro Preto, Minas Gerais [manuscrito]  
/ Gabriel José Lucas Moreira. - 2018.

46f.: il.: tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Guerra de Sá Cota.  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Natália Rocha Barboza.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de  
Farmácia. Departamento de Análises Clínicas.

1. Estresse Oxidativo. 2. Superóxido dismutase. 3. Sistema nervoso  
periférico. I. Cota, Renata Guerra de Sá. II. Barboza, Natália Rocha. III.  
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### TERMO DE APROVAÇÃO

## Avaliação dos polimorfismos nas isoformas 1 e 2 da enzima superóxido dismutase em uma população amostral de Ouro Preto, Minas Gerais

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por **Gabriel José Lucas Moreira** e aprovado com nota 9,0, em 30 de Novembro de 2018, pela comissão examinadora:

*Daiane T. de Oliveira*

Doutoranda Daiane Teixeira de Oliveira (PG CiPharma-EF-UFOP)

*Elisio Alberto Evangelista*

Prof. Dr. Elisio Alberto Evangelista (DECBI-ICEB-UFOP)

*Natália Rocha Barboza*

Dra. Natália Rocha Barboza (Coorientadora-PPG CEBIOL-ICEB-UFOP)

*Renata Guerra de Sá Cota*

Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota (Orientadora-DECBI-ICEB-UFOP)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por me apoiarem nas minhas decisões e sobretudo por me ensinar o valor da educação.

À toda minha família, especialmente minha irmã Gilcilene pelo enorme suporte durante minha graduação.

Aos amigos que fiz durante esses cinco anos, sem vocês não poderia alcançar essa conquista.

À minha orientadora, que me deu a incrível oportunidade de aprender mais sobre biologia molecular .

À minha co-orientadora, pela paciência e por compartilhar um pouco do seu conhecimento.

A todos do laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda e por contribuir com meu trabalho.

*“ To infinity and beyond.”*  
-Buzz Lightyear

## RESUMO

Esse trabalho buscou identificar a presença de polimorfismos por meio das técnicas de PCR e RFLP, nas isoformas 1 e 2 da enzima superóxido dismutase em um grupo amostral de 10 moradores da cidade de Ouro Preto, Minas Gerais. Para tal, inicialmente foi feita a extração de DNA genômico do sangue de dez indivíduos, seguido da amplificação gênica de diversas regiões dos genes da *SOD1* e *SOD2* onde já foram identificados diferentes polimorfismos. Nossos resultados mostraram a presença de um perfil heterozigótico para a banda de deleção de 50-pb em 40% dos indivíduos. A presença desse perfil vem sendo descrito na literatura com uma forte associação ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Esse resultado reforça a importância de estudos de triagem a fim de reduzir morbidades associadas a doenças cardiovasculares e permitir o monitoramento mais precoce de fatores preditivos. Espera-se que este presente trabalho possa colaborar futuramente para nosso grupo de pesquisa no estabelecimento e desenvolvimento de relações de alterações polimórficas com distúrbios metabólicos.

Palavras chave: Estresse oxidativo, Polimorfismos de Nucleotídeo Único, SOD, *PCR*, *RFLP*

## ABSTRACT

This present study had as objective to identify the presence of polymorphisms by means of PCR and RFLP techniques at the superoxide dismutase enzyme's isoforms 1 e 2 in a sample group in Ouro Preto's residents. Initially we did the DNAg extraction of ten subjects' blood, following the genic amplification to some regions of genes to *SOD1* and *SOD2* which has been found different polymorphisms. Our results identified the presence to a heterozigous profile for the delection band with 50-pb in 40% of the subjects. This profile has been associated to increased risk of cardiovascular diseases development. This result reforce the importance to screening about to decrease associated morbidity to cardiovasculares diseases and permit the precocious monitoring in predictive factors. We expected that this present study can colaborar in the future for us research group in the establishment and development in the relation between polymorphism alterations and metabolic problems.

Key words: Oxidative stress, Single nucleotide polymorphism, SOD , PCR, RFLP

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

apoE4: apoproteína E4  
CAT : Catalase  
CuZnSOD : SOD1 ou Cobre-zinco Superóxido dismutase citósolica  
DNAg : ácido desoxirribonucleico genômico  
dNTP : Deoxirribonucleotideo trifosfato  
E3 : apoproteína E3  
E4 : apoproteína E4  
EDTA : ácido etilenodiamino tetra-acético ( ethylenediaminetetraacetic acid )  
ELA : Esclerose Lateral Amiotrófica  
ER : Espécies reativas  
ERO : Espécies reativas de oxigênio  
GPx : Glutathione peroxidase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de oxigênio  
HaeII : *Haemophilus aegyptius restriction enzyme*  
HPV : *Human papillomavirus*  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
MnSOD : SOD2 ou Superóxido dismutase mitocondrial  
NF-κB : Fator de transcrição nuclear kappa B  
NO : Óxido nítrico  
O<sub>2</sub> : Radical Superóxido  
OH· : Radical hidroxila  
ONOO· : Radical peroxidonitrila  
PCR : reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)  
RFLP : Polimorfismo de comprimento de fragmentos (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)  
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*)  
SOD : superóxido dismutase  
SOD3 : Superóxido dismutase extracelular  
Taq : *Thermus aquaticus*  
TBE : Tris/Borate/EDTA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Esquema de defesa antioxidante celular-----	16
Figura 2: Gel representativo do DNAg extraído de sangue-----	26
Figura 3: Produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> SOD2 intron 2 e SOD2 3UTR-----	28
Figura 4: Produtos de PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD2 5'UTR-----	29
Figura 5: Produtos PCR purificados obtidos com o <i>primer</i> SOD2 5'UTR-----	29
Figura 6: Produtos de PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD2 Ala16Val-----	30
Figura 7: Produtos PCR purificados obtidos com o <i>primer</i> SOD2 Ala16Val.---	31
Figura 8: Produtos PCR purificados obtidos com o <i>primer</i> SOD2 Ala16Val e tratados com enzima de Restrição HaeIII-----	32
Figura 9: Produtos de PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD1 exon 3-----	33
Figura 10: Produtos PCR purificados obtidos com o <i>primer</i> SOD1 exon 3.-----	34
Figura 11: Produtos de PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD1-----	35
Figura 12: Produtos de PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD1 e temperatura de anelamento de 55°C.-----	35
Figura 13: Produtos PCR obtidos com o <i>primer</i> SOD1 -----	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1 : Estudos que investigaram a relação entre o SNP Ala16Val na enzima SOD 2 e doenças associadas-----20 a 21

Tabela 2: Características gerais dos iniciadores *forward* e *reverse* utilizados nas diferentes reações de amplificação-----24

Tabela 3: Condições utilizadas para amplificação dos fragmentos de DNA em termociclador-----25

Tabela 4 : Dosagem das amostras de DNAg-----27

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 JUSTIFICATIVA.....	13
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4.1 Estresse Oxidativo na fisiopatologia das doenças.....	14
4.2 Mecanismos de controle do estresse oxidativo.....	14
4.3 Mutações nas enzimas de controle do estresse oxidativo.....	16
5. METODOLOGIA.....	22
5.1 Seleção dos indivíduos.....	22
5.2 Extração de DNA.....	22
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
5.4 PCR -RFLP.....	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
6.1 Extração do DNAg de amostras de sangue.....	26
6.2 Padronização das reações de PCR com os <i>primers</i> SOD2 intron 2, SOD2 3`UTR e SOD2 5`UTR.....	27
6.3 Padronização das reações de PCR com o <i>primer</i> SOD2 Ala16Val e análise do polimorfismo por PCR RFLP.....	30
6.4 Padronização das reações de PCR com o <i>primer</i> SOD1.....	34
7 CONCLUSÃO.....	37
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

# 1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças degenerativas possuem melhor prognóstico quanto mais cedo for feito o diagnóstico. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos testes diagnósticos que visam identificar de uma forma precoce e menos invasiva essas doenças são de grande interesse.

O desenvolvimento de várias doenças como cânceres (BICA et al., 2009) e distúrbios metabólicos (BICA et al., 2009) são associados muitas vezes a polimorfismos genéticos presentes em alguns genes cruciais para a manutenção de diversos processos celulares. Dentre esses genes destacam-se aqueles que tem como função combater o estresse oxidativo celular como os genes das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (BOLDUC; COLLINS; LOESER, 2018.). Essas enzimas são responsáveis por eliminar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, convertendo esses produtos em espécies menos reativas para as células, minimizando assim potenciais danos celulares.

Apesar de possuírem grande efetividade no controle das espécies reativas, essas enzimas estão sujeitas a variabilidade no seu potencial de frear os prejuízos que tais espécies provocam. Na tentativa de explicar o papel das espécies reativas na fisiopatologia de muitas doenças, a Teoria do Estresse Oxidativo (HARMAN, 1956) vêm se destacando no ambiente científico como uma relevante base para justificar o desenvolvimento patológico provocado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Muitas pesquisas provaram a associação do estresse oxidativo na evolução clínica de algumas doenças, tais como câncer (USMAN; VOLPI, 2018), diabetes (JEZEK; JABUREK; HLAVATA, 2018), problemas cardíacos (ALI et al., 2018) e até neurodegenerativos, como o Parkinson (ISHOLA et al., 2018). Como já citado anteriormente, as enzimas responsáveis pelo controle do estresse oxidativo, apresentam variações nas suas atividades catalíticas, sendo que atualmente os polimorfismos nos genes que as codificam são apontados como um dos principais fatores de alteração enzimática (MACHADO, et al., 2018).

Dentre as enzimas que controlam o estresse oxidativo, os polimorfismos das enzimas SOD (tanto a citosólica quanto a mitocondrial) estão relacionadas a diversas enfermidades, como Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (ALAVI et al., 2013;

KWON et al., 2012; ORIGONE et al., 2012 ), cânceres (KANG et al., 2007 ; COX et al., 2006; ZEJNILOVIC et al., 2009) e Diabetes Tipo 2 (NOMIYAMA et al., 2003).

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os polimorfismos nas enzimas SOD1 e SOD2 em grupo amostral da população da cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, utilizando as técnicas moleculares de PCR e RFLP.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a presença de polimorfismos em genes que codificam as isoformas 1 e 2 das enzimas superóxido dismutase numa população amostral da cidade de Ouro Preto.

### **2.2 Objetivos específicos**

Extrair DNA genômico de células do sangue humano;

Padronizar técnica de PCR utilizando-se diferentes *primers* para

amplificações dos genes *SOD1* e *SOD2*;

Avaliar presença do polimorfismo Ala16Val da enzima SOD 2 por RFLP-PCR;

Avaliar polimorfismos da enzima SOD 1 utilizando-se a técnica de PCR .

### 3 JUSTIFICATIVA

A partir do estudo das variações genéticas presentes nas enzimas responsáveis pelo controle do estresse oxidativo, pode-se desenvolver técnicas de triagem mais sensíveis e favorecer a escolha por terapias mais direcionadas, a fim de prevenir a progressão das doenças relacionadas a essas variações .

As técnicas de Biologia Molecular, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e PCR (*Polymerase chain reaction*), possuem elevada sensibilidade na detecção de diversos tipos de patologias, como na detecção do vírus do HPV (KANESHIMA et al., 2001), Leishmanioses (GARCIA et al., 2005), Leucemia mielóide crônica (ALMEIDA; SADDI, 2007 ), bem como tem se tornado útil na triagem de alterações genéticas, como os polimorfismos, sendo de grande interesse no manejo precoce de algumas doenças, diminuindo a morbimortalidade relacionada com algumas alterações genéticas, promovendo um direcionamento terapêutico mais adequado. Logo a avaliação da presença de polimorfismos em enzimas reguladoras do estado redox, pode ser alvo para se discutir a patogênese de inúmeras doenças.

Muitos esforços vêm sendo direcionados à associação dos polimorfismos nas isoenzimas SOD como um dos fatores de predisposição ao estresse oxidativo e doenças associadas. Sendo assim, o presente estudo busca demonstrar a presença dessas alterações genéticas em uma população amostral de moradores de Ouro Preto, os dados obtidos podem auxiliar em tratamentos preventivos, caso tais alterações possam predispor ao desenvolvimento de alguma doença.

Nosso grupo de pesquisa estuda o estabelecimento e o desenvolvimento da obesidade e de suas comorbidades. Diversos trabalhos tem mostrado um desequilíbrio redox nas células de vários tecidos de indivíduos obesos. Dessa forma esse trabalho irá contribuir para o estabelecimento de uma técnica de identificação de alterações polimórficas nas enzimas do controle redox celular, para podermos correlacionar futuramente com o estabelecimento de doenças metabólicas.

## **4 REVISÃO DA LITERATURA**

### **4.1 Estresse Oxidativo na fisiopatologia das doenças**

A Teoria do Estresse Oxidativo, descrito originalmente por Denham Harman em 1956, propôs que os organismos acumulavam ao longo da vida, danos celulares promovidos pela produção de espécies reativas (ER) durante o metabolismo de fontes energéticas. O envelhecimento e as doenças degenerativas foram atribuídos aos efeitos deletérios dessas espécies sobre constituintes celulares e nos tecidos conjuntivos (HARMAN, 1956).

Dentre essas espécies reativas, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO) como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e o radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ). Estudos recentes comprovam a associação dessas substâncias à lesões celulares, como a peroxidação de lipídeos, a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, ativação excessiva de genes pró-inflamatórios, danos ao DNA e aumento do risco de câncer (GUTTERIDGE; HALLIWELL et al., 2010).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de avaliar a associação do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças degenerativas, tais como Parkinson (DEXTER; JENNER, 2013), diabetes (GRATAS-DELAMARCHE et al., 2014) e hipertensão arterial (CHAMPLAIN et al., 2004).

### **4.2 Mecanismos de controle do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ER excede os sistemas antioxidantes, seja por causa de uma maior geração de tais substâncias ou por uma diminuição de defesa antioxidante. Numa forma de equilibrar a produção de espécies reativas, os organismos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante para metabolizá-las. Estes incluem enzimas, como superóxido dismutase (SOD) e peroxidases, e antioxidantes obtidos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), carotenos, precursores das vitaminas E e A. A vitamina E promove a conversão dos radicais livres em espécies mais estáveis, por meio de doação de um átomo de hidrogênio e protegendo lipídeos da peroxidação num sistema de regeneração, ao final do processo, a vitamina E precisa ser regenerada e é nessa etapa que a vitamina C atua, reagindo com o oxigênio antes do processo oxidativo, recuperando assim o potencial antioxidante da vitamina E (NWOSE et al., 2008).

A atividade antioxidante da vitamina A e dos carotenoides é conferida pelas suas cadeias hidrofóbicas que são capazes de neutralizar e estabilizar o oxigênio singlete e o radical peroxil. Em geral, quanto mais longa a cadeia, maior a capacidade de estabilização do radical peroxila. Por causa de suas estruturas, a vitamina A e carotenoides podem auto-oxidar quando a tensão de  $O_2$  aumenta e, portanto, são mais eficazes antioxidantes em baixas tensões de oxigênio que são típicas de níveis fisiológicos encontrados em tecidos (PALACE et al., 1999 ; MCNULTY; JACOB; MASON, 2008).

Quanto ao mecanismo enzimático, são inclusas as enzimas Superóxido dismutase (SOD), a Glutathione peroxidase (GPx) e a enzima Catalase (CAT). As reações catalisadas por essas enzimas são muito importante na manutenção do estado redox celular (Figura 1).

A enzima Glutathione peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos usando Glutathione (GSH), protegendo assim as células contra danos oxidativos. Esta apresenta 5 isoformas identificadas (ARTHUR, 2000 ; EL-FAR et al., 2005; HAMANISHI et al., 2004). GPx1 é citosólica e produzida por todos tecidos, apesar de ser mais encontrada nas hemácias, rins e fígado (ZOTOVA et al., 2004). GPx2 também é citosólica e é encontrado no fígado e colón. GPx 3, sendo encontrada no plasma , é produzida principalmente nos túbulos proximais renais (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 1997; ROXBOROUGH et al., 1999; WHITIN et al, 1998). GPx4 está presente em mais tecidos, apesar de apresentar elevados níveis nos testículos (FORSBERG et al., 2001). GPx5, chamada também glutathione peroxidase epididimal, é encontrada principalmente nos testículos, protegendo as membranas lipídicas dos espermatozoides.

A enzima Catalase é uma hemoproteína tetramérica que converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Em animais, o peróxido de hidrogênio é detoxificado pela ação da CAT e GPX. A reação requer duas moléculas de  $H_2O_2$  e, portanto, tem uma alta taxa de conversão (RHEE et al., 2005). Catalase está presente em todas as células aeróbicas. No entanto, os níveis mais altos da enzima são encontrados no fígado, rim e eritrócitos (CRAWFORD et al., 2012).

A enzima SOD é principal enzima envolvida nesse processo de manutenção do estado redox, pode ser encontrada em três formas distintas no corpo humano: SOD1, ou CuZnSOD, que está localizada primariamente no citosol e é dependente de cobre e zinco, a SOD2, ou MnSOD, que é encontrada nas mitocôndrias e possui manganês

como cofator, e por fim, a SOD3 ou SOD extracelular (FATTMAN; SCHAEFER; OURY. 2003).

De forma geral, as isoenzimas SOD atuam catalisando a dismutação do anion superóxido altamente reativo a  $O_2$  e moléculas menos reativas como  $H_2O_2$ . Que por sua vez, pode ser metabolizado nas reações catalisadas pelas enzimas CAT e GPX (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999).

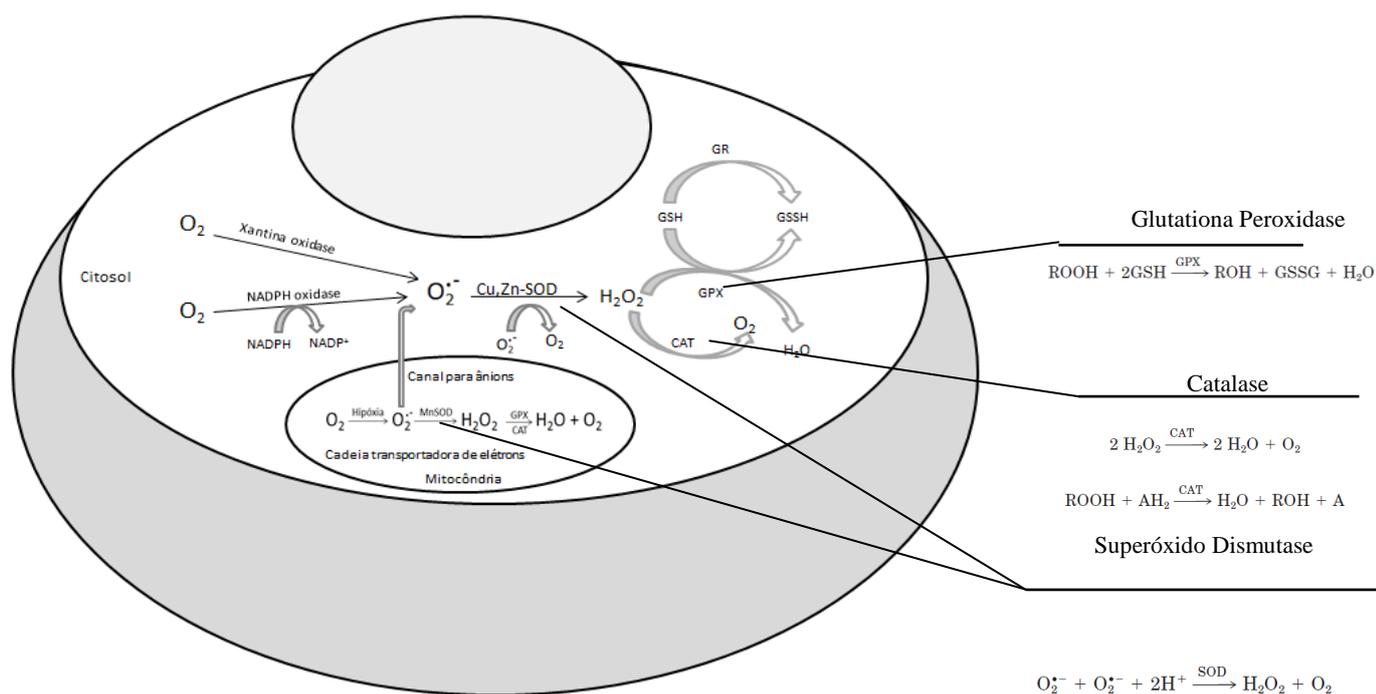


Figura 1: Esquema de defesa antioxidante celular. Adaptado de Matés, Pérez-Gómez, De Castro, 1999

### 4.3 Mutações genéticas e o efeito no controle do estresse oxidativo

A efetividade antioxidante das enzimas SOD, CAT e GPx pode variar por diversos fatores, incluindo toxinas ou doença que esgotam suas capacidades catalíticas (MATES et al., 1999) e alterações nas próprias enzimas (VALKO et al., 2007). Atualmente muitos estudos estão sendo direcionados em estabelecer uma relação entre mutações dos genes que codificam enzimas antioxidantes e doenças associadas ao estresse oxidativo, para que estas possam servir como biomarcadores na triagem de doenças.

A mutação mais comum estudada é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Um SNP ocorre quando bases simples em genes são alteradas ou excluídas, o que pode resultar em uma alteração de aminoácido em uma posição específica e uma mudança no fenótipo (CRAWFORD et al., 2012).

No genes que codificam as isoformas GPx foram encontrados cerca de 46 SNPs em *GPx1*, 73 em *GPx2*, 120 em *GPx3*, 88 em *GPx4* e 93 em *GPx5*. (CRAWFORD et al., 2012). Essas mutações foram associadas a predisposição ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como de mama (UDLER et al., 2007), colorretal (BERMANO et al., 2007) e também ao risco aumentado de trombose (VOETSCH et al., 2007, 2008).

Para o gene da catalase, alguns estudos estão sendo feitos a fim de investigar a influência do SNP C-262T no desenvolvimento de doenças (CRAWFORD et al., 2012). Esses estudos apontam que este polimorfismo não foi significativo no desenvolvimento de algumas doenças, porém quando associado a outros SNPs o risco de hipertensão aumentou (ZHOU et al., 2005).

Atualmente os SNP's mais estudados com relação ao estresse oxidativo, são nos genes que codificam as enzimas SOD; Até 2011 foram identificados em humanos, 111 SNPs na enzima SOD1, 190 para SOD2 e 100 para SOD3 (CRAWFORD et al., 2012).

Fortes evidências indicam que mutações no gene *SOD1* predis põe ao desenvolvimento de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (ALAVI et al., 2013; KWON et al., 2012; ORIGONE et al., 2012 ). Aproximadamente 12 a 23% dos casos de ELA estão ligados ao cromossomo 21q22.1 (RABE et al., 2010). Neste *locus* gênico, 156 mutações *missense* com um padrão de herança autossômica dominante em todos os cinco éxons do gene Cu/Zn Superóxido Dismutase (*SOD1*) foram catalogadas (ALS ONLINE GENETICS DATABASE, 2011; Alves, 2011). Acredita-se que a diminuição da atividade da SOD leva ao acúmulo do íon superóxido, que liga-se então ao óxido nítrico (NO) para formar os radicais livres peroxidonitrila (ONOO<sup>-</sup>) e hidroxila (OH<sup>-</sup>). O acúmulo de radicais livres é altamente lesivo para a célula, pois provoca peroxidação das membranas e modificação de proteínas (nitritação aberrante dos resíduos de tirosina), culminando com a morte do neurônio motor (ROWLAND; SHNEIDER, 2001).

Algumas mutações na SOD3 são responsáveis pela alteração na distribuição e atividade da proteína (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; GRIESS; TOM; DOMANN, 2017). Os genes mutantes podem inibir a capacidade da SOD3 de se ligar à heparina, o

que prejudica sua afinidade com a superfície endotelial e aumenta drasticamente os níveis plasmáticos de SOD3 (GRIESS; TOM; DOMANN, 2017). Diversos estudos associam tais mutações com o fisiopatologia da hipertensão (NAGANUMA et al., 2008.), aterosclerose (OHANA; PETERSON; HARRISON, 1993) e até prejuízos no aprendizado e memória (LEVIN; BRUCATO; CRAPO, 2000).

Contudo, um dos SNP que ganhou bastante espaço nas pesquisas relacionadas ao estresse oxidativo foi o SNP rs4880, presente no exon 2 do gene *SOD2*. Esse SNP promove a substituição de citosina por timina na posição 2734, promovendo a mudança do aminoácido alanina por valina na posição 16, gerando o genótipo SOD2 Ala16Val, esse SNP resulta na expressão e produção de RNAm instável (SUTTON et al., 2005). O genótipo SOD2 Ala16Val está sendo amplamente associado ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como câncer de mama e próstata (BICA et al., 2009), nefropatia diabética (NOMIYAMA et al., 2003) e doenças cardiovasculares (GOTTILIEB et al., 2005). A tabela 1 traz alguns achados relacionados ao SNP Ala16Val.

#### **4.4 Estudo molecular na triagem e diagnóstico de doenças.**

As técnicas de biologia molecular, como PCR e RFLP, são extremamente importantes na identificação de genes clinicamente relevantes, permitindo o estudo de diversas enfermidades em função da relação do genótipo-fenótipo. A detecção de determinados perfis genéticos podem permitir identificar estados iniciais ou avançados, ou até atuando no estabelecimento de categorias de risco baseadas na presença de genes ou alterações preditivas de doença (LIEFERS; TOLLENAAR, 2002).

Está cada vez mais frequente o uso de metodologias moleculares para explorar quais genes são moduladores de processos biológicos, em especial aos genes que podem possuir relação com a patogênese de aterosclerose (CAMPEDELLI et al 2017) e doenças neurodegenerativas (LI et al, 2018.). Algumas doenças de herança familiar podem ser detectadas antes mesmo dos primeiros sinais (SPALVIERI; ROTENBERG, 2004), é frequente na literatura encontrar o papel de polimorfismos genéticos no desenvolvimento de doenças hereditárias, tais como o Parkinson familiar, no qual foi encontrado uma significativa associação de alguns genes relacionados ao metabolismo do ferro e que apenas a mudança de Gly258Ser da transferrina afeta o desenvolvimento da doença (LUCKING et al, 2003; BORIE et al, 2002). Outros estudos demonstraram que o alelo *epsilon4* da apoproteína E (apoE4) é um fator de risco para o Alzheimer

( BENNETT et al., 2003), o predomínio da proteoforma E4 sobre a E3 promove o depósito cerebral de peptídeos beta-amiloides, responsáveis pelo progressivo déficit sináptico-colinérgico cerebral (DE SÁ CAVALCANTI ENGELHARDT, 2012). A identificação dos portadores de tais polimorfismos permite o melhor conhecimento da relação do genótipo-fenótipo em casos de doenças de histórico familiar, possibilitando uma intervenção mais precoce. Logo, torna-se notório a importância das técnicas moleculares na identificação de alterações gênicas para fins clínicos, otimizando o diagnóstico e o tratamento.

Condição	Achados	Referências
Câncer de mama	Alelo Ala está associado com o aumento no risco de desenvolver câncer de mama	(MITRUNEN et al, 2001)
Câncer de próstata	Ala/Ala e Ala/Val estão associados com o câncer de próstata em caucasianos.	(KANG et al, 2007)
Câncer de pulmão	Val/Val associado com câncer de pulmão em presença de mais dois outros SNPs	(LIU et al, 2004)
Câncer de bexiga	Genótipo Val/Val associado com um aumento no risco de câncer de bexiga, principalmente em fumantes de alta intensidade.	(HUNG et al, 2004)
Câncer de estômago e lesões pré-cancerosas gástricas	Alelo Ala significativamente associado com câncer de estômago e potencial maligno de lesões pré-cancerosas gástricas	(YI et al, 2010)
Doença crônica renal (DCR)	Progressão do DCR significativamente mais rápida em Ala/Val e Val/Val comparado com Ala/Ala	(CRAWFORD et al, 2011)
Diabetes mellitus Tipo 2 associado nefropatia diabética	Genótipo Val/Val era significativamente mais alto em diabéticos com nefropatia	(NOMIYAMA et al, 2003)

**Tabela 1 : Estudos que investigaram a relação entre o SNP Ala16Val na enzima SOD 2 e doenças associadas . Adaptado de CRAWFORD et al, 2012.**

Cardiopatía	Alelo Val apresentou risco aumentado de cardiopatía.	(VALENTI et al, 2004)
Esteatose hepática não alcoólica (EHNA)	Frequência Val/Val foi mais alta em pacientes com EHNA comparado com grupo controle.	(NAMIKAWA et al, 2004)
Doenças neuromotoras	Alelo Ala com maior risco de doenças neuromotoras, especialmente em mulheres.	(VAN LANDERGHMET et al, 1999)
Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	Genótipos contendo alelo MnSODVal são fatores de risco para o LES, assim como para LES com manifestações neurológicas	(STOIMENOV et al, 2017)
Risco de carcinoma hepatocelular/ morte por cirrose alcoólica	Comparado com genótipo Val/Val, Ala/Val e Ala/Ala foram associados com risco aumentado de Carcinoma hepatocelular e morte.	(PAE, 2008; NAHON et al, 2009)

**Tabela 1 : Estudos que investigaram a relação entre o SNP Ala16Val na enzima SOD 2 e doenças associadas . Adaptado de CRAWFORD et al, 2012.**

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Seleção dos indivíduos

O grupo amostral era composto por 10 voluntários saudáveis, sendo 8 mulheres e 2 homens, com idade entre 22 a 48 anos, todos residentes em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Trata-se de um estudo de genética molecular, em que todos os indivíduos convidados a participar foram informados através de termo de consentimento, livre e esclarecido, no qual foi explicado o objetivo da pesquisa, assim como o posicionamento de coleta da amostra.

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (CEP-UFOP), Protocolo de Pesquisa nº 483350/2015.

### 5.2 Extração de DNA

Para extração do DNA foi utilizado o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®), seguindo recomendações do fabricante. Resumidamente, o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e foram adicionados 900 µL de *Cell Lysis Solution* em 300 µL de sangue, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foi feita centrifugação à 13000 *xg* por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* foram adicionados 300 µL de *Nuclei Lysis Solution* e 50 µL de proteinase K (20mg/µL). Essa mistura foi incubada por 1 hora a 65°C e, em seguida, foram adicionados 100 µL de *Protein Precipitation Solution*. Foi feita uma nova centrifugação a 13 000 *xg* por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de isopropanol, seguido de centrifugação a 13 000 *xg* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 300 µL de etanol 70%. Repetiu-se a centrifugação anterior desprezando-se novamente o sobrenadante. O *pellet* foi seco em capela de fluxo laminar por aproximadamente 15 minutos e ressuspenso em 50 µL água *milli-q* estéril. A solução de DNAg foi incubada a 65°C por 1 hora, para posterior quantificação em Espectrofotômetro (*nanoDrop Lite, Thermo Scientific*) a 260 nm. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,6% utilizando TBE 0,5x (Tris HCl 0,45M; ácido bórico 0,45M, EDTA 0,5M pH 8) como tampão de corrida. As bandas foram visualizadas em transluminador, após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### 5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando *primers* descritos na literatura que correspondem regiões que já foram identificados polimorfismos para os genes de SOD1 e SOD2. A sequência e as características dos *primers* estão descritos na tabela 1. A amplificação foi realizada em 25 µL da mistura reacional que continha tampão 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 mM *primers* mix, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (*Thermo Scientific Taq DNA Polymerase*) e 35-50 ng DNA como molde. Para os produtos de PCR, dos quais foi feito a digestão com enzimas de restrição, foi utilizada a Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (*Thermo Scientific*). Apenas para o primer SOD2 Ala16Val foi feita uma alteração na concentração do MgCl<sub>2</sub> para 0,8 mM. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 3% utilizando TBE 0,5x (Tris HCl 0,45M; ácido bórico 0,45M, EDTA 0,5M pH 8) como tampão de corrida. As bandas foram visualizadas em transluminador, após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Para os produtos de PCR obtidos com o primer SOD1, também foi feito gel de poliacrilamida 10% corados com prata.

Nome dos primers	Sequência	Região amplificada	Referências
<b>SOD1-Exon3</b>	F5'-TATCCAGAAAACACGGTGGGCC-3' R5'-TCCTGTATTAGTTCCCCTTTGGCAC-3'	Intron3/exon3	PALMIROTTA <i>et al</i> 2015.
<b>SOD1</b>	F 5`- AATTCCTTACCCCTGTTCTA-3` R 5`- GGCAGATTTAGTTCATTGT-3`	Região promotora	ESKANDARI-NASAB <i>et al</i> 2014.
<b>SOD2Ala16Val</b>	F5'TCTCGTCTTCAGCACCAGCAGG-3' R5'-TGGTACTTCTCCTCGGTGACG-3'	Exon 2	PALMIROTTA <i>et al</i> 2015.
<b>SOD2 5UTR</b>	F5'-TGAACCGTTTCCGTTGCTTC-3' R5'-ACCCAACACGTAGCCCTAGTTAC-3'	Para amplificar o (C / T) SNP (rs2758346) na região 5`UTR	WIENER <i>et al</i> 2007
<b>SOD2 3UTR</b>	F5'-GATGCCTTTCTAGTCCTATTC-3' R5'-TCAGTTCACCTGCTACATT-3'	3`UTR	BOROUMAND <i>et a</i> 2018
<b>SOD2 Intron2</b>	F5`-CCTTTGGGGTGTGTATGGAA-3` R5`-AAGCTCTGCAGGTACTCAATCA-3`	Intron 2	BOROUMAND <i>et al</i> 2018

**Tabela 2: Características gerais dos iniciadores *forward* e *reverse* utilizados nas diferentes reações de amplificação.**

**Tabela 3:** Condições utilizadas para amplificação dos fragmentos de DNA em termociclador.

Iniciadores	Ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da Extensão	Resfriamento
<i>SOD1-Exon3</i>	e	95°C	95°C	65°C	72°C	72°C	4°C
<i>SOD2Ala16Val</i>	35	5 min	1 min	40 seg	1 min	10 min	
SOD1	30	95°C 5 min	95°C 30 seg	55°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 10 min	4°C
SOD2 5' UTR	35	95°C 5 min	94°C 30 seg	56°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min	4°C
SOD2 3'UTR	30	94°C 5 min	94°C 30 seg	60°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min	4°C
SOD2 Intron2	30	94°C 5 min	94°C 30 seg	50°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min	4°C

#### 5.4 PCR -RFLP

Antes de fazer a digestão dos produtos de PCR, os mesmos foram purificados utilizando protocolo padrão (SAMBOOK et al, 1989.), no qual foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3M e 250 µL de etanol absoluto à 100 µL dos produtos de PCR. Essa mistura foi incubada a -20 °C por 30 minutos, seguido por centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70% e novamente foi feita uma centrifugação à 14000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar por aproximadamente 15 minutos e ressuspensionado em 50 µL água *milli-q* estéril. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em espectrofotômetro (*nanoDrop Lite, Thermo Scientific*) a 260 nm e a integridade foi avaliada em gel de agarose 5% utilizando TBE 0,5x (Tris HCl 0,45M; ácido bórico 0,45M, EDTA 0,5M pH 8) como tampão de corrida. As bandas foram visualizadas em transluminador, após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Após a purificação, os produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD2 Ala16Val foi digerido por 16 horas em banho- maria à 37 °C com a enzima de restrição BsuRI (Hae III) (*Thermo Scientific*). A mistura reacional continha 10 µL de produto de PCR (aproximadamente 400 ng de DNA), 2 µL do tampão R 10X, 2 µL da enzima BsuRI e 6 µL de água *milli-q* estéril. O produto de digestão foi verificado em gel de poliacrilamida 10 % e corado com prata.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Extração do DNAg de amostras de sangue

A partir de amostras de sangue, foi realizada a extração do DNAg. O sangue foi escolhido devido a facilidade de coleta o que é importante para o desenvolvimento de teste diagnóstico que utilizam biomarcadores.

Inicialmente, a coleta de sangue foi feita em tubos coletores sem EDTA e a extração foi realizada sem tratamento com a enzima proteinase K. Nós não obtivemos sucessos nas primeiras extrações mesmo após incluir a etapa de tratamento com a enzima proteinase K. O DNAg só foi extraído quando as coletas passaram a ser feitas em tubos coletores contendo EDTA, alguns estudos demonstraram que a heparina e o grupo heme são inibidores da reação em cadeia de polimerase, sendo assim os anticoagulantes recomendados para essas amostras são os ácidos etilenodiaminotetracético (EDTA) e citrato dextrose (ACD) (SATSANGI et al, 1994).

Na figura 2 podemos observar a integridade dos DNAg extraídos e a tabela 4 mostra as concentrações DNAg obtidas nas extrações realizadas. Os DNAg extraídos foram utilizados para realização das reações de PCR.

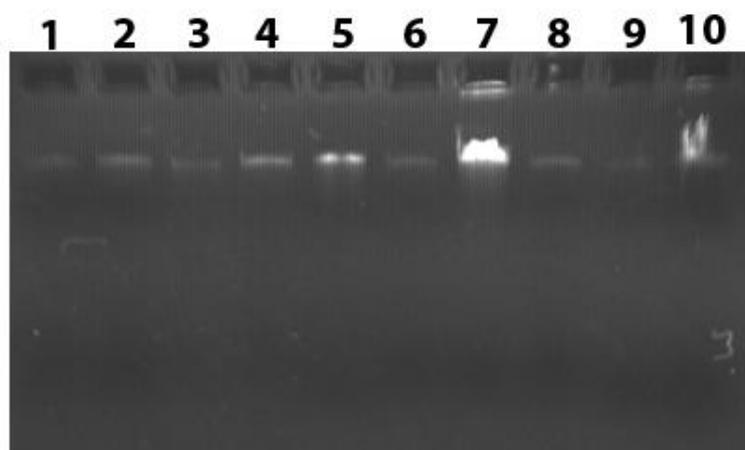


Figura 2: Gel representativo dos DNAg extraído de sangue. Cerca de 300  $\mu$ L de sangue foram utilizados para extração de DNAg e 5  $\mu$ L da preparação de DNAg foram aplicados em gel de agarose 0,5% para averiguar sua integridade. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL).

**Tabela 4 : Dosagem das amostras de DNA genômico**

Amostras	Réplicas	Concentração (ng/μL)	Amostras	Réplicas	Concentração (ng/μL)
1	1	17,4	6	1	21,4
	2	25,76		2	56,5
	3	26,5		3	114,4
	4	19,9		4	39,4
2	1	49,05	7	1	712,7
	2	37,7		2	602
	3	56,6		3	52,03
	4	14,8		4	54,8
3	1	33,26	8	1	51,23
	2	32,2		2	67,23
	3	0		3	56,2
	4	17,6		4	76,26
4	1	41,23	9	1	35,6
	2	62,2		2	27,06
	3	33,6		3	47,46
	4	24,96		4	36,7
5	1	127,93	10	1	30,53
	2	81		2	41
	3	52,15		3	39,5
	4	21		4	51,1

## 6.2 Padronização das reações de PCR com os *primers* SOD2 intron 2, SOD2 3'UTR e SOD2 5'UTR

Diversos polimorfismos nas enzimas SOD2 já foram descritos e relacionados a inúmeras patologias. Visando determinar a presença/ausência de alguns desses polimorfismo numa população amostral da cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, foi feita a padronização da técnica de PCR para algumas regiões do gene da enzima SOD2 onde já foi descrito a presença de polimorfismo. O *primer* SOD2 intron 2 amplifica uma região gênica polimórfica rs2758339 (substituição de A/C) que está localizado nas proximidades de elementos de transcrição de SP1 e NF-κB enquanto que

o primer SOD2 3'UTR amplifica uma região onde o polimorfismo rs5746136 (substituição A/G) cria um novo local de ligação ao receptor de glicocorticoides (BOROUMAND, MAHMOUDINASAB, SAADAT, 2018), sugerindo que esses polimorfismos possam afetar a expressão gênica da SOD2. O polimorfismo rs2758339 também foi correlacionado ao risco em se desenvolver câncer gástrico (EFTEKHARI, 2018).

Foram feitas diversas tentativas na padronização do *primer* SOD2 intron 2 variando-se a temperatura de anelamento e concentração de MgCl<sub>2</sub> para alterar a estringência do *primer*. Contudo, como pode ser observado na figura 3, não obtivemos sucesso na padronização da reação de PCR para esse par de *primers*. Para o primer SOD2 3'UTR foi obtido uma banda única na primeira tentativa como observado na figura 3.

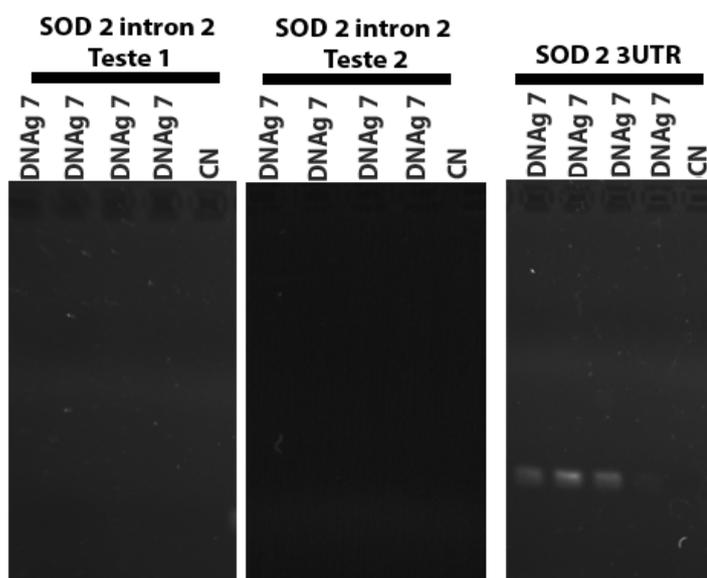


Figura 3: Produtos de PCR obtidos com os *primers* SOD2 intron 2 e SOD2 3'UTR. Para as reações foi utilizado o DNAg 7. Cerca de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5 µ/mL). Teste 1: temperatura de anelamento de 60°C; Teste 2: temperatura de anelamento de 50°C e 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; CN: controle negativo.

O primer SOD2 5' UTR amplifica uma região gênica polimórfica rs2758346 (substituição C/T) na 5'UTR (WIENER et al., 2007), esse SNP está localizado no sítio promotor da enzima SOD2, um local de ligação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (Xu et al. 2002). Para esse *primer* foi obtido uma banda única na primeira tentativa como observado na Figura 4.

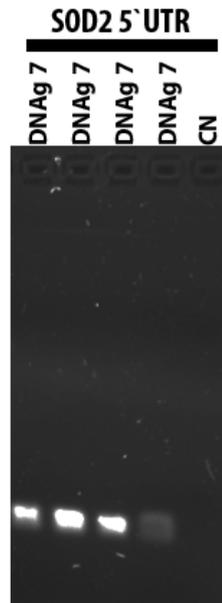


Figura 4: Produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD2 5'UTR. . Para as reações foi utilizado o DNAg 7. Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). CN: controle negativo.

Para essa região gênica foi realizada PCR com o DNAg obtido de todos os indivíduo e os produtos foram purificados como descrito em materiais e métodos (Figura 5). A sequência gênica desses produtos possui sítios para enzima de restrição BsrGI e, futuramente os produtos de PCR purificados serão digeridos com essa enzima para análise da frequência desse polimorfismo na população estudada.

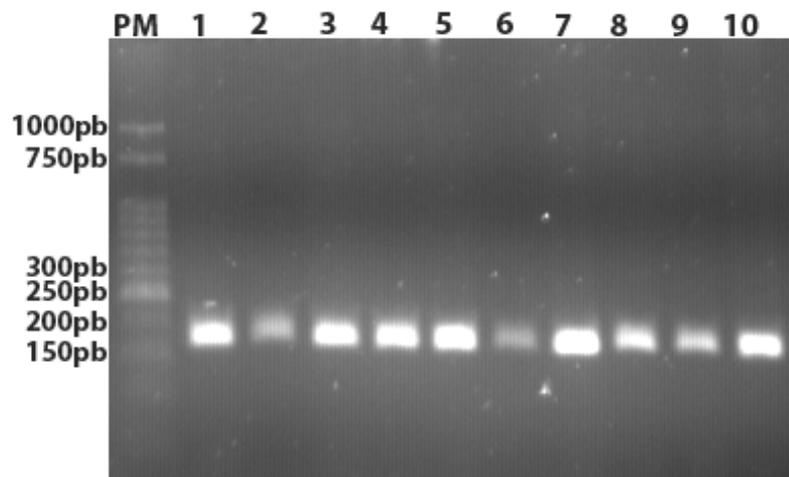


Figura 5: Produtos PCR purificados obtidos com o *primer* SOD2 5'UTR. Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). PM: peso molecular 50pb (Ludwig biotec).

### 6.3 Padronização das reações de PCR com o *primer* SOD2 Ala16Val e análise do polimorfismo por PCR RFLP

Um dos mais comuns polimorfismos na enzima SOD2 é devido à substituição da alanina por valina na posição 16, resultando no SNP Ala16Val (PASCOTINI et al., 2018). Esta alteração pode refletir em uma redução enzimática funcional a nível mitocondrial, o que implicaria uma diminuição da eficiência enzimática (PASCOTINI et al, 2018), sendo que o Ala-MnSOD demonstrou maior efetividade no controle de geração de espécies reativas em relação a Val-MnSOD (SBAROUNI et al, 2008). Dessa forma, propusemos avaliar esse polimorfismo na enzima SOD2.

Inicialmente foi feita a padronização da PCR utilizando-se um par primers que amplifica a região do polimorfismo Ala16Val. Nas primeiras tentativas de padronização da reação de PCR com o *primer* SOD2 Ala16Val foram observadas o aparecimento de diversas bandas como mostra a figura 6. Dessa forma foi realizado ajustes na metodologia alterando-se a temperatura de anelamento do *primer* e diminuindo a concentração de MgCl<sub>2</sub> para aumentar a estringência do *primer* (figura 6).

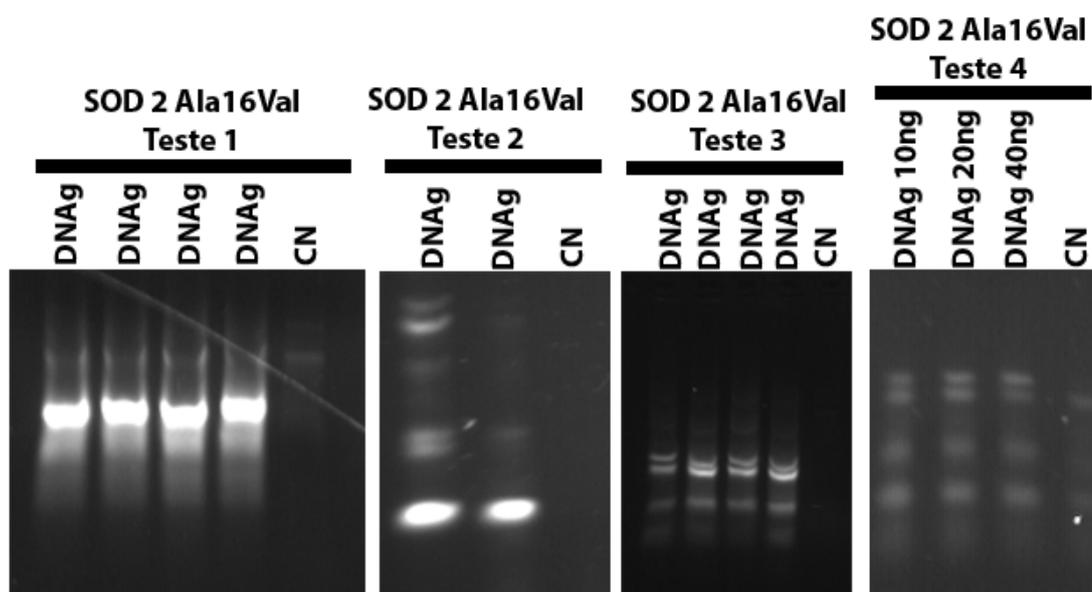


Figura 6: Produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD2 Ala16Val. Para as reações foi utilizado o DNAg 7. Cerca de 10  $\mu$ L do produto de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). Teste 1: temperatura de anelamento de 55°C; Teste 2: temperatura de anelamento de 60°C; Teste 3: temperatura de anelamento de 57°C; Teste 4: temperatura de anelamento de 65°C e 0,8 mM de MgCl<sub>2</sub>; CN: controle negativo.

Verificamos que a condição onde foi possível obter uma banda única de tamanho esperado foi aquela onde a temperatura de anelamento foi de 65°C e a

concentração de  $MgCl_2$  foi de 0,8mM. Sendo assim, foi feito a PCR com todas as amostras de DNAg extraídas e o produto de PCR foi purificado (figura 7). Embora para algumas amostras não tenha sido observado bandas no gel de agarose, todas as amostras apresentaram bandas no gel de poliácridamida, uma vez que para este gel realizou-se revelação com prata, que é uma coloração mais sensível e capaz de corar quantidades menores de DNA (Figura 7).

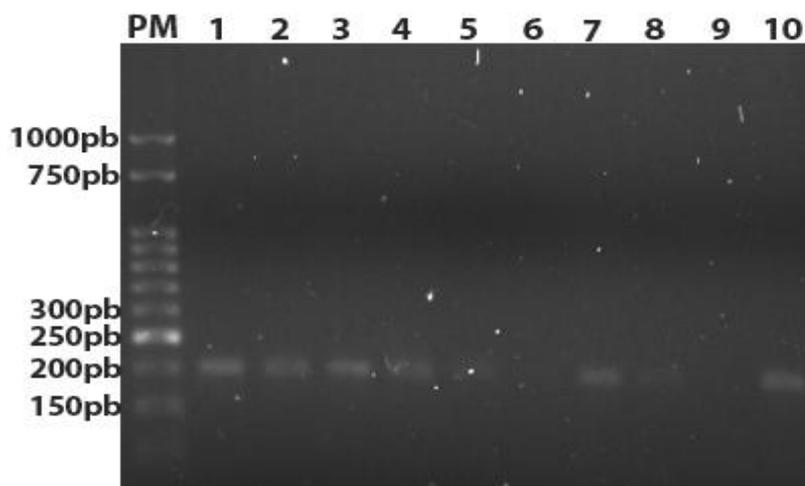


Figura 7: Produtos PCR purificados obtidos com o *primer SOD2 Ala16Val*. Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). PM: peso molecular 50pb (Ludwig biotec).

Para averiguar possíveis polimorfismos no gene desse enzimas nas amostras analisadas, o produto de PCR foi purificado e digerido com a enzima de restrição HaeIII (Figura 8). Para garantir que o protocolo foi eficiente, também foi realizada digestão de uma amostra de DNAg e juntamente com as amostras digeridas com enzima HaeIII foi analisada um produto de PCR purificado que não foi tratado coma enzima de restrição. Nós observamos que o tratamento com a enzima HaeIII foi eficiente uma vez que o DNAg foi totalmente digerido, além disso o produto de PCR purificado não tratado com a enzima de restrição apresentou perfil de bandas diferente, confirmando que a enzima HaeIII foi efetiva. Esperava-se as seguintes bandas de acordo com o genótipo: para Ala/Ala esperava-se duas bandas com tamanhos de 23 pb e 85 pb, para o genótipo Ala/Val esperava-se três bandas com tamanhos de 23 pb, 85 pb e 110 pb, e para o genótipo Val/Val esperava-se uma banda de 110 pb. Contudo, nós não observamos bandas polimórficas entre as amostras. Futuramente, os fragmentos de PCR serão sequenciados para confirmar esse resultado.

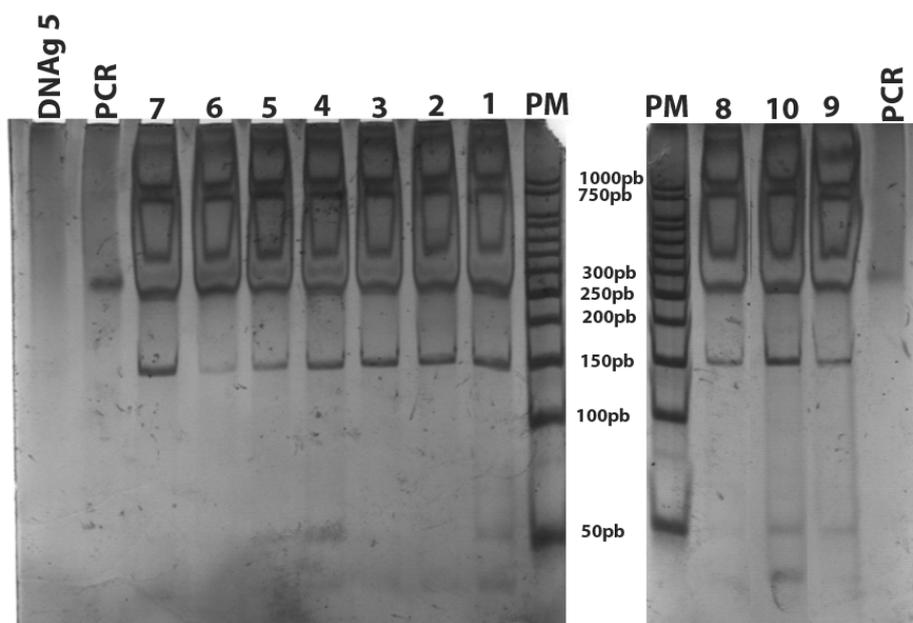


Figura 8: Produtos PCR purificados obtidos com o *primer* SOD2 Ala16Val e tratados com enzima de Restrição HaeIII. Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR digeridos foram aplicados em gel e poliacrilamida 10% e corados com prata. DNAg5: DNAg tratado com HaeIII; PCR: produto de PCR não tratado com HaeIII; PM: peso molecular 50pb (Ludwig biotec).

## 6.2 Padronização das reações de PCR com o *primer* SOD1 exon 3

A enzima SOD1 apresenta regiões polimórficas associadas a várias doenças, como esclerose lateral amiotrófica (BASKOYLU et al, 2018) e catarata (ZHANG et al, 2011). A enzima SOD1 se diferencia da enzima SOD2 pela sua localização celular, enquanto a SOD1 está localizada no citosol, a SOD2 é mitocondrial, além disso, as duas diferenciam-se quanto a presença de íons na sua estrutura, a SOD1 possui os íons cobre e zinco ligado as suas subunidades, sendo que este último íon promove a dimerização e estabilização da estrutura (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002), já a SOD2 possui o íon manganês em suas subunidades (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

Um dos polimorfismo na enzima SOD1 ocorre no intron 3, a 34 pares de bases a jusante do GT doador do exon 3. Esse polimorfismo é resultante da substituição de A/C (rs2234694) e está relacionado à atividade da SOD1, resultando em maiores atividades em indivíduos portadores do genótipo AA. Vários estudos sugeriram uma associação deste SNP com diferentes doenças, como diabetes, autismo e amiotrofia esclerose lateral (PALMIROTTA et al, 2015). O *primer* SOD1 exon 3 amplifica essa região polimórfica da enzima SOD1. A padronização da técnica de PCR para esse *primer* foi alcançada após várias tentativas onde a temperatura de anelamento foi

alterada para aumentar a estringência do primer, uma vez que várias bandas foram obtidas inicialmente como mostra a Figura 9. A padronização onde foi possível obter apenas uma banda do tamanho esperado foi onde utilizou-se 65°C como temperatura de anelamento. Após a padronização, foi realizada PCR com todas as amostras de DNAg e os produtos foram purificados. O resultado é mostrada na Figura 10. Os produtos purificados serão sequenciados para análise do polimorfismo dessa região do gene SOD1.

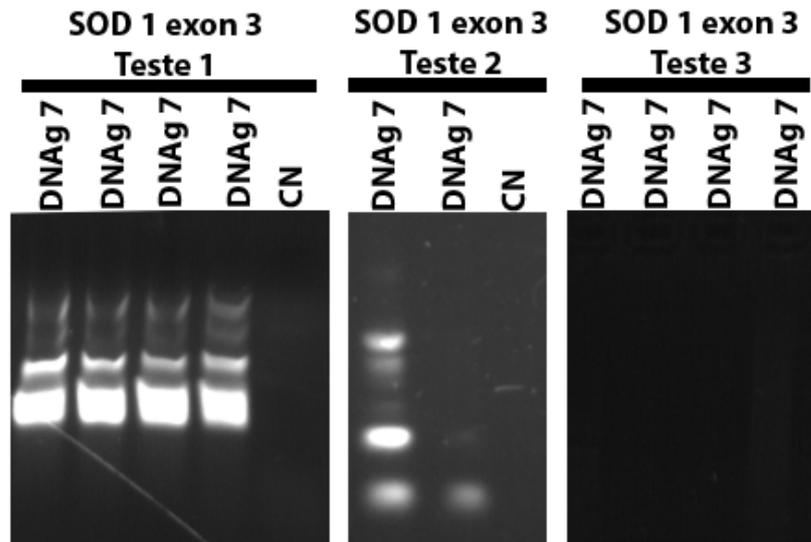


Figura 9: Produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD1 exon 3. Para as reações foi utilizado o DNAg 7. Cerca de 10  $\mu$ L do produto de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ /mL). Teste 1: temperatura de anelamento de 55°C; Teste 2: temperatura de anelamento de 60°C; Teste 3: temperatura de anelamento de 57°C; CN: controle negativo.

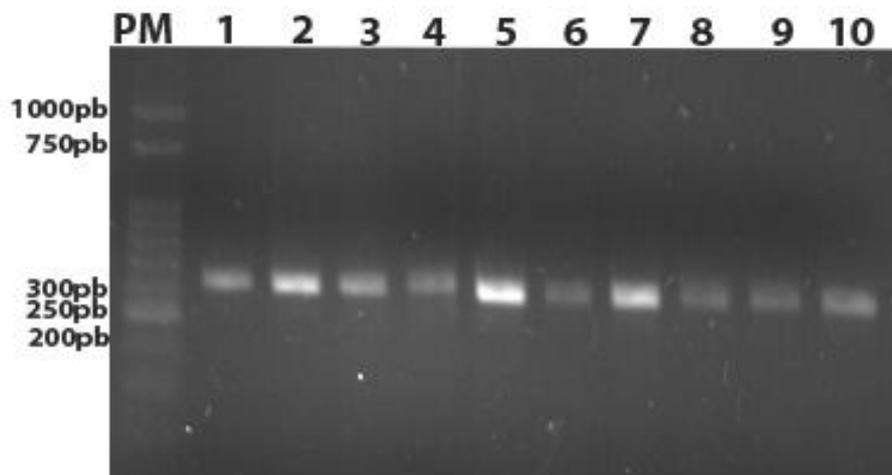


Figura 10: Produtos PCR purificados obtidos com o *primer SOD1* exon 3. Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). PM: peso molecular 50pb (Ludwig biotec).

#### 6.4 Padronização das reações de PCR com o *primer SOD1*

Outro polimorfismo analisado na enzima SOD1 foi a deleção de 50pb na região promotora do gene da *SOD1*. Essa deleção parece estar associada à diminuição da atividade promotora e, conseqüentemente, ao baixo nível de mRNA nas células, o que é causado pela perda de dois sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1 (ESKANDARI-NASAB et al, 2014). O primer utilizado gera o seguinte perfil de bandas em gel de agarose: um banda de 297pb quando o gene não tem a deleção e uma banda de 247pb quando o gene apresenta a deleção de 50pb (ESKANDARI-NASAB et al, 2014). A padronização da PCR com o *primer SOD1* foi iniciada com a temperatura de anelamento de 60°C. Foi obtida uma única banda quando analisado em gel de agarose (Figura 11), porém a nitidez da banda não foi satisfatória.

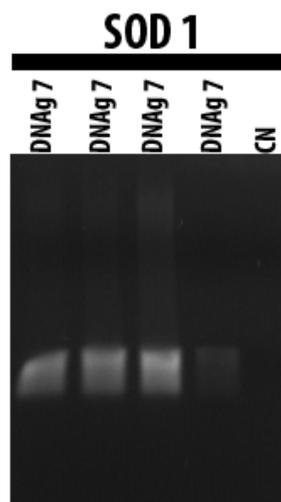


Figura 11: Produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD1. Para as reações foi utilizado o DNAg 7. Cerca de 10  $\mu$ L do produto de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). CN: controle negativo.

Para melhorar a qualidade da banda obtida foi realizada uma nova tentativa diminuindo a temperatura de anelamento para 55°C. Com essa alteração foi obtido um padrão de bandas esperado (Figura 12) onde indivíduos homozigóticos sem a deleção apresentaram uma banda única de 297pb, e indivíduos heterozigóticos apresentaram duas bandas, uma com 297pb e outra com 247pb. Nenhuma amostra apresentou perfil homozigótico para deleção de 50pb.

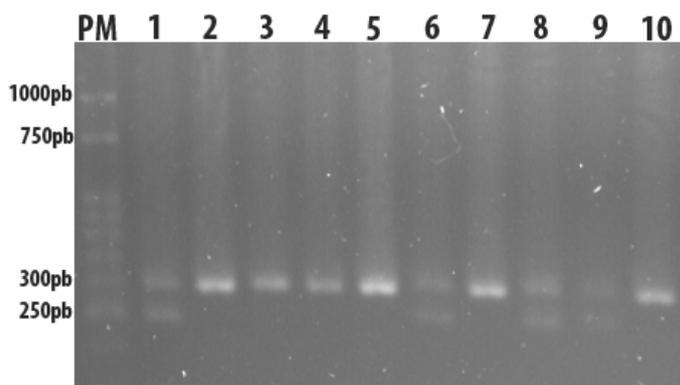


Figura 12: Produtos de PCR obtidos com o *primer* SOD1 e temperatura de anelamento de 55°C. Cerca de 10  $\mu$ L do produto de PCR foram aplicados em gel 3,0 % e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu$ mL). PM: peso molecular

Com o intuito de obter uma melhor separação das bandas e uma melhor resolução, os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 10% e corado com prata (Figura 13). O perfil de bandas obtidos no gel de pliacrilamida corroborou com o perfil de bandas obtido em gel de agarose, confirmando nossos resultados. Na

população analisada os indivíduos 1, 6, 8 e 9 apresentaram duas bandas , ou seja, 40% dos indivíduos foram classificados como heterozigótico. Os genótipos *SOD1* 50-pb Del / Del e Ins / Del, assim como o alelo Del, foram associados a um risco aumentado de doença cardiovascular (ESKANDARI-NASAB et al, 2014). Esse risco é relevante, visto que a SOD1 responde por ~ 85% do total da atividade celular entre as enzimas da família SOD em células de mamíferos e é altamente ativa nos rins e na parede vascular (NEVES et al, 2012) , desempenhando importante papel como mediador de doenças pós-iscêmicas no coração (MUKHERJEE et al, 2010) e que o aumento de SOD1 intracelular pode proteger o coração desta lesão (VERRETH et al, 2007). Logo, qualquer comprometimento na sua atividade pode provocar importantes perturbações no equilíbrio oxidativo, já que corresponde com uma grande parcela da atividade celular entre as isoenzimas SOD.

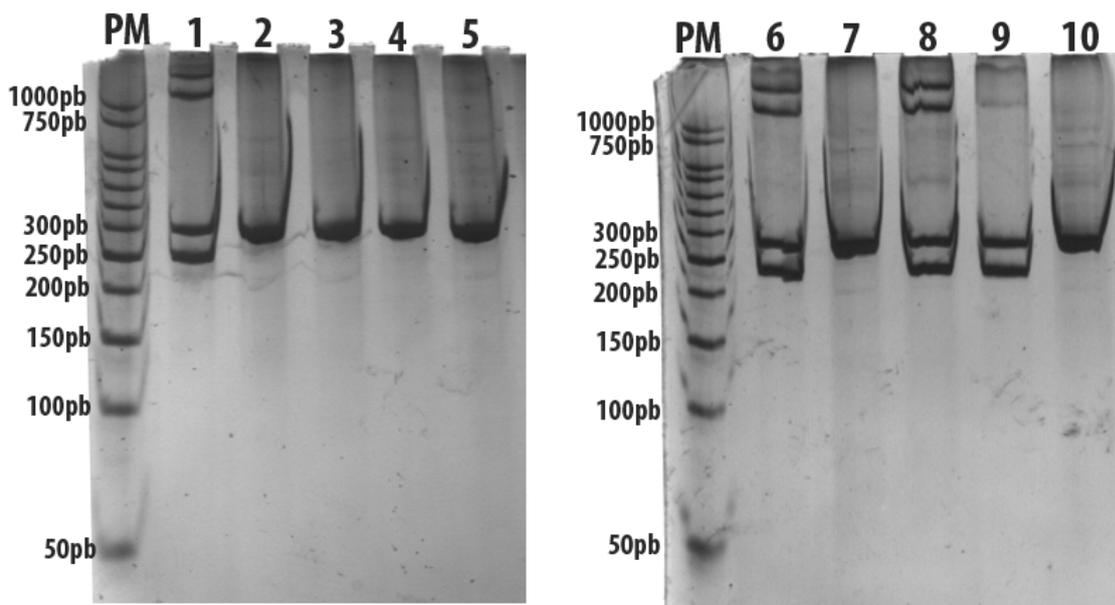


Figura 13: Produtos PCR obtidos com o *primer* SOD1 . Cerca de 10  $\mu$ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel e poliacrilamida 10% e corados com prata. PM: peso molecular 50pb (Ludwig biotec).

## 7 CONCLUSÃO

Esse trabalho identificou a presença de polimorfismos por meio das técnicas de PCR e RFLP nos genes que codificam as enzimas SOD 1 e 2, em um grupo amostral de moradores de Ouro Preto, com um perfil heterozigótico para a banda de deleção de 50-pb para o *SOD1*, sendo que este polimorfismo pode estar associado ao risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Esse resultado reforça a importância de estudos de triagem a fim de reduzir morbidades associadas a doenças cardiovasculares e permitir o monitoramento mais precoce de fatores preditivos.

## **8 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Posteriormente os polimorfismos gênicos em *SOD1* e *2* serão analisados por sequenciamento e uso de enzimas de restrição (*BSrGI*, *Taq I* e *HinfI*) para os produtos de PCR obtidos com os primer 5'UTR, 3'UTR e intron 2. Espera-se que este presente trabalho possa colaborar futuramente para nosso grupo de pesquisa no estabelecimento e desenvolvimento de relações de alterações polimórficas com distúrbios metabólicos.

## REFERÊNCIAS

- AIYAR, A., *The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. Methods Mol Biol*, 2000. 132: p. 221-41.
- ALAVI, A., NAFISSI, S., ROHANI, M., ZAMANI, B., SEDIGHI, B., SHAMSHIRI, H., FAN, J.B., RONAGHI, M. and ELAHI, E., 2013. Genetic analysis and SOD1 mutation screening in Iranian amyotrophic lateral sclerosis patients. **Neurobiology of aging**, 34(5), pp.1516-e1.
- ALMEIDA, P.S. and SADDI, V.A., 2007. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real Monitoring minimal residual disease in chronic myeloid leukemia by real time PCR. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 29(4), pp.382-386.
- ALVES, A.G., 2011. MUTAÇÕES DO GENE SOD-1 (SUPERÓXIDO DISMUTASE 1) NA FORMA FAMILIAR DA ESCLEROSE AMIOTRÓFICA LATERAL: REVISÃO SISTEMÁTICA.
- ARTHUR, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1825–1835.
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.
- BARBOZA, N. R. "Caracterização de consórcio e isolados bacterianos associados a biorremediação do manganês." (2015).
- BASKOYLU, S.N., YERSAK, J., O'Hern, P., Grosser, S., Simon, J., Kim, S., Schuch, K., Dimitriadi, M., Yanagi, K.S., Lins, J. and Hart, A.C., 2018. Single copy/knock-in models of ALS SOD1 in *C. elegans* suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. **PLoS genetics**, 14(10), p.e1007682.
- BENNETT DA, WILSON RS, SCHNEIDER JA, *et al.* Apolipo-protein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. **Neurology** 2003; 60: 246-52.
- BERMANO, G., *et al.*, 2007. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. **Genes Nutr.** 2, 225–232.

- BICA, C.G., *et al.*, 2009. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. **Pathol. Oncol. Res.** 15, 19–24.
- BORIE C, GASPARINI F, VERPILLAT P, *et al.* French Parkinson's disease genetic study group. Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. **J Neurol** 2002; 249: 801-4.
- BOROUMAND, F., Mahmoudinasab, H. and SAADAT, M., 2018. Association of the SOD2 (rs2758339 and rs5746136) polymorphisms with the risk of heroin dependency and the SOD2 expression levels. **Gene**, 649, pp.27-31.
- CAMPANDELLI, F.L., RODRIGUES, D.A., MARTINS, J.V.M., COSTA, I.R., Lagares, M.H., BARBOSA, A.M. and MOURA, K.K.V.O., 2017. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. **Genetics and molecular research: GMR**, 16(2).
- CRAWFORD, A., FASSETT, R.G., GERAGHTY, D.P., KUNDE, D.A., BALL, M.J., ROBERTSON, I.K. and COOMBES, J.S., 2012. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. **Gene**, 501(2), pp.89-103.
- DE CHAMPLAIN, Jacques *et al.* Oxidative stress in hypertension. **Clinical and experimental hypertension**, v. 26, n. 7-8, p. 593-601, 2004.
- DE SÁ CAVALCANTI, J.L. and ENGELHARDT, E., 2012. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. **Rev Bras Neurol**, 48(4), pp.21-29.
- DEXTER, D.T. and JENNER, P., 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, 62, pp.132-144.
- EFTEKHARI, A., PEIVAND, Z., SAADAT, I. and Saadat, M., 2018. Association between Genetic Polymorphisms in Superoxide Dismutase Gene Family and Risk of Gastric Cancer. **Pathology & Oncology Research**, pp.1-5.
- EL-FAR, M.A., BAKR, M.A., FARAHAT, S.E., ABD EL-FATTAH, E.A., 2005. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. **Clin. Exp. Nephrol.** 9, 127–131
- ESKANDARI-NASAB, E., KHARAZI-NEJAB, E., NAKHAE, A., AFZALI, M., TABATABAEI, S.P., TIRGAR-FAKHERI, K. and HASHEMI, M., 2014. 50-bp Ins/Del

polymorphism of SOD1 is associated with increased risk of cardiovascular disease. *Acta Medica Iranica*, 52(8), pp.591-595.

- FATTMAN, C.L., Schaefer, L.M. and Oury, T.D., 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), pp.236-256.
- GARCIA, F.C.B., dos Santos, S.S.R., Chociay, M.F., Medeiros, Â.C.R. and Roselino, A.M.F., 2005. PP014-Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo-mucosas Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar. *An Bras Dermatol*, 80(Supl 3), pp.S339-44.
- GHEZZI, P., Jaquet, V., Marcucci, F. and Schmidt, H.H., 2017. The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *British journal of pharmacology*, 174(12), pp.1784-1796.
- GOTTIEB, M.G., Schwanke, C.H., Santos, A.F., Jobim, P.F., Mussel, D.P., da Cruz, I.B., 2005. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet. Mol. Res.* 4, 691–703.
- GRAMMER TB, Renner W, Hoffmann MM, *et al.* SOD3 R231G polymorphism associated with coronary artery disease and myocardial infarction. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Free Radic Res.* 2009;43(7):677- 684. <https://doi.org/10.1080/10715760902991763>
- GRATAS-DELAMARCHE, A., Derbré, F., Vincent, S. and Cillard, J., 2014. Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory loop. *Free radical research*, 48(1), pp.93-108.
- GRIESS B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic Biol Med.* 2017;112(August):464-479.
- GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(4):561-4.
- HAMANISHI, T., *et al.*, 2004. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness

of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2455–2460.

- HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol** 11: 298–300, 1956
- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Card** 2005;84(Suppl I):1S-28.
- KANESHIMA, E.N., Bidoia, C.C.D.G., Gabriel, M., Suzuki, L.E. and Consolaro, M.E.L., 2001. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta sci**, 23(3), pp.731-737.
- KWON, M.J., BAEK, W., Ki, C.S., KIM, H.Y., Koh, S.H., KIM, J.W. and KIM, S.H., 2012. Screening of the SOD1, FUS, TARDBP, ANG, and OPTN mutations in Korean patients with familial and sporadic ALS. **Neurobiology of aging**, 33(5), pp.1017-e17.
- LEVIN, E. D.; BRUCATO, F. H.; CRAPO, J. D. Molecular overexpression of extracellular superoxide dismutase increases the dependency of learning and memory performance on motivational state. **Behav. Genet.** 30:95–100; 2000.
- LI, J., LUO, J., LIU, L., FU, H. and TANG, L., 2018. The genetic association between apolipoprotein E gene polymorphism and Parkinson disease: A meta-Analysis of 47 studies. **Medicine**, 97(43), p.e12884.
- LUCKING CB, CHESNEAU V, LOHMANN E, *et al.* Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. **Arch Neurol.** 2003; 60: 1253-6
- MATÉS, J.M., PÉREZ-GÓMEZ, C. and DE CASTRO, I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical biochemistry**, 32(8), pp.595-603.
- MCNULTY, Hyesun; JACOB, Robert F.; MASON, R. Preston. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. **The American journal of cardiology**, v. 101, n. 10, p. S20-S29, 2008.
- NAGANUMA, T., NAKAYAMA, T., SATO, N., FU, Z., SOMA, M., AOI, N. and USAMI, R., 2008. A haplotype-based case-control study examining human extracellular superoxide dismutase gene and essential hypertension. **Hypertension Research**, 31(8), p.1533.

- NEVES, A.L., MOHAMMEDI K., EMERY, N., ROUSSEL, R., FUMERON, F., MARRE, M. and VELHO, G., 2012. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene and renal and cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetic subjects. **Molecular genetics and metabolism**, *106*(3), pp.359-365.
- NOMIYAMA, T., *et al.*, 2003. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. **J. Hum. Genet.** 48, 138–141.
- NWOSE, E.U., JELINEK, H.F., RICHARDS, R.S. and KERR, P.G., 2008. The ‘vitamin E regeneration system’(VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes—A hypothesis. **Medical hypotheses**, *70*(5), pp.1002-1008.
- OHARA, Y.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J. Clin. Invest.** 91:2546–2551; 1993.
- ORIGONE, P., CAPONNETTO, C., VERDIANI, S., MANTERO, V., CICHERO, E., FOSSA, P., BELLONE, E., MANCARDI, G. and MANDICH, P., 2012. T137A variant is a pathogenetic SOD1 mutation associated with a slowly progressive ALS phenotype. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, *13*(4), pp.398-399.
- PALACE, V.P., KHAPER, N., QIN, Q. and SINGAL, P.K., 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, *26*(5-6), pp.746-761.
- PALMIROTTA, R., BARBANTI, P., DE MARCHIS, M.L., EGEO, G., AURILIA, C., FOFI, L., IALONGO, C., VALENTE, M.G., FERRONI, P., DELLA-MORTE, D. and GUADAGNI, F., 2015. Is SOD2 Ala16Val polymorphism associated with migraine with aura phenotype?.
- PASCOTINI, M.E.T., FLORES, A.E., KEGLER, M.A., KONZEN, M.V., FOMARI, M.A.L., AREND, M.J., GABBI, M.P., GOBO, M.L.A., BOCHI, G.V., PRADO, A.L.C. and de CARVALHO, L.M., 2018. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels are Lower in Chronic Stroke Patients: A Relation with Manganese-dependent Superoxide Dismutase ALA16VAL Single Nucleotide Polymorphism through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Caspases

Pathways. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(11), pp.3020-3029.

- PASINELLI P, BROWN RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:710–723
- PEREIRA, G.R.C., DA SILVA, A.N.R., DO NASCIMENTO, S.S. and DE MESQUITA, J.F., 2018. In silico analysis and molecular dynamics simulation of human superoxide dismutase 3 (SOD3) genetic variants. *Journal of cellular biochemistry*.
- RHEE, S.G., YANG, K.S., KANG, S.W., WOO, H.A., CHANG, T.S., 2005. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 619–626.
- ROWLAND LP, SHNEIDER NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 344(22):1688-1700, 2001.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. and FRITSCH, E.F. , *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor. 1989
- SBAROUNI, E., GEORGIADOU, P., KREMASTINOS, D.T. and VOUDRIS, V., 2008. Ischemia modified albumin: is this marker of ischemia ready for prime time use. *Hellenic J Cardiol*, 49(4), pp.260-266.
- SPALVIERI, M.P. and ROTENBERG, R.G., 2004. Medicina genómica: Aplicaciones del polimorfismo de un nucleótido y micromatrices de ADN. *Medicina (Buenos Aires)*, 64(6), pp.533-542.
- STOIMENOV, T.J., Despotovic, M., Stojanovic, S., Basic, J. and Pavlovic, D., 2017. Polymorphic variants of antioxidative defense enzymes and their gene-gene epistatic interactions in systemic lupus erythematosus patients. *Clinical rheumatology*, 36(9), pp.2019-2026.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(Database):D158-D169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>
- UDLER, M., *et al.*, 2007. Common germline genetic variation in antioxidant defense genes and survival after diagnosis of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 3015–3023.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M. and TELSER, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 39(1), pp.44-84.
- VERRETH, W., DE KEYZER, D., DAVEY, P.C., GEERAERT, B., MERTENS, A., HERREGODS, M.C., SMITH, G., DESJARDINS, F., BALLIGAND, J.L. and HOLVOET, P., 2007. Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. **British journal of pharmacology**, 151(3), pp.347-355.
- VOETSH, B., *et al.*, 2007. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke* 38, 41–49.
- WIENER, H.W., PERRY, R.T., CHEN, Z., HARRELL, L.E. and GO, R.C.P., 2007. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. **Genes, Brain and Behavior**, 6(8), pp.770-776.
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit
- YONG, X.U., PORNTADAVITY, S. and ST CHAIR, D.K., 2002. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). **Biochemical Journal**, 362(2), pp.401-412.
- ZANOTELI E, PERES ANA, OLIVEIRA ASB, GABBAI AA. Biologia molecular nas doenças do neurônio motor, **Rev. Neurociência**. Vol.12. n 1, 2004.
- ZELKO IN, MARIANI TJ, FOLZ RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**. 2002;33(3):337-349. <https://doi.org/10.1017/S0272263113000454>
- ZHANG, Y., ZHANG, L., SUN, D., LI, Z., WANG, L. and LIU, P., 2011. Genetic polymorphisms of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in age-related cataract. **Molecular vision**, 17, p.2325.
- ZHOU, X.F., *et al.*, 2005. Polymorphisms in the promoter region of catalase gene and essential hypertension. *Dis. Markers* 21, 3–7.



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

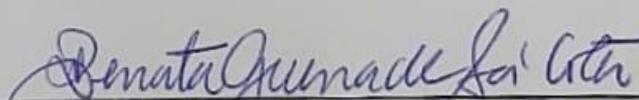
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente **Gabriel José Lucas Moreira**, número de matrícula 13.2.2233, defendeu a Monografia intitulada "**Avaliação dos polimorfismos nas isoformas 1 e 2 da enzima superóxido dismutase em uma população amostral de Ouro Preto, Minas Gerais**", em 30 de Novembro de 2018 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 13/12/2018

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota  
Orientadora  
(DECBI-ICEB-UFOP)