

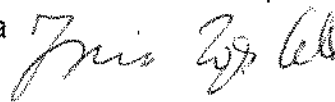
Flávia Chagas Costa

**"ASPECTOS MOLECULARES DAS
ATAXIAS ESPINOCEREBELARES
AUTOSSÔMICAS RECESSIVAS"**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Flávia Chagas Costa**.

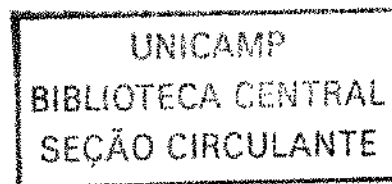
Campinas, 20 de abril de 2000.

Profa. Dra. Íscia Teresinha Lopes Cendes
Orientadora



Campinas

Abril de 2000



Flávia Chagas Costa

**"ASPECTOS MOLECULARES DAS ATAXIAS
ESPINOCEREBELARES AUTOSSÔMICAS RECESSIVAS"**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientação: Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes

FCM - UNICAMP

Abril de 2000

Apoio: FAPESP e FAEP - Unicamp

UNIDADE	FC
Nº CHAMADA	UNICAMP
C823a	
V	EX
COMBO	BC/ 61672
PROC.	16- 86-05
C	☐
D	☒
REÇO	12.02
ATA	03-12-105
* CPD	

ibid 338218

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C823a Costa, Flávia Chagas
"Aspectos moleculares das ataxias espinocerebelares autossômicas recessivas" / Flávia Chagas Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2000.
Orientador : Iscia Lopes Cendes
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
1. Vitamina E. 2. *Neurodegeneração (doença). 3. Ataxia. I. Iscia Lopes Cendes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Kok -

2. Prof. Dr. Benito Pereira Damasceno -

3. Profa. Dra. Íscia Teresinha Lopes Cendes -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20.04.2000

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, pela oportunidade de realização deste sonho.

As amigas Tereza e Heliane, pessoas fundamentais neste trabalho, pelos ensinamentos, estímulos e principalmente amizade.

A Solange pela grande ajuda com os heredogramas, técnicas e por todo os momentos de amizade e companheirismo.

A Maria Eugênia, Maria Francisca e Marilza pela ajuda, amizade e compreensão nas horas necessárias.

Aos colegas do laboratório e do departamento, pelo incentivo e momentos de descontração.

A todos os neurologistas de outros centros, meus sinceros agradecimentos pela contribuição com as amostras enviadas.

A Cristina Rosa, pela grande amizade, carinho e compreensão.

A toda minha família, por tudo.

Aos meus pais Lúcio e Regina, e meu irmão
Leonardo, pela dedicação e compreensão,
sobretudo, por me ensinarem a viver.

*"Não se substitui o amor, ou a suavidade, ou a
ternura, ou a compreensão por coisas materiais"
(Morrie Schwartz)*

SUMÁRIO**LISTA DE ABREVIATURAS****RESUMO**

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 - As Ataxias Espinocerebelares	2
1.2 - Caracterização Molecular da Ataxia de Friedreich	5
1.3 - Caracterização Molecular da ataxia com deficiência de Vitamina E	9
2 – ASPECTOS ÉTICOS	11
3 - OBJETIVOS	13
4 - CASUÍSTICA E METODOS	15
4.1 - Casuística	16
4.2 - Análise Estatística	18
4.3 – Análise Molecular	19
4.3.1 - Extração do DNA genômico	19
4.3.2 - Genotipagem do triplete (GAA) _n contido no gene $\chi 25$	20
4.3.3 - Genotipagem das mutações do gene α -TTP	25
5 - RESULTADOS	28
5.1 - Freqüência, genótipo e padrão de herança dos pacientes com AF	29
5.2 - Características moleculares dos alelos (GAA) _n normais e expandidos	32
5.3 - Genotipagem das mutações no gene α -TTP	38
6 - DISCUSSÃO	44
7 - CONCLUSÕES	50

8 - SUMMARY	53
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9 - ANEXOS	69
Anexo 1: Heredogramas dos pacientes com ataxia espinocerebelar incluídos no estudos ...	70
Anexo 2: Formulário clínico utilizado na avaliação dos pacientes	85
Anexo 3: Formulário de consentimento para pesquisa médica	87

SUMÁRIO DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Mutações de ponto descritas para AF.....	8
Tabela 2: Mutações descrita no gene α -TT, responsáveis pela ADVE	10
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para a genotipagem do triplete (GAA) _n	24
Tabela 4: <i>Primers</i> utilizados para detecção das mutações no gene α -TTP	27
Tabela 5: Dados demográficos e características moleculares das pacientes positivos para a mutação AF	31
Figura 1: Esquema ilustrativo das fórmulas utilizadas para o cálculo dos tamanhos dos fragmentos (GAA) _n normais e expandidos	23
Figura 2: Alelos (GAA) _n normais na população controle	33
Figura 3: Alelos (GAA) _n normais e expandidos utilizando o par de primer 2500F e GAA104F..	34
Figura 4: Alelos (GAA) _n normais utilizando o par de primer GAA-F e GAA-R	35
Figura 5: Correlação entre o tamanho do alelo (GAA) _n expandido menor em cromossomos AF de nove indivíduos afetados, com a idade de início da doença (Coeficiente de correlação de "Pearson" $r = -0,7$; $r^2 = 0,49$; $p = 0,037$)	36
Figura 6: Correlação entre o tamanho do alelo (GAA) _n expandido maior em cromossomos AF de nove indivíduos afetados, com a idade de início da doença (Coeficiente de correlação de "Pearson" $r = -0,6$; $r^2 = 0,35$; $p = 0,093$)	37
Figura 7: Amplificação do éxon 1 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex1D e Ex1R	39
Figura 8: Amplificação do éxon 2 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex2D e Ex2R	40

Figura 9: Amplificação do éxon 3 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex3D e Ex3R	41
Figura 10: Amplificação do éxon 4 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex4D e Ex4R	42
Figura 11: Amplificação do éxon 5 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex5D e Ex5R	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: Ataxias Espinocerebelares

AR: Ataxia Espinocerebelar Autossômica Recessiva

AF: Ataxia de Friedreich

ADVE: Ataxia com Deficiência de Vitamina E

IOSCA: Infatile Onset Spinocerebellar Ataxia

GAA: Repetição trinucleotídica (Guanina, Adenina, Adenina)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorphism

9q13-q21.1: Braço longo do cromossomo 9, na região 13 a 21.1

Kb: Kilobases

8q13.1-q13.3: Braço longo do cromossomo 8, na região 13.1 a 13.3

RPM: Rotações por minuto

RSB: Tampão a base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio.

µl: Microlitro

ml: Mililitro

SDS: Lauril Sulfato de Sódio

mg: Micrograma

°C: Graus Celsius

TE: Tampão a base de

PCR: Polimerase Chain Reaction

ng: Nanogramas

mM: Milimolar

pmol: Picomol

μM: Micromolar

V: Volts

bp: Base pair (pares de bases)

SSCP: Single Strand Conformation Polimorphism

Taq®: DNA polimerase *Termus aquaticus*

μCi: Micro Curie

α-[P³³]: Fósforo α32 (Dinucleotídeo marcado radioativamente)

dNTP: Deoxi Nucleotídeo Trifosfato

dATP: Deoxi Adenosina Trifosfato

dCTP: Deoxi Citosina Trifosfato

dGTP: Deoxi Guanina Trifosfato

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

DMSO: C₂H₆SO metil sulfoxido

RESUMO

As ataxias espinocerebelares (AEC) formam um grupo heterogêneo de doenças degenerativas que envolvem o sistema nervoso central. Esse grupo se caracteriza clinicamente por apresentar disfunção cerebelar manifestada por ataxia de marcha, incoordenação e disartria. Nos casos familiares, o padrão de herança é variável, podendo ser compatível com herança autossômica dominante (HAD) ou herança autossômica recessiva (HAR).

Para as ataxias espinocerebelares com HAR existem três loci identificados até o momento: ataxia de Friedreich (AF) no cromossomo 9q; ataxia com deficiência de vitamina E (ADVE) no cromossomo 8q, e uma forma muito rara de início da infância, IOSCA (Infantile Onset Spinocebellar Ataxia) no cromossomo 10q.

A maioria dos casos de AF é causada por uma expansão em homozigose do trinucleotídeo (GAA)_n localizado no primeiro intron do gene *λ25*. Esse gene codifica uma proteína de 210 aminoácidos denominada de *Frataxina*, com alvo mitocondrial. Alelos normais variam de sete a 30 unidades (GAA)_n enquanto que alelos expandidos variam de 100 a 1700 (GAA)_n.

A ADVE é clinicamente semelhante à AF, sendo que a maneira mais confiável de realizar o diagnóstico diferencial entre essas duas formas de ataxia é através da análise molecular. A ADVE é causada por mutações de vários tipos encontradas no gene *α-TTP*, que codifica a *proteína transportadora do alfa-tocoferol*, com 278 aminoácidos. Pelo menos 13 tipos de mutações foram descritas até o momento.

Neste estudo, foram genotipados 97 indivíduos pertencentes a 58 famílias não relacionadas. Uma frequência de 15% de indivíduos afetados com a mutação AF foi encontrada

em nossa população. Nenhuma mutação no gene α -TTP foi encontrada pela técnica de triagem escolhida, a SSCP.

Este é um estudo pioneiro no Brasil, onde estudamos a frequência das mutações responsáveis pelas ataxias espinocerebelares com HAR, determinamos as características das mutações encontradas e realizamos estudos de correlação entre o genótipo e características fenotípicas desses pacientes.

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – As ataxias Espinocerebelares

As ataxias espinocerebelares (AEC) formam um grupo heterogêneo de doenças degenerativas do sistema nervoso central (ARRUDA & TEIVE, 1997). Clinicamente esse grupo de doenças é caracterizado por disfunção cerebelar manifestada por ataxia da marcha, incoordenação e disartria (GREENFIELD, 1954). A herança genética é variável, sendo que, nos casos de início precoce (antes da segunda década de vida) verificamos geralmente um padrão de herança autossômico recessivo (HAR), enquanto que nos casos de início adulto, o padrão de herança é geralmente autossômico dominante (HAD) (HARDING, 1984). Atualmente, encontramos descritas na literatura pelo menos 13 tipos de HAD, dentre as quais podemos citar como exemplo: a *Doença de Machado-Joseph* ou *SCA3 (Spinocerebellar ataxia type three)*, *Atrofia Dentatorubropalidolouisiana* ou *DRPLA* e as *Spinocerebellar ataxia*, que são classificadas de acordo com os tipos de quadros clínicos, variando da *SCA1 (Spinocerebellar ataxia type one)* até o tipo 12 (*SCA12*). As HAD apresentam como principal característica clínica o início dos sintomas em fase tardia da vida, geralmente ao redor dos 20 à 40 anos de idade. Quase todas são causadas por expansões de trinucleotídeos (CAG)_n, com exceção da *SCA8* cujo triplete envolvido é o (CTG)_n, instáveis durante a transmissão genética (ROSS, 1995).

Para as HAR, Até o momento, existem quatro *locus* mapeados: ataxia de Friedreich (AF) no cromossomo 9q, ataxia com deficiência de vitamina E (ADVE) no cromossomo 8q, e duas formas raras, uma descrita somente na população finlandesa, a ataxia espinocerebelar de início na infância, chamada de “*Infantile Onset Spinocerebellar Ataxia*” ou IOSCA, no cromossomo 10q (NIKALI, *et al*, 1995; LÖNNQVIST, *et al*, 1998) e a outra a ataxia telangiectasia, no cromossomo 11q (STRACHAN, READ, 1996). Todas essas formas de ataxia cerebelar com HAR têm curso progressivo, levando a um severo comprometimento físico e morte prematura. Existe, no entanto, uma considerável variabilidade clínica quanto à progressão da doença e sobrevida (KLOCKGETHER, *et al*, 1998).

A AF foi inicialmente descrita na Alemanha, por *Nicolaus Friedreich*, no início do século XIX, como uma atrofia degenerativa dos cordões posteriores da medula espinhal (MONTERMINI, *et al*, 1997). No entanto, somente em 1863 essa enfermidade foi aceita como uma entidade clinicamente distinta, recebendo a denominação de “*Doença de Friedreich*” ou “*Ataxia de Friedreich*” (CHAMBERLAIN, SHAW, ROWLAND, 1988). Os estudos pioneiros de *Nicolaus Friedreich* descreveram nove pacientes que possuíam idade de início dos sintomas ao redor da puberdade, com disartria e fraqueza muscular progressiva (DE MICHELE, *et al*, 1994). Posteriormente, outros sintomas, como escoliose, deformidade dos pés e cardiomiopatias foram observados. Hoje sabemos que as características clínicas principais da AF são: ataxia de marcha, incoordenação motora e disartria (JOHNSON, 1995). Os pacientes com AF costumam apresentar também anormalidades fora do sistema nervoso central, tais como: diabetes, possivelmente relacionada com uma deficiência pancreática,

alteração da condução cardíaca e deformidades esqueléticas levando a escoliose e pés cavus (DÜRR, *et al*, 1996). A doença progride lentamente, acarretando ao paciente uma total incapacidade física e morte. A *causa mortis* mais freqüente é por alteração da condução cardíaca (COSSEE, *et al*, 1997).

Exames neuropatológicos em pacientes com AF revelam degeneração nos neurônios da base do gânglio dorsal e dos tratos espinocerebelar e cortico-espinhal, da medula espinhal (WALLACE, *et al*, 1995).

A ataxia com deficiência de vitamina E (ADVE), foi primeiramente descrita em 1981 em um paciente com deficiência dessa vitamina e sem qualquer anormalidade gastrointestinal ou má absorção lipídica (BURCK, *et al*, 1981). Posteriormente, foram observados outros pacientes com uma condição clínica semelhante, caracterizando a síndrome da deficiência isolada de vitamina E familiar (TRABER, *et al*, 1990). Em 1988 foi descrita uma família tunisiana, onde, os três indivíduos afetados, possuíam sintomas muito semelhantes ao da AF, caracterizando a ADVE como uma forma clínica variante da doença de Friedreich. Foi observado posteriormente que, a maior parte das famílias com ADVE pertenciam à região da Bacia Mediterrânea, com um grande agregado na Tunísia, indicando a presença de um possível efeito fundador nessa população (BELAL, *et al*, 1995).

A prevalência das ataxias espinocerebelares com HAR é de aproximadamente um caso por 50.000 indivíduos e a freqüência de portadores de um para 120 indivíduos na população européia (MONRÓS, *et al*, 1997). Não existem dados epidemiológicos sobre a prevalência das ataxias espinocerebelares com HAR na população brasileira.

1.2 – Caracterização Molecular da Ataxia de Friedreich

Na década de 80, estudos de ligação mapearam o locus para a AF na região centromérica do cromossomo 9, utilizando marcadores de DNA do tipo “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” ou *RFLP*, inicialmente entre os marcadores D9S887 (proximal) e D9S886 (distal) em um intervalo de 300 quilobases (kb) (DUCLOS, *et al*, 1994). A região foi reduzida para 150 kb com o uso de um novo marcador, F8101 (MONTERMINI, *et al*, 1995). Em 1996, o gene responsável pela AF foi clonado através da estratégia da clonagem posicional, possibilitando então a realização da análise molecular para esta doença (CAMPUZANO, *et al*, 1996).

A AF é causada por uma mutação dinâmica, caracterizada pela expansão do trinucleotídeo (GAA)_n, localizada no primeiro íntron (porção não codificadora) do gene χ 25 (PANDOLFO, 1999). Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 9, mais precisamente na posição q13-q21.1, apresentando sete exons com tamanho total de 95 kb. O gene χ 25 codifica uma proteína relativamente pequena, com 210 aminoácidos, denominada *Frataxina*, que mostra expressão nas áreas afetadas pela doença (PANDOLFO, 1999; CARVAJAL, *et al*, 1996). Essa proteína tem alvo mitocondrial, agindo no mecanismo de regulação da concentração do ferro na mitocôndria (KAPLAN, 1999). Uma disfunção mitocondrial tem sido amplamente sugerida para a AF, devido ao fato da mitocôndria ter uma relevância especial nos três órgãos mais afetados pela doença, isto é, sistema nervoso, coração e pâncreas (CERDARBAUM, BLASS, 1996). No sistema nervoso, a *frataxina* tem grande

expressão na medula espinhal, uma expressão média no cerebelo e baixa no córtex . Fora do sistema nervoso, se expressa com níveis intermediários no pâncreas e músculo esquelético, e tem grande expressão no tecido cardíaco (PRILLER, *et al*, 1997).

O triplete envolvido na AF possui três características únicas: 1) envolve o trinucleotídeo (GAA)_n; 2) está localizada em um íntron e 3) é presente em doença com HAR (PALAU, *et al*, 1995).

Aproximadamente 95% dos pacientes com AF são homozigotos para a expansão do trinucleotídeo (GAA)_n (LEGGO, *et al*, 1997), ou seja, apresentam dois alelos com grandes expansões do trinucleotídeo (GAA)_n (HURKO, 1997; COSSÉE, *et al*, 1997; SCHWARTZ, *et al*, 1999). Somente um pequeno número de indivíduos afetados, cinco por cento, apresentam um alelo (GAA)_n expandido e o outro alelo de tamanho normal contendo mutações pontuais na região C-terminal da proteína frataxina (GRAY, JOHNSON, 1997). Até o momento, existem vários tipos de mutações descritas na literatura, sendo as oito principais ilustradas na *Tabela 1* (BARTOLO, MENDELL, PRIOR, 1998; COSSÉE, *et al*, 1999). Não existem registros na literatura sobre pacientes homozigotos para uma das mutações pontuais descritas. Este fato leva a crer que a ocorrência de uma mutação pontual em homozigocidade pode ser letal em estágios iniciais do embrião (FORREST, *et al*, 1998; BIDICHANDANI, ASHIZAWA, PATEL, 1997).

O tamanho do triplete (GAA)_n em indivíduos normais é de sete a 30 repetições, enquanto que os indivíduos afetados, possuem cerca de 200 até 1700 (GAA)_n (LAMONT, DAVIS, WOOD, 1997). Alguns estudos evidenciam a existência de uma correlação inversa

entre a idade de início da doença e o tamanho das expansões (GAA)_n. Indivíduos que possuem alelos com grandes repetições do trinucleotídeo (GAA)_n apresentam quadros mais severos da doença, enquanto que aqueles que possuem pequenas repetições, apresentam uma forma mais branda da doença (WILSON, ROOF, 1997). Outros relatos na literatura não encontraram associação significativa entre o tamanho do segmento (GAA)_n e a idade de início ou gravidade da doença (DELATYCKI, *et al*, 1998).

Os alelos (GAA)_n de tamanho normal são estáveis durante a transmissão de uma geração a outra. Já o alelo expandido, apresenta uma grande instabilidade durante a transmissão (MONTERMINI, *et al*, 1997; SCHÖLS, *et al*, 1997). Análises realizadas em familiares de pacientes portadores da AF demonstram que nas transmissões maternas do alelo (GAA)_n expandido podem ocorrer contrações ou expansões com igual frequência, enquanto que, nas transmissões paternas quase sempre ocorrem contrações do alelo (GAA)_n expandido (PIANESE, *et al*, 1997).

Observações em pacientes que apresentam um alelo (GAA)_n expandido e outro contendo uma mutação pontual, e que possuem um fenótipo idêntico àqueles indivíduos com dois alelos (GAA)_n expandidos, indicam que ambas as situações devem levar a produção truncada ou ausência da proteína *frataxina* (KOUTNIKOVA, *et al*, 1997). Já foi demonstrado que tanto as expansões do triplete (GAA)_n quanto às mutações pontuais causam redução acentuada na maturação do RNA mensageiro da *frataxina*, indicando que a doença está provavelmente relacionada com a perda de função dessa proteína (BABCOCK, *et al*, 1997; CAMPUZANO, *et al*, 1997).

Tabela 1: Mutações de ponto descritas para AF (GRAY, JOHNSON, 1997).

MUTACÃO	LOCALIZAÇÃO	RESULTADO
<i>L106X</i>	Éxon 3	Troca o códon TTA pelo códon TGA
<i>385-2^d → G</i>	Intron 3	Interrompe o sítio de “ <i>splice</i> ”
<i>I154F</i>	Éxon 4	Troca do aminoácido isoleucina por fenilalanina
<i>G130V</i>	Éxon 4	Troca do aminoácido Valina por Glicina
<i>IVS4nt2</i>	Intron 4	Cria um stop códon prematuro
<i>R165C</i>	Éxon 5a	Troca o aminoácido Arginina por Cisteína
<i>L182F</i>	Éxon 5a	Troca o aminoácido Leucina por Fenilalanina

1.3 – Caracterização Molecular da Ataxia com Deficiência de Vitamina E.

Clinicamente a ADVE é muito semelhante à AF, sendo que a única maneira confiável de se diferenciar essas duas formas de AR é através da dosagem da vitamina E ou pela análise molecular das mutações envolvidas (BELAL, *et al*, 1995).

O gene responsável pela ADVE, o α -TTP (*Alpha Tocopherol Transfer Protein*), foi identificado em 1995, no braço longo do cromossomo 8, posição q13.1-q13.3, através de estudos de ligação. Esse gene possui cinco exons, e codifica a *proteína transportadora do alfa-tocoferol*, com 278 aminoácidos (GOTODA, *et al*, 1995; ARITA, *et al*, 1995). A ADVE é causada pela presença de vários tipos de mutações nesse gene, tais como: “frameshift”, “nonsense”, “missense”, “deleção”. Até o momento são conhecidas pelo menos 13 mutações no gene α -TTP (*Tabela 2*) (CAVALIER, *et al*, 1998).

A presença de mutações na região codificadora do gene α -TTP e o fato do α -tocoferol ser a forma biologicamente ativa da vitamina E, são evidências de que a deficiência dessa vitamina é provavelmente a causa primária do processo neurodegenerativo. Essa vitamina age como um antioxidante lipídico, sendo muito abundante nas membranas nucleares e mitocondriais. Devemos lembrar ainda que essa forma de HAR é potencialmente tratável com altas doses da vitamina E (OUAHCHI, *et al*, 1995).

Tabela 2: Mutações descritas no gene α -TTP, responsáveis pela ADVE (CAVALIER, *et al*, 1998).

MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
<i>R59W</i>	Éxon 1
<i>303 T → G</i>	Éxon 2
<i>H101Q</i>	Éxon 2
<i>205-1G → C</i>	Éxon 2
<i>306A → G</i>	Éxon 2
<i>A120T</i>	Éxon 2
<i>530AG → GTAA</i>	Éxon 3
<i>513 ins TT</i>	Éxon 3
<i>486delT</i>	Éxon 3
<i>R134X</i>	Éxon 3
<i>E141K</i>	Éxon 3
<i>R192H</i>	Éxon 4
<i>744delA</i>	Éxon 5

2 – ASPECTOS ÉTICOS

2 - ASPECTOS ÉTICOS

A fim de assegurar que toda a informação obtida para o estudo fosse mantida em sigilo, os questionários clínicos e amostras de sangue e DNA foram identificados apenas por um código, fornecido ao ingresso do indivíduo na pesquisa. Irmãos assintomáticos dos probandos não foram incluídos neste estudo. Contudo, investigou-se quando disponíveis, os pais dos probandos. A associação entre o código e nome do paciente, só era conhecida pelo clínico responsável. Um formulário de consentimento informado para participação em pesquisa médica foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis (*anexo 3*). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

3 - OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

Os principais objetivos traçados para este trabalho foram:

- 1) Determinação da frequência relativa das duas diferentes mutações responsáveis pelas ataxias com HAR em pacientes brasileiros: AF e ADVE.
- 2) Caracterização molecular das mutações detectadas: expansão do trinucleotídeo (GAA)_n, outras mutações no gene $\chi 25$, e os diferentes tipos de mutações encontradas no gene α -TTP.
- 3) Estudos de correlação entre o genótipo e as características fenotípicas dos pacientes analisados, tamanho do triplete (GAA)_n expandido e idade de início da doença; tipo de mutação no gene α -TTP e idade de início.
- 4) Análise da instabilidade da expansão trinucleotídica (GAA)_n durante a transmissão dos pais portadores, ao(s) filho(s) afetado(s).

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 –CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 – Casuística

Foram incluídos neste trabalho 97 indivíduos pertencentes a 58 famílias não relacionadas; destes, 81 eram indivíduos afetados. Cinquenta e nove pacientes eram seguidos no Ambulatório de Neurogenética (código 26.066) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Além disso, 38 amostras de sangue foram enviadas por colaboradores de outros centros clínicos do país.

No ambulatório foi realizada a identificação do paciente, obtida sua história clínica e familiar e construído um heredograma detalhado (*anexo 1*). Mediante o preenchimento de um formulário clínico (*anexo 2*) e assinatura dos formulários de consentimento informado para pesquisa médica (*anexo 3*), amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa.

Para a análise do tamanho do alelo $(GAA)_n$ normal na população brasileira, foram analisados 25 indivíduos normais não relacionados, perfazendo um total de 50 alelos normais.

Os critérios clínicos de inclusão no estudo foram: presença de ataxia cerebelar progressiva confirmada por história e exame neurológico, sem evidência de herança autossômica dominante (pais clinicamente sadios). Definimos o quadro clínico típico de AF em indivíduos com início da doença até os 25 anos de idade, apresentando ataxia espinocerebelar progressiva, sem comprometimento cognitivo, sem atrofia cerebelar aos exames de imagem (quando disponíveis), (PANDOLFO, MONTERMINI, 1998). A presença

de reflexo patelar, ausência de comprometimento cardíaco, escoliose ou pés cavus não excluiu o diagnóstico de AF (PANDOLFO, MONTERMINI, 1998).

4.2 – Análise Estatística

A comparação entre as médias de dois grupos foi realizada pelo cálculo do teste T de "Student". A correlação entre a idade de início da doença e o tamanho dos alelos (GAA)_n expandidos foi feita por análise de regressão linear pelo cálculo do coeficiente de correlação de "Pearson". Todos os testes estatísticos foram executados pelo programa de computador *SYSTAT* (SYSTAT, 1990).

4.3 – Análise Molecular

4.3.1 - Extração do DNA genômico

Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde se encontravam os leucócitos, foi então transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1× (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K(100 mg/ml) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação foram acrescentados três ml de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com um e meio ml de fenol e um e meio ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de três ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). O DNA genômico foi então precipitado em seis ml de etanol absoluto (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). Após a retirada do DNA do etanol, o mesmo foi colocado em tubo eppendorf contendo de 50 µl a 200µl de solução tampão TE 1x para armazenagem a - 70°C.

4.3.2 - Genotipagem do triplete (GAA)_n contido no gene $\chi 25$

A genotipagem do triplete (GAA)_n foi conduzida através da amplificação gênica, utilizando a técnica da *Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)*, onde a partir de um par de fragmentos iniciadores, denominados “*primers*” (oligonucleotídeos curtos), obtivemos múltiplas cópias do fragmento alvo. Dois pares de “*primers*” específicos foram utilizados para a genotipagem do triplete (GAA)_n normal (*GAA-F e GAA-R*), um dos quais também foi utilizado para a amplificação do alelo (GAA)_n expandido, *2500F e GAA104F (Tabela 3)* (FILLA, *et al*, 1996).

A reação da PCR foi conduzida com um volume final de 25 μ l, contendo: 200 a 400 ng de DNA genômico; 1.1 Mm de tampão (específico da enzima); 50 pmol de cada “*primer*” (sense e antisense); 200 μ M de dinucleotídeos: dATP, dCTP, dTTP e dGTP; e 1 unidade da enzima *eLONGase*®. A reação foi então colocada em um aparelho termociclador, onde a amplificação foi realizada, utilizando um protocolo para PCR longo, com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, 20 ciclos de 94°C por 15 s, 65°C por 30 s e 68°C por 5 min, seguidos de 10 ciclos de 94°C por 15 s, 63°C por 30 s e 68° por 5 min. Os produtos obtidos foram então submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% previamente corado com brometo de etídeo, a 70V por 4 horas. Após o término da eletroforese, o gel foi submetido à visualização sob contraste em luz ultravioleta e então fotografado (POIRIER, OHSHIMA, PANDOLFO, 1999).

O tamanho dos alelos normais e expandidos foi determinado através da migração em paralelo de um marcador de peso molecular. Pela comparação da migração dos produtos da *PCR*, controles e marcadores de peso molecular, obtivemos o tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb). Para a conversão do tamanho dos fragmentos obtidos de pb para unidades de $(GAA)_n$, contamos com o auxílio de duas fórmulas, visto que as seqüências flanqueantes (*Figura 1*) variavam de acordo com o par de “*primer*” utilizado (FORREST, *et al*, 1998). A fórmula utilizada para determinar o tamanho do alelo normal e expandido amplificado com o par de “*primer*” *GAA104F* e *P2500F*, foi:

$$N = 1230 + 3n$$

Onde:

N = tamanho do fragmento obtido em pares de bases.

1230 = tamanho da seqüência flanqueante ao par de “*primer*” *GAA104F* e *P2500F*.

n = unidades de $(GAA)_n$.

A fórmula utilizada para determinar o tamanho em unidades de $(GAA)_n$, do fragmento normal, obtido com o par de “*primer*” *GAA-F* e *GAA-R* foi basicamente a mesma, variando apenas o tamanho da sequência flanqueante:

$$N = 457 + 3n$$

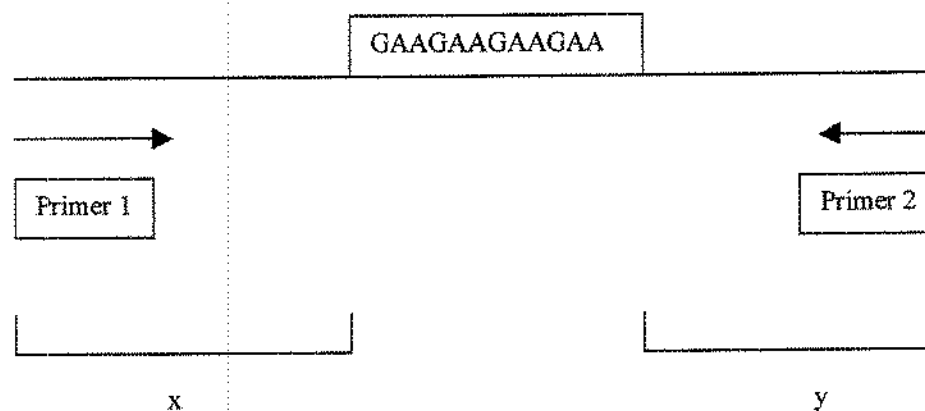
Onde:

N = tamanho do fragmento obtido em pares de bases.

457 = tamanho da sequência flanqueante ao par de “*primer*” *GAA-F* e *GAA-R*.

n = unidades de $(GAA)_n$.

Figura 1: esquema ilustrativo das fórmulas utilizadas para o cálculo dos tamanhos dos fragmentos $(GAA)_n$ normais e expandidos.



$$X + Y = \text{soma das seqüências flanqueantes}$$

Tabela 3: "Primers" utilizados para genotipagem do triplete (GAA)_n.

PAR DE PRIMER	SEQÜÊNCIA DO PRIMER	ALELO
<i>P2500F</i>	5'-CAATCCAGGACAGTCAGGGCTTT-3'	Normal
<i>GAA104F</i>	5'-GGCTTAAACTTCCCACACGTGTT-3'	e expandido
<i>GAA-F</i>	5'-GGGATTGGTTGCCAGTCGTTAAAAGTTAG-3'	Normal
<i>GAA-R</i>	5'-GTACTAAGGACCATCATGGCCACACTTGCC-3'	

4.3.3 - Genotipagem das mutações no gene α -TTP

Todas as amostras de pacientes que apresentaram ambos os alelos (GAA)_n de tamanho normal (e, portanto, nenhum alelo (GAA)_n expandido), foram analisadas para as mutações encontradas nos cinco exons do gene α -TTP. Como triagem inicial para a detecção da presença de uma mutação, utilizamos a técnica do “*Single Strand Conformation Polimorphism*” (SSCP). A técnica da SSCP baseia-se no princípio de que na presença de uma alteração na sequência do DNA (ex. uma mutação pontual), mesmo sem modificação no tamanho da cadeia, ocorrerá alteração na migração eletroforética. Essa alteração se deve à modificação na conformação da cadeia mutante do DNA (STRACHAN, READ, 1996). Para a execução da técnica, utilizamos também a PCR, onde os “*primers*” específicos para cada éxon (Tabela 4) foram utilizados, além de um par de “*primers*” para a região promotora. As reações de PCR, para os “*primers*” Ex3, Ex4 e Ex5 foram realizadas sob as condições a seguir, para um volume final de 25 μ l: 40 ng de DNA genômico; 1.5 Mm de tampão (específico da enzima); 1.5 Mm de MgCl₂; 200 μ M de dinucleotídeos; 50 pmol de cada “*primer*” (sense e antisense); 0,5 unidades de enzima *Taq*®; 1,5 μ Ci de α -[P³³] dATP e submetido à um “hot start” de 94°C por 3 min., seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 56°C por 30 s e 72 °C por 1 min. As reações de PCR para os “*primers*” UTR1 e UTR2 foram modificadas em relação a anterior, pela adição de 5% de DMSO e temperatura de anelamento, 59°C. Para o par de “*primer*” Ex1a, a reação foi alterada, pela modificação da concentração de MgCl₂ para 1 Mm, adição de 5% de DMSO e temperatura de anelamento de 60°C. Para o par de “*primer*” Ex1b,

além da adição de 5% de DMSO, alterou-se também a temperatura de anelamento para 58°C. E finalmente, para o par de “*primer*” *Ex2*, alterou-se apenas a temperatura de anelamento, reduzindo-a para 52°C. Os produtos da *PCR* foram então submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não denaturante ou com o meio pré-preparado MDE gel ®. Quatro µl de um mix contendo os produtos da *PCR* e stop solution foram aplicados no gel e a corrida realizada a 12 W por 8 hs. Cada gel foi então transferido para um suporte sólido (*Whatman paper 3MM*)®, seco à vácuo e exposto a um filme sensível a raio-X por 48 a 72 horas (SHEFFIELD, et al, 1993). Foram incluídas como controles normais, amostras de indivíduos sem ataxia. Se encontradas amostras com diferença de migração em relação aos controles normais, as mesmas seriam submetidas a sequenciamento manual, através de métodos enzimáticos de sequenciamento (WALLACE, et al, 1995). Este seria utilizado para determinar a alteração específica ao nível da sequência de DNA.

Tabela 4: “*Primers*” utilizados para detecção das mutações no gene α -*ITP*.

PAR DE PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER	LOCAL
<i>UTR1D</i>	5'-GAGGCTGCCAAGGAGGCA-3'	Região promotora
<i>UTR1R</i>	5'-GAAGCCACTGATGTTCAAACAC-3'	
<i>UTR2D</i>	5'-AATCATCCCAACTAAGTTTGACAT-3'	Região Promotora
<i>UTR2R</i>	5'-GCCTCTGCCATGCCCCGC-3'	
<i>Ex1aD</i>	5'-TGCGGCCGCGCAGCAGC-3'	Éxon 1
<i>Ex1aR</i>	5'-CGGGCGCGCAGGAACC-3'	
<i>Ex1bD</i>	5'-AAGCTGGCGTCCCGCT-3'	Éxon 1
<i>Ex1bR</i>	5'-TGAGGTGCGCACTGCCG-3'	
<i>Ex2D</i>	5'-TTACCATGTATGCCATTGTA-3'	Éxon 2
<i>Ex2R</i>	5'-AGGGAACACAAGTGAAGTGA-3'	
<i>Ex3D</i>	5'-CTGAATTCTTACACAACAATGCTAAGATATGATA-3'	Éxon 3
<i>Ex3R</i>	5'-TGGAATTCTTATGGCTGACAGTTAAAAT-3'	
<i>Ex4D</i>	5'-AGGAATTCCCATAAGCGTAGCAAGTG-3'	Éxon 4
<i>Ex4R</i>	5'-TAGAATTCAAAGGGTTGGAATGTTT-3'	
<i>Ex5D</i>	5'-TGGAATTCCATCTAATGCGGTTTCCTTC-3'	Éxon 5
<i>Ex5R</i>	5'-TTGAATTCGGAAGCCATTACATGACAT-3'	

5 - RESULTADOS

5 – RESULTADOS

5.1 - Frequência, genótipo e padrão de herança dos pacientes com AF

Dos 81 pacientes, pertencentes a 58 famílias não relacionadas, genotipados para o trinucleotídeo $(GAA)_n$, 16 apresentaram alelos $(GAA)_n$ expandidos e nenhum alelo normal (*Tabela 5*). Esses 16 pacientes totalizavam nove famílias não relacionadas, sendo 12 pacientes do sexo masculino e quatro pacientes do sexo feminino (*Tabela 5*). Portanto, a frequência total da mutação $(GAA)_n$ foi de 15,5% (9/58). No entanto, dos 81 indivíduos afetados genotipados, 25 foram classificados como casos típicos de AF. O restante apresentava comprometimento cognitivo e/ou atrofia cerebelar na ressonância magnética. Esses 25 pacientes pertenciam a 17 famílias não relacionadas, portanto, a frequência de casos positivos para AF dentre os pacientes com quadro clínico típico para a doença foi de 53% (9/17).

Dos 16 pacientes positivos para a AF, 15 apresentaram quadro clínico típico da doença, enquanto que um indivíduo com AF apresentou quadro clínico atípico, caracterizado por comprometimento cognitivo leve.

Não encontramos nenhum indivíduo afetado apresentando um alelo $(GAA)_n$ normal, o que exclui a existência de pacientes heterozigotos compostos em nossa amostra: indivíduos portadores de um alelo $(GAA)_n$ expandido e um alelo com mutação de ponto no gene *125*.

A média de idade de início da doença foi de 12 anos, variando de 6 a 19 anos de idade. Não encontramos diferença significativa entre a idade de início da doença em pacientes do sexo feminino (média 9,7 anos) ou masculino (média 13 anos), $p = 0,26$.

Do total de 58 famílias não relacionadas genotipadas, 15 famílias (26%) apresentaram padrão de herança compatível com segregação autossômica recessiva (recorrência em irmão ou consanguinidade). Os outros 43 (74%) pacientes não apresentavam história familiar da doença e foram classificados como casos isolados. Das nove famílias não relacionadas segregando a mutação AF, quatro apresentaram padrão de herança compatível com HAR (44%) e cinco eram casos isolados (56%).

Tabela 5: Dados demográficos e características moleculares dos pacientes positivos para a mutação AF.

FAMÍLIA	AMOSTRA	SEXO	IDADE DE INÍCIO	ALELO EXPANDIDO (GAA) _N	ORIGEM ÉTNICA	CONSANGUINIDADE
1	131/97	M	14 anos	756/ 1.340	Itália	Ausente
5	204/97	M	Não disponível	1.256	Desconhecida	Ausente
5	207/97	M	Não disponível	1.256	Desconhecida	Ausente
5	209/97	M	Não disponível	1.256	Desconhecida	Ausente
5	210/97	F	Não disponível	1.256	Desconhecida	Ausente
10	252/97	M	14 anos	340	Brasil	Ausente
14	297/97	F	11 anos	923	Brasil/ Itália	Presente
16	02/98	M	12 anos	715	Espanha/ Portugal/ Itália	Ausente
22	51/98	M	19 anos	423	Brasil	Ausente
22	501/98	M	8 anos	1.340	Brasil	Ausente
22	503/98	F	6 anos	1.340	Brasil	Ausente
26	138/98	M	16 anos	1.290	Itália/ Espanha	Ausente
31	418/98	M	Não disponível	1.006	Desconhecida	Não disponível
31	419/98	M	Não disponível	1.006	Desconhecida	Não disponível
31	420/98	M	Não disponível	1.006	Desconhecida	Não disponível
39	106/99	M	7 anos	1.370	Desconhecida	Ausente

5.2 - Características moleculares dos alelos (GAA)_n normais e expandidos

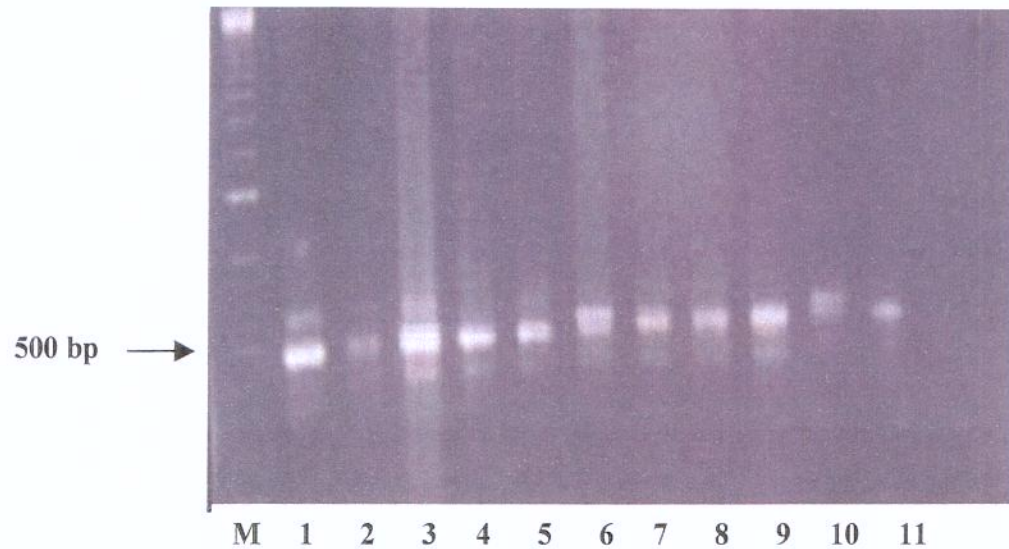
Os alelos (GAA)_n normais na população controle (25 indivíduos não relacionados = 50 alelos) variaram de sete a 13 unidades (GAA)_n com média de 10 unidades (GAA)_n. Dos 25 indivíduos normais genotipados, somente sete foram heterozigotos para o alelo (GAA)_n normal, portanto a porcentagem de heterozigocidade do alelo (GAA)_n normal na nossa população foi de 28% (*Figura 2*).

O tamanho dos alelos (GAA)_n expandidos encontrados nos 16 pacientes variou de 340 a 1370 unidades (GAA)_n com uma média de 1051 unidades (GAA)_n. Dos indivíduos afetados, apenas um foi heterozigoto para o (GAA)_n expandido (*Figuras 3 e 4*). Não houve diferença entre o tamanho do (GAA)_n expandido em pacientes do sexo feminino (média 1058,5) e masculino (média 1049,7), $p = 0,94$.

Encontramos uma correlação inversa significativa entre a idade de início da doença e o alelo (GAA)_n expandido menor, com os seguintes valores: $r = -0,7$; $r^2 = 0,49$ e $p = 0,037$ (*Figura 5*). No entanto, essa correlação não foi estatisticamente significativa para o alelo (GAA)_n expandido maior, que apresentou os seguintes valores: $r = -0,6$; $r^2 = 0,35$ e $p = 0,093$, apesar da regressão linear demonstrar uma tendência para uma correlação inversa (*Figura 6*).

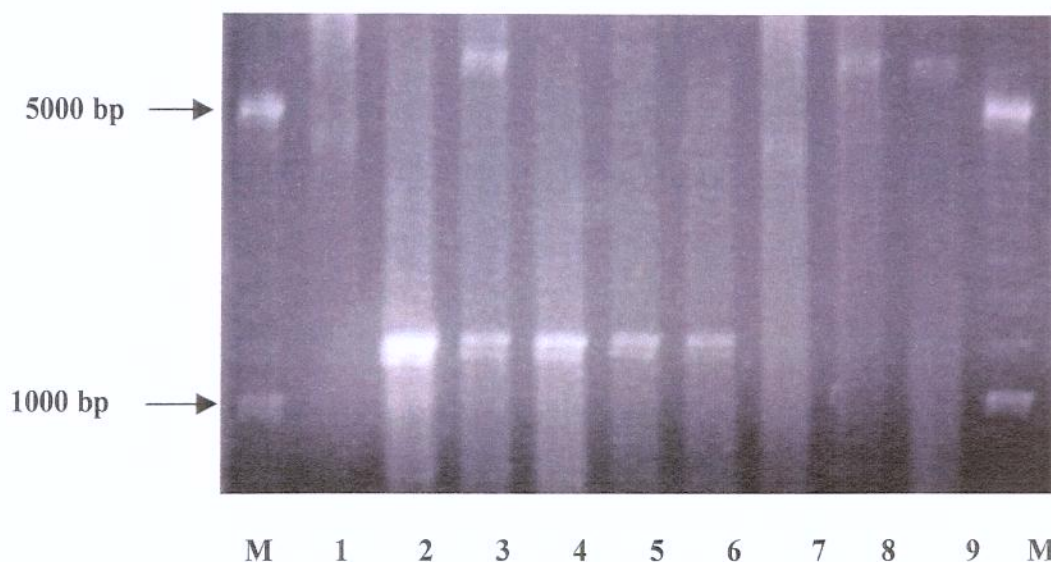
Foram documentadas quatro transmissões do alelo (GAA)_n expandido. Em apenas uma delas houve alteração do tamanho do segmento (GAA)_n expandido: contração de 584 unidades (GAA)_n de pais portadores ao filho afetado. Todas as outras três transmissões foram estáveis.

Figura 2: Alelos $(GAA)_n$ normais na população controle.



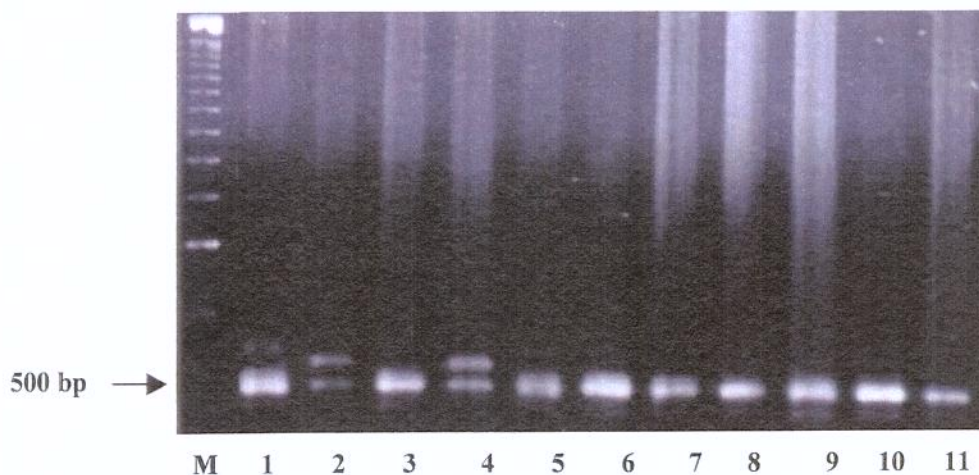
Legenda: M = marcador de peso molecular de 250 bp; **colunas 1, 2, 3, 5, 6 e 10** indivíduos heterozigotos para o alelo $(GAA)_n$ normal; **colunas 4, 7, 8 e 9** indivíduos homozigotos para o alelo $(GAA)_n$ normal.

Figura 3: Alelos $(GAA)_n$ normais e expandidos utilizando o par de “*primer*” 2500F e GAA104F.



Legenda: M = marcador de peso molecular de 250 bp; **colunas 2, 4, 5 e 6** indivíduos homozigotos para o alelo $(GAA)_n$ normal; **colunas 1, 7, 8 e 9** indivíduos homozigotos para o alelo $(GAA)_n$ expandido; **coluna 3** indivíduo heterozigoto, contendo um alelo $(GAA)_n$ normal e outro expandido.

Figura 4: Alelos $(GAA)_n$ normais utilizando o par de “*primer*” *GAA-F* e *GAA-R*.



Lengenda: M = marcador de peso molecular de 250 bp; **colunas 1, 2 e 4** indivíduos heterozigotos para o alelo $(GAA)_n$ normal; **colunas 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11** indivíduos homozigotos para o alelo $(GAA)_n$ normal.

Figura 5: Correlação entre o tamanho do alelo $(GAA)_n$ expandido menor em cromossomos AF de nove indivíduos afetados, com a idade de início da doença (coeficiente de correlação de "Pearson" $r = -0,7$; $r^2 = 0,49$; $p = 0,037$).

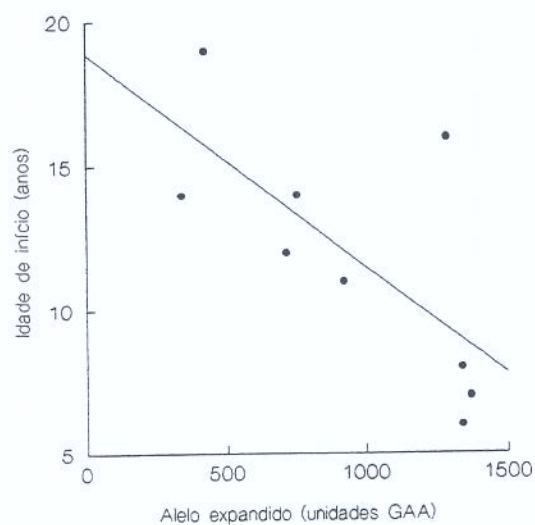
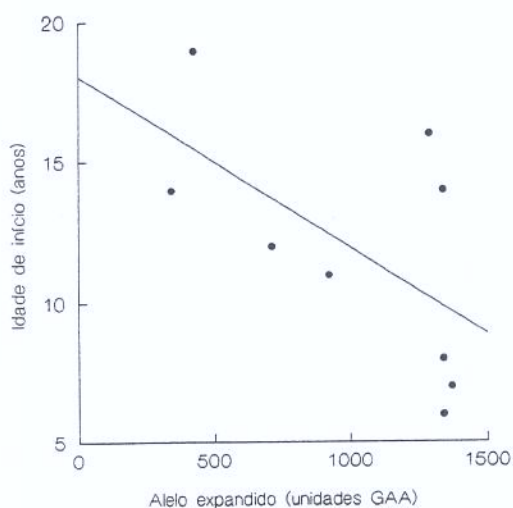


Figura 6: Correlação entre o tamanho do alelo $(GAA)_n$ expandido maior em cromossomos AF de nove indivíduos afetados, com a idade de início da doença (coeficiente de correlação de "Pearson" $r = -0,6$; $r^2 = 0,35$; $p = 0,093$).



5.3 - Genotipagem de mutações no gene α -TTP

A análise das mutações no gene α -TTP pela técnica da SSCP foi realizada em um total de 49 indivíduos não relacionados, ou seja, todos aqueles pacientes que não apresentavam a mutação para a AF. Não foram encontradas nenhuma das mutações descritas nos cinco exons do gene α -TTP (Figuras 7 a 11).

Figura 7: Amplificação do éxon 1 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" *Ex1D* e *Ex1R*. Nenhuma mutação detectada.

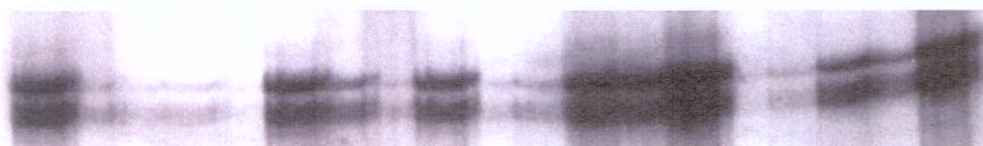


Figura 8: Amplificação do éxon 2 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex2D e Ex2R. Nenhuma mutação detectada.

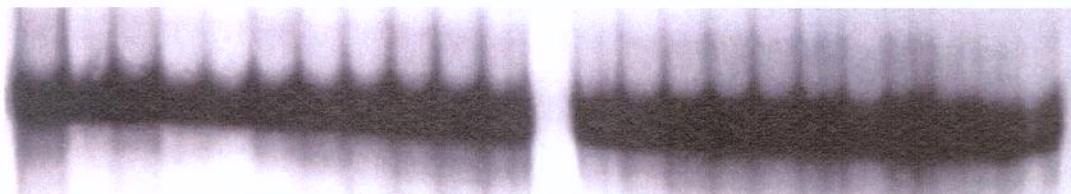


Figura 9: Amplificação do éxon 3 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex3D e Ex3R. Nenhuma mutação detectada.

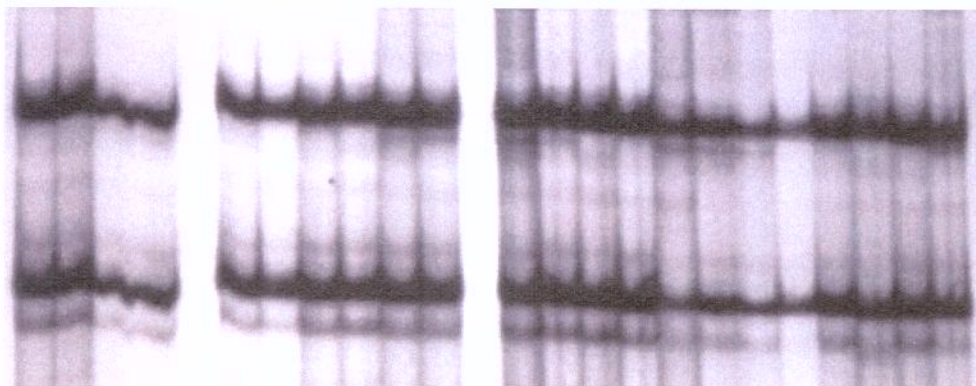


Figura 10: Amplificação do éxon 4 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" *Ex4D* e *Ex4R*. Nenhuma mutação detectada.

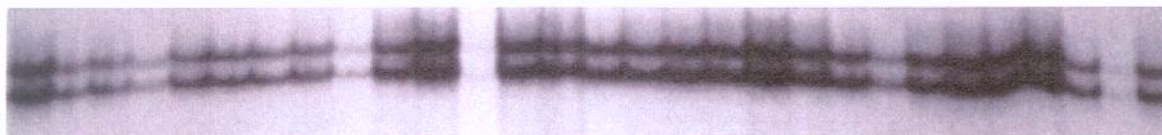
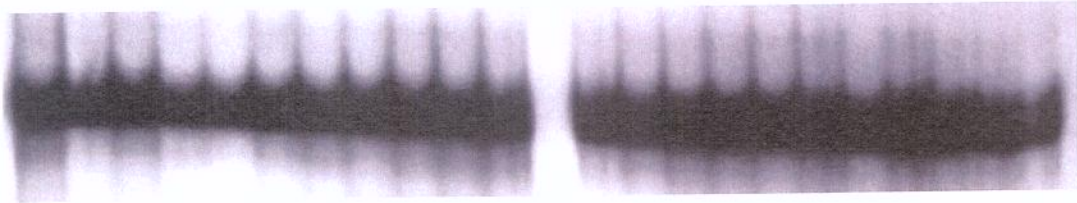


Figura 11: Amplificação do éxon 5 do gene α -TTP utilizando a técnica da SSCP e o par de "primers" Ex5D e Ex5R. Nenhuma mutação detectada.



6 - DISCUSSÃO

6 – DISCUSSÃO

Nos últimos anos, ocorreu um grande progresso na compreensão dos mecanismos básicos envolvidos em várias doenças genéticas. Isto ocorreu devido ao avanço recente da genética molecular, cujos novos métodos e tecnologia levou à identificação de um grande número de genes responsáveis por doenças. Com a clonagem do gene para *AF* em 1996 (CAMPUZANO, *et al*, 1996) e a identificação do gene α -*TTP* (GOTODA, *et al*, 1995; ARITA, *et al*, 1995) implicado na patogênese da ADVE, um diagnóstico preciso é possível em indivíduos isolados, sem a necessidade do estudo de grandes famílias. Isso possibilita que vários aspectos clínicos, patológicos e informações derivadas dos estudos moleculares possam ser usados para caracterizar melhor essas doenças e compreender seus mecanismos básicos.

A identificação da mutação responsável pela maioria dos casos de *AF* como uma expansão de um trinucleotídeo (GAA)_n aparecendo em homozigose ou em heterozigotos compostos veio acrescentar uma nova categoria à classe das mutações dinâmicas (CAMPUZANO, *et al*, 1996). Ao contrário das mutações dinâmicas identificadas até o momento, na *AF* a doença apresenta uma herança autossômica recessiva (PALAU, *et al*, 1995). Além disso, ao contrário das outras mutações por expansão de trinucleotídeo (CAG)_n responsáveis por neurodegeneração nas ataxias espinocerebelares com HAD, o triplete (GAA)_n se localiza em região não codificadora do gene χ 25 (primeiro íntron) (CAMPUZANO, *et al*, 1996), existindo evidências de que a expansão desse triplete leve a uma diminuição da síntese de mRNA (BABCOCK, *et al*, 1997; CAMPUZANO, *et al*, 1997) e

conseqüentemente da síntese protéica (KOUTNIKOVA, *et al*, 1997), indicando que mecanismos que levem a perda ou diminuição de função do gene $\chi 25$ estejam envolvidos na patogênese da doença (BABCOCK, *et al*, 1997; CAMPUZANO, *et al*, 1997).

Apesar de rara em várias populações na qual já foi estudada (MONRÓS, *et al*, 1997), a importância de se pesquisar a frequência da ADVE reside no fato de esta ser uma forma potencialmente tratável de ataxia espinocerebelar com HAR. A grande maioria dos pacientes que foram submetidos à análise molecular para as mutações no gene α -TTP estavam sendo tratados já há vários anos com doses diárias de vitamina E via oral, o que impossibilitava a realização do diagnóstico pela dosagem sérica da vitamina E, razão pela qual optamos pela realização da pesquisa da ADVE a nível molecular.

Este é um trabalho pioneiro no Brasil, onde estudamos a frequência das mutações responsáveis pelas ataxias espinocerebelares com HAR e relatamos as características moleculares de um grande grupo de pacientes brasileiros com AF. A análise molecular da expansão do triplete (GAA)_n confirmou o diagnóstico de AF em somente 15,5% do grupo total pacientes estudados. Porém é importante lembrar que, os critérios de inclusão no estudo foram propositadamente amplos, para que pudéssemos ter a chance de detectar as mutações estudadas mesmo em casos atípicos da doença. No entanto, quando essa frequência foi calculada no grupo de pacientes que preenchem os critérios diagnósticos para AF encontramos que 53% dos pacientes apresentaram mutações no gene $\chi 25$. Tal achado indica que uma seleção *a priori* dos pacientes a serem testados com base nos critérios clínicos propostos mais recentemente (PANDOLFO, MONTERMINI, 1998) aumenta as chances de se encontrar

pacientes positivos para *AF*. Desse modo, as chances de pacientes com retardo mental grave e/ou alterações no sistema nervoso central em exames de imagem estrutural apresentarem a mutação para *AF* foi muito baixa. Vale a pena lembrar, no entanto, que no nosso grupo de 16 pacientes com a mutação *AF* identificamos um paciente com comprometimento mental leve. Por outro lado, dos 25 pacientes com quadro clínico típico de *AF*, 15 foram positivos para a mutação (60%), indicando que outros fatores etiológicos devem estar envolvidos nos 40% de pacientes que não apresentaram mutações. Vale salientar que nesses casos, a única maneira de se estabelecer o diagnóstico diferencial foi o teste molecular.

Dentre as nove famílias não relacionadas que segregavam *AF*, somente quatro (44%) apresentavam padrão de herança sugestivo de segregação autossômica recessiva (recorrência em irmãos ou consangüinidade e pais sadios). A maioria dos pacientes com a mutação *AF* (56%) não apresentava história de recorrência ou consangüinidade na família, demonstrando que essa mutação deve ser pesquisada também em casos isolados com suspeita clínica.

Dois a cinco por cento dos pacientes com *AF* descritos na literatura são heterozigotos compostos (CAMPUZANO, *et al*, 1996), onde um alelo do gene $\chi 25$ apresenta a expansão $(GAA)_n$ e o outro alelo tem o segmento $(GAA)_n$ de tamanho normal, mas apresenta uma mutação de ponto ou deleção afetando diferentes exons desse gene, e levando também a uma provável perda de função do mesmo. Todos os nossos 16 pacientes com a mutação *AF* apresentaram somente alelos $(GAA)_n$ de tamanho expandido (≥ 200 unidades GAA) e nenhum alelo $(GAA)_n$ de tamanho normal (≤ 50 unidades GAA). No entanto, dos 16 pacientes com mutações *AF*, somente um apresentou dois alelos (GAA) expandidos de tamanhos diferentes.

Assim, a genotipagem do triplete $(GAA)_n$ de 15 pacientes com a mutação *AF* mostrou apenas uma banda no intervalo correspondente ao alelo $(GAA)_n$ expandido. Tal achado poderia invalidar nossas conclusões diagnósticas, pois o não aparecimento de uma banda no intervalo de valores normais para o alelo $(GAA)_n$ poderia resultar de um artefato de experimento (POIRIER, 1999). Para contornar tal problema, optamos por realizar uma segunda genotipagem de todos os pacientes com "*primers*" específicos para a amplificação do alelo $(GAA)_n$ normal, e nenhuma banda foi detectada nesse experimento para os pacientes com mutações *AF*, Excluindo dessa maneira a presença de alelos $(GAA)_n$ normais e confirmando nossa conclusão de que 15 dos 16 pacientes com *AF* eram homozigotos para o alelo $(GAA)_n$ expandido.

Na população controle, 72% dos indivíduos apresentou dois alelos $(GAA)_n$ normais contendo sete repetições $(GAA)_n$ (homozigotos), sendo que a porcentagem de heterozigotos para a repetição $(GAA)_n$ na população normal foi de 28%. Tal achado pode dificultar o diagnóstico molecular da *AF* em nossa população, pois o achado de somente um alelo $(GAA)_n$ normal em indivíduos afetados poderia resultar de falha na amplificação do alelo expandido em paciente heterozigoto composto. Por isso, repetimos nossos experimentos por pelo menos três vezes e sempre na presença de um controle positivo.

Encontramos uma correlação negativa entre idade de início da doença e tamanho do alelo $(GAA)_n$ expandido indicando que, quanto maior o tamanho do alelo $(GAA)_n$ expandido, menor é a idade de início da doença. No entanto, tal correlação foi significativa somente quando consideramos o tamanho do alelo expandido menor, significando que o tamanho do

alelo (GAA)_n menor é responsável por aproximadamente 48% da variabilidade na idade de início da doença em nossos pacientes. Apesar da correlação significativa encontrada, o tamanho do alelo (GAA)_n expandido não deve ser utilizado como indicador da idade de início da doença, pois a maior parte dessa variabilidade (52%) não é determinada pelo tamanho do alelo (GAA)_n.

Não detectamos nenhuma mutação no gene α -TTP nos nossos pacientes. No entanto, o método de triagem utilizado, SSCP, tem limitações e segundo dados da literatura mesmo em condições ideais, é capaz de detectar por volta de 80% das mutações pesquisadas (SHEFFIELD, 1993). Nós utilizamos todos os cuidados técnicos indicados para aumentar a sensibilidade do método, entre eles: a) limitar o tamanho do fragmento de DNA estudado entre 200 e 250 pb, b) realizar a eletrofore em pelo menos duas condições diferentes (meio MDE e gel de poliacrilamida não desnaturante; e c) o uso de glicerol. No entanto não podemos excluir totalmente a possibilidade de que nossa técnica de triagem não foi sensível o suficiente para detectar mutações.

7 - CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

1) A frequência total da expansão do trinucleotídeo $(GAA)_n$ como causa de ataxia espinocerebelar com HAR foi de 15,5%, no entanto a frequência dessa mutação nos pacientes com quadro clínico típico de AF foi de 53%.

2) Todos os pacientes com AF apresentaram alelos $(GAA)_n$ expandido e nenhum alelo normal, indicando que não havia nenhum paciente heterozigoto composto em nossa amostra: indivíduos portadores de um alelo $(GAA)_n$ expandido e outro contendo uma mutação pontual no gene χ^{25} .

3) A média de idade de início da doença foi de 12 anos, variando de seis a 19 anos de idade. Não foi encontrada diferença significativa entre a idade de início da doença em pacientes do sexo feminino (média 9,7 anos) ou masculino (média 13 anos), $p = 0,26$.

4) O alelo expandido $(GAA)_n$ variou de 340 a 1370 unidades de $(GAA)_n$ com uma média de 1051 unidades de $(GAA)_n$. Não houve diferença entre o tamanho médio do alelo expandido $(GAA)_n$ de acordo com o sexo dos indivíduos afetados.

5) Uma correlação inversa significativa entre o tamanho do alelo $(GAA)_n$ expandido menor e a idade de início da doença foi encontrada ($p = 0,037$).

6) Os alelos normais se apresentaram pouco polimórficos na nossa população variando de sete a 13 unidades $(GAA)_n$ com média = 10 unidades $(GAA)_n$, sendo que 72% dos indivíduos controles possuíam 7 unidades $(GAA)_n$. A porcentagem de heterozigocidade do alelo $(GAA)_n$ normal encontrada em nossa amostragem controle foi de 28%.

7) Foram documentadas quatro transmissões do alelo $(GAA)_n$ expandido de uma geração a outra, sendo que somente em um alelo houve alteração do tamanho, com uma contração que 584 unidades $(GAA)_n$ no filho afetado. Nas outras transmissões não houveram diferenças nos alelos expandidos $(GAA)_n$ transmitidos pelos pais portadores aos filhos afetados.

8) Nenhuma mutação no gene $\alpha-TTP$ foi encontrada pela técnica de triagem empregada em nosso estudo: *SSCP*.

8 - SUMMARY

8 - SUMMARY

The spinocerebellar ataxia form a group of neurodegenerative disorders with clinical heterogeneity. They are characterized by cerebellar dysfunction with progressive ataxia, incoordination and dysarthria. Familial cases show variable pattern of inheritance: autosomal dominant (AD) or autosomal recessive (AR).

To date, there are four loci described for the spinocerebellar ataxia with AR: Friedreich ataxia (FA) on chromosome 9q; ataxia with vitamin E deficiency (ADVE) on chromosome 8q, the Infantile Onset Spinocerebellar Ataxia (IOSCA) on chromosome 10q and ataxia telangiectasia on chromosome 11q.

Most cases of FA are caused by an expansion of a triplet (GAA)_n in both alleles of the $\chi 25$ gene. This gene encodes for a 210 aminoacids protein named *Frataxin*, with mitochondrial target. Normal (GAA)_n alleles range from seven to 30 (GAA)_n units and expanded (GAA)_n alleles have 200 to 1700 (GAA)_n units.

ADVE is clinically identical to the FA, and the best way to differentiate between the two forms is by molecular testing. ADVE is caused by different types of mutations, found in the α -TTP gene, with codes for *alpha tocopherol transfer protein*, with 278 aminoacids. To date, there are 13 different mutations reported in α -TTP.

We studied 97 individuals, belonging to 58 unrelated families. The frequency of patients with FA mutation was 15% among our patients. No mutations were found in α -TTP gene by SSCP analysis.

This is the first report on the frequency of different mutations causing spinocerebellar ataxia with AR inheritance in the Brazilian population. In addition, we analyzed the molecular characteristics of the mutations detected and performed genotype - phenotype correlation.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARITA, N.; SATO, Y.; MIYATA, A.; TANABE, T.; TAKAHASHI, E.; KAYDEN, H. J.;
ARAI, H.; INOUE, K. - Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning,
expression and chromosomal localization . **Biochem. J.**, 306: 437 - 443, 1995.
- ARRUDA, W. O.; TEIVE, H. A. G. - Ataxias Cerebelares Hereditárias – Do Martelo ao
Gen. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 55 (3-B): 666 – 676, 1997.
- BABCOCK, M.; DE SILVA, D.; OAKS, R.; DAVIS-KAPLAN, S.; JIRALERSPONG, S.;
MONTERMINI, L.; PANDOLFO, M.; KAPLAN, J. - Regulation of Mitochondrial
Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin . **Science**, 276: 1709 –
1712, 1997.
- BARTOLO, C.; MENDELL, J. R.; PRIOR, T. W. - Identification of a Missense Mutation
in a Friedreich's Ataxia Patient: Implications for Diagnosis and Carrier Studies . **Am.
J. Med. Genet.**, 79: 396 – 399, 1998.
- BELAL, S.; HENTATI, F.; BEN-HAMIDA C.; BEN-HAMIDA, M - Friedreich's Ataxia-
Vitamin E Responsive Type . **Neuroscience** 3: 39 - 42, 1995.

- BIDICHANDANI, S. I.; ASHIZAWA, T.; PATEL, P. I. - Atypical Friedreich Ataxia Caused by Compound Heterozygosity for a Novel Missense Mutation and the GAA Triplet-Repeat Expansion . *Am. J. Hum. Genet.*, 60: 1251 – 1256, 1997.
- BURCK, U.; GOEBEL, H. H.; KUHLEND AHL, H. D.; MEIER, C.; GOEBEL, K. M. - Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man . *Neuropediatrics*, 12: 267 - 278, 1981.
- CAMPUZANO, V.; MONTERMINI, L.; MOLTÒ, M. D.; PIANESE, L.; COSSÉE, M.; CAVALCANTI, F.; MONROS, E.; RODIUS, F.; DUCLOS, F.; MONTICELLI, A.; ZARA, F.; CAÑIZARES, J.; KOUTNIKOVA, H.; BIDICHANDANI, S. I.; GELLERA, C.; BRICE, A.; TROUILLAS, P.; DE MICHELLE, G.; FILLA, A.; DE FRUTOS, R.; PALAU, F.; PATEL, P. I.; DI DONATO, S.; MANDEL, J-L; COCOZZA, S.; KOENIG, M.; PANDOLFO, M. - Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion . *Science*, 271: 1423 - 1427, 1996.
- CAMPUZANO, V.; MONTERMINI, L.; LUTZ, Y.; COVA, L.; HINDELANG, C.; JIRALERSPONG, S.; TROTTIER, Y.; KISH, S. J.; FAUCHEUX, B.; TROUILLAS, P.; AUTHIER, F. J.; DÜRR, A.; MANDEL, J-L.; VESCOVI, A.; PANDOLFO, M.;

KOENIG, M. - Frataxin is Reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes . **Hum. Mol. Genet.**, 6 (11): 1771 – 1780, 1997.

CARVAJAL, J. J.; POOK, M. A.; DOS SANTOS, M.; DOUDNEY, K.; HILLERMANN, R.; MINOGUE, S.; WILLIAMSON, R.; HSUAN, J. J. & CHAMBERLAIN, S. - The Friedreich's ataxia encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase . **Nat. Genet.**, 14: 157 – 162, 1996.

CAVALIER, L.; OUAHCHI, K.; KAYDEN, H. J.; DI DONATO, S.; REUTENAUER, L.; MANDEL, J-L.; KOENIG, M. - Ataxia with Isolated Vitamin E Deficiency: Heterogeneity of Mutations and Phenotypic Variability in a Large Number of Families. **Am. J. Hum. Genet.**, 62: 301 – 310, 1998.

CEDARBAUM, J. M.; BLASS, J. P. - Mitochondrial dysfunction and spinocerebellar degenerations . **Neurochem. Pathol.**, 4: 43 – 63, 1986.

CHAMBERLAIN, S.; SHAW, J.; ROWLAND, L. P. - Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9 . **Nature** 21: 248-250, 1988.

COSSÉE, M.; CAMPUZANO, V.; KOUTNIKOVA, H.; FISCHBECK, K.; MANDEL, J-L.; KOENIG, M.; BIDICHANDANI, S. I.; PATEL, P. I.; MOLTÒ, M. D.;

- CAÑIZARES, J. & DE FRUTOS, R.; PIANESE, L.; CAVALCANTI, F.;
MONTICELLI, A.; COCOZZA, S.; MONTERMINI, L & PANDOLFO, M. - Frataxin
fracas . **Nat. Genet.**, 15: 337 – 338, 1997.
- COSSÉE, M.; SCHMITT, M.; CAMPUZANO, V.; REUTENAUER, L.; MOUTOU, C.;
MANDEL, J-L.; KOENIG, M. - Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide
expansion: Founder effect and premutations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 7452 -
7457, 1997.
- COSSÉE, M.; DÜRR, A.; SCHMITT, M.; DAHL, N.; TROUILLAS, P.; ALLINSON, P.;
KOSTRZEWA, M.; NIVELLON-CHEVALLIER, A.; GUSTAVSON, K-H.;
KOHLSCHÜTTER, A.; MÜLLER, U.; MANDEL, J-L.; BRICE, A.; KOENIG, M.;
CAVALCANTI, F.; TAMMARO, A.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; COCOZZA, S.;
LABUDA, M.; MONTERMINI, L.; POIRIER, J.; PANDOLFO, M. - Friedreich's
Ataxia: Point Mutations and Clinical Presentation of Compound Heterozygotes . **Ann.**
Neurol., 45 (2): 200 – 206, 1999.
- DE MICHELE, G.; FILLA, A.; CAVALCANTI, F.; DI MAIO, L.; PIANESE, L.;
CASTALDO, I.; CALABRESE, O.; MONTICELLI, A.; VARRONE, S.;
CAMPANELLA, G.; LEONE, M.; PANDOLFO, M.; COCOZZA, S. - Late onset

Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus .

J. Neurol., Neurosurg. And Psychiatr., 57: 977 – 979, 1994.

DELATYCKI, M. B.; PARIS, D.; GARDNER, R. J. M.; FORSHAW, K.; NICHOLSON, G. A.; NASSIF, N.; WILLIAMSON, R.; FORREST, S. M. - Sperm DNA analysis in a Friedreich ataxia premutation carrier suggests both meiotic and mitotic expansion in the FRDA gene **J. Med. Genet.**, 35: 713 – 716, 1998.

DUCLOS, F.; RODIUS, F.; WROGEMANN, K.; MANDEL, J-L; KOENIG, M. - The Friedreich Ataxia region: characterization of two novel genes and reduction of the critical region to 300 kb . **Hum. Mol. Genet.**, 3: 909 – 914, 1994.

DÜRR, A.; COSSÉE, M.; AGID, Y.; CAMPUZANO, V.; MIGNARD, C.; PENET, C.; MANDEL, J-L.; BRICE, A. & KOENIG, M. - Clinical and Genetic Abnormalities in Patients With Friedreich's Ataxia . **N. Engl. J. Med.**, 335 (16): 1169 - 1175, 1996.

FILLA, A.; DE MICHELE, G.; CAVALCANTI, F.; PIANESE, L.; MONTICELLI, A.; CAMPANELLA, G.; COCOZZA, S. - The Relationship between Trinucleotide (GAA) Repeat Length and Clinical Features in Friedreich Ataxia . **Am. J. Hum. Genet.**, 59: 554 – 560, 1996.

FORREST, S. M.; KNIGHT, M.; DELATYCKI, M. B.; PARIS, D.; WILLIAMSON, R.; KING, J.; YEUNG, L.; NASSIF, N.; NICHOLSON, G. A. - The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene . *Neurogenet.*, 1: 253 – 257, 1998.

GOTODA, T.; ARITA, M.; ARAI, H.; ARAI, H.; INOUE, K.; YOKOTA, T.; FUKUO, Y.; YAZAKI, Y.; YAMADA, M. - Adult-Onset Spinocerebellar Dysfunction Caused By a Mutation in the Gene for the α -Tocopherol-Transfer Protein . *N Engl J Med.*, 3: 1313 - 1318, 1995.

GRAY, J. V.; JOHNSON, K. J. - Waiting for Frataxin . *Nature Genet.*, 16: 323 – 325, 1997.

GREENFIELD, J. G. (ed.) . The spino-cerebellar degenerations . Springfield: Charles C Thomas, 1954.

HARDING, A. E. (ed) . The hereditary ataxias and related disorders . London: Churchill Livingstone, 1984.

HURKO, O. - Recent Advances in Heritable Ataxias . *Ann. Neurol.*, 41 (1): 4 – 6, 1997.

- JOHNSON, W. G. - Friedreich Ataxia . **Clin. Neuroscienc.** 3: 33 – 38, 1995.
- KAPLAN, J. - Friedreich's ataxia is a mitochondrial disorder . **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, 96: 1094 – 10949, 1999.
- KLOCKGETHER, T.; LÜDTKE, R.; KRAMER, B.; ABELE, M.; BÜRK, K.; SCHÖLS, L.; RIESS, O.; LACCONE, F.; BOESCH, S.; LOPES-CENDES, I.; BRICE, A.; INZELBERG, R.; ZILBER, N.; DICHGANS, J. - The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients . **Brain**, 121: 589 – 600, 1998.
- KOUTNIKOVA, H.; CAMPUZANO, V.; FOURY, F.; DOLLÉ, P.; CAZZALINI, O. & KOENIG, M. - Studies of human, mouse and yeast homologues indicates a mitochondrial function for frataxin . **Nat. Genet.**, 16: 345 – 351, 1997.
- LAMONT, P. J.; DAVIS, M. B.; WOOD N. W. - Identification and sizing of the GAA trinucleotide repeat expansion of Friedreich's ataxia in 56 patients . **Brain**, 120: 673 – 680, 1997.
- LEGGO, J.; DALTON, A.; MORRISON, P. J.; DODGE, A.; CONNARY, M.; KOTZE, M. J.; RUBINSZTEIN, D. C. - Analysis of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6,

- dentatorubral-pallidoluysian atrophy, and Friedreich's ataxia genes in spinocerebellar ataxia patients in the UK . **J. Med. Genet.**, 34: 982 - 985, 1997.
- LÖNNQVIST, T.; PAETAU, A.; NIKALI, K.; VON BOGUSLAWSKI, K.; PIHKO, H. - Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (IOSCA): neuropathological features . **J. Neurol. Scienc.**, 161: 57 – 65, 1998.
- MONRÓS, E.; MOLTÓ, M. D.; MARTINEZ, F.; CAÑIZARES, J.; BLANCA, J.; VÍLCHEZ, J. J.; PRIETO, F.; DE FRUTOS, R.; PALAU, F. - Phenotype Correlation and Integrational Dynamics of the Friedreich Ataxia GAA Trinucleotide Repeat . **Am. J. Hum. Genet.**, 61: 101-110, 1997
- MONTERMINI, L.; RODIUS, F.; PIANESE, L.; MOLTÒ, M. D.; COSSÉE, M.; CAMPUZANO, V.; CAVALCANTI, F.; MONTICELLI, A.; PALAU, F.; GYAPAY, G.; WENHERT, M.; ZARA, F.; PATEL, P. I.; COCOZZA, S.; KOENIG, M.; PANDOLFO, M. - The Friedreich Ataxia Critical Region Spans a 150-kb Interval on Chromosome 9q13 . **Am. J. Hum. Genet.**, 57: 1061 – 1067, 1995.
- MONTERMINI, L.; ANDERMANN, E.; LABUDA, M.; RICHTER, A.; PANDOLFO, M.; CAVALCANTI, F.; PIANESE, L.; IODICE, L.; FARINA, G.; MONTICELLI, A.; TURANO, M.; FILLA, A.; DE MICHELE, G.; COCOZZA, S. - The Friedreich

ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles . **Hum. Mol. Genet.**, 6 (8): 1261 – 1266, 1997.

MONTERMINI, L.; RICHTER, A.; MORGAN, K.; JUSTICE, C. M.; JULIEN, D.; CASTELLOTTI, B.; MERCIER, J.; POIRIER, J.; CAPOZZOLI, F.; BOUCHARD, J-P.; LEMIEUX, B.; MATHIEU, J.; VANASSE, M.; SENI, M-H.; GRAHAM, G.; ANDERMANN, F.; ANDERMANN, E.; MELANÇON, S. B.; KEATS, B. J. B.; DI DONATO, S.; PANDOLFO, M. - Phenotypic Variability in Friedreich Ataxia: Role of the Associated GAA Triplet Repeat Expansion . **Ann Neurology**, 41 (5): 675 - 682, 1997.

NIKALI, K.; SOUMALAINEN, A.; TERWILLIGER, J.; KOSKINEN, T.; WEISSENBAACH, J.; PELTONEN, L. - Random search for shared chromosomal regions in four affected individuals: the assignment of a new hereditary ataxia locus . **Am. J. Hum. Genet.**, 56 (5): 1088 - 1095, 1995.

OUAHCHI, K.; ARITA, M.; KAYDEN, H.; HENTATI, F.; BEN-HEMIDA, M.; SOKOL, R.; ARAI, H.; INOUE, K.; MANDEL, J-L. & KOENIG, M. - Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein . **Nat. Genet.**, 9: 141 - 145, 1995.

PALAU, F.; DE MICHELE, G.; VILCHEZ, J. J.; PANDOLFO, M.; MONRÓS, E.; COCOZZA, S.; SMEYERS, P.; LOPEZ-ARLANDIS, J.; CAMPANELLA, G.; DI DONATO, S.; FILLA, A. - Early-Onset Ataxia with Cardiomyopathy and Retained tendon Reflexes maps to the Friedreich's Ataxia Locus on Chromosome 9q . **Ann. Neurol.**, 37 (3): 359 – 162, 1995.

PANDOLFO, M.; MONTERMINI, L. - Molecular Genetics of the hereditary ataxias . **Adv. Genet.**, 38: 31 - 68, 1998.

PANDOLFO, M. - Molecular Pathogenesis of Friedreich Ataxia . **Arch. Neurol.**, 56: 1201 – 1208, 1999.

PIANESE, L.; CAVALCANTI, F.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; CAMPANELLA, G.; CALABRESE O.; CASTALDO, I.; MONTICELLI, A.; COCOZZA, S. - The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in FRDA gene . **Am. J. Hum. Genet.**, 60: 460 – 462, 1997.

POIRIER, J.; OHSHIMA, K.; PANDOLFO, M. - Heteroduplexes May Confuse the Interpretation of PCR-Based Molecular Tests for the Friedreich Ataxia GAA Triplet Repeat . **Hum. Mutat.**, 13: 328 – 330, 1999.

PRILLER, J.; SCHERZER, C. R.; FABER, P. W.; MACDONALD, M. E.; YOUNG, A. B.

- Frataxin Gene of Friedreich's Ataxia Is Targeted to Mitochondria . **Ann. Neurol.**, 42 (2): 265 – 269, 1997.

ROSS C. A. - When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases . **Neuron.**, 15: 493 - 496, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. - . Molecular Cloning: A Laboratory Manual . 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHÖLS, L.; AMOIRIDIS, G.; PRZUNTEK, H.; FRANK, G.; EPPLEN, J. T.; EPPLEN, C. - Friedreich's ataxia: Revision of the phenotype according to molecular genetics . **Brain**, 120: 2131 – 2140, 1997.

SCHWARTZ, I. V. D.; JARDIM, L. B.; PUGA, A. C. S.; COCOZZA, S.; LEISTNER, S.; LIMA, L. C. - Clinical and Molecular Studies in Five Brazilian Cases of Friedreich Ataxia . **Arq. Neuropsiquiatr.**, 57 (1): 1 – 5, 1999.

SHEFFIELD, V. C.; BECK, J. S.; KWITEK, A. E.; SANDSTROM, D. W.; STONE, E. M.; - The Sensitivity of Single Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions . **Genomics**, 16: 325-332, 1993.

STRACHAN, T.; READ, A. P. - Human Molecular Genetics . BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.

SYSTAT, W. L. - The system for statistics . Evanston, IL: SYSTAT, 1990

TRABER, M. G.; SOKOL, R. J.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; PAPAS, A. M.; HUFFAKER, J. E.; KAYDEN, H. J. - Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate α -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver . **J. Clin. Inves.**, 85: 397 - 407, 1990.

WALLACE, D. C.; SHOFFNER, J. M.; TROUNCE, I.; BROWN, M. D.; BALLINGER, S. W.; CORRAL-DEBRINSKI, M.; HORTON, T.; JUN, A. S.; LOTT, M. T. - Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging . **Biochim. Biophys. Acta**, 1271: 141 - 151, 1995.

WILSON, R. B.; ROOF, D. M. - Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue . **Nat. Genet.**, 16: 352 - 357, 1997.

9 - ANEXOS

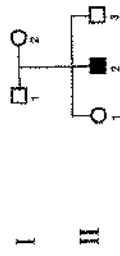
ANEXO 1: Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados.

Legenda dos heredogramas:

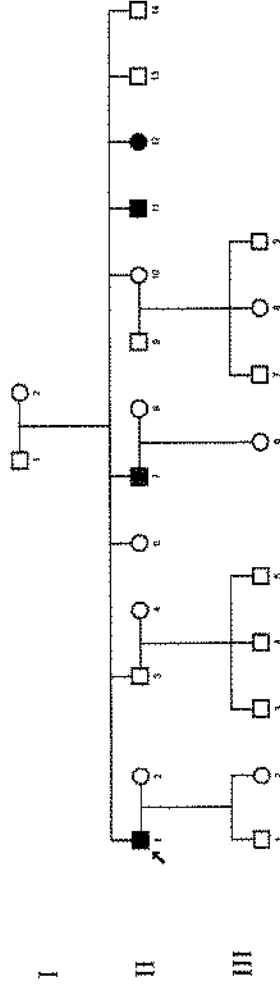
-  Indivíduo do sexo masculino não afetado
-  Indivíduo do sexo feminino não afetado
-  Indivíduo do sexo masculino afetado
-  Indivíduo do sexo feminino afetado
-  Indivíduo do sexo masculino possivelmente afetado
-  Indivíduo do sexo feminino possivelmente afetado
-  Indivíduo do sexo masculino portador de esquizofrenia
-  Indivíduo do sexo masculino portador de esclerose
-  Indivíduo do sexo masculino com perda temporária da capacidade de marcha
-  Indivíduo do sexo feminino portador de ecolalia
-  Indivíduo de sexo desconhecido
-  Aborto

Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

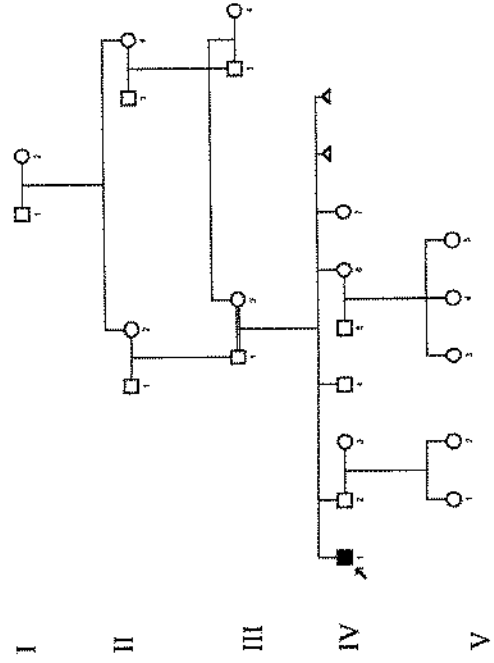
F-04



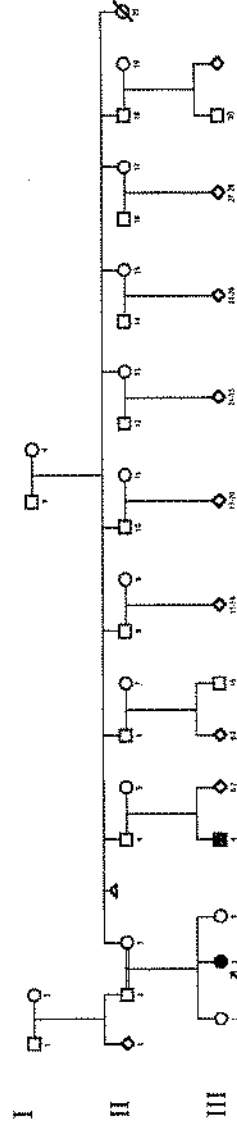
F-05/ positivo para AF



F-06

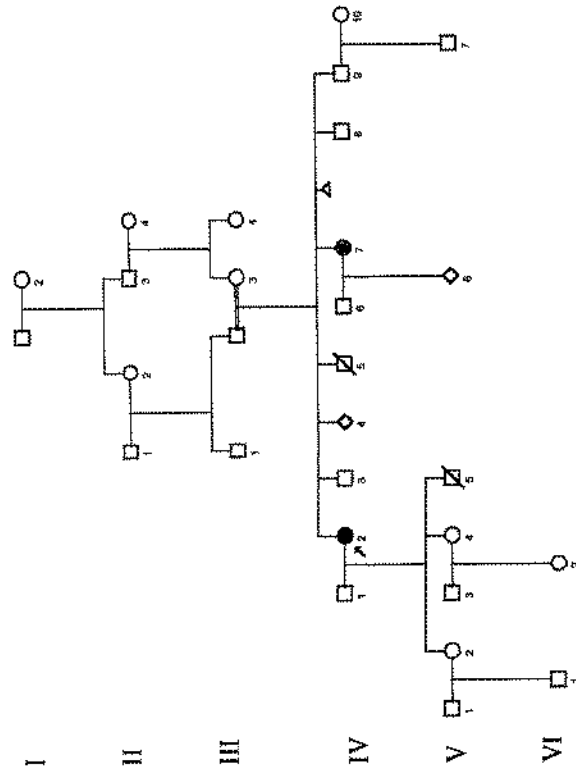


F-07

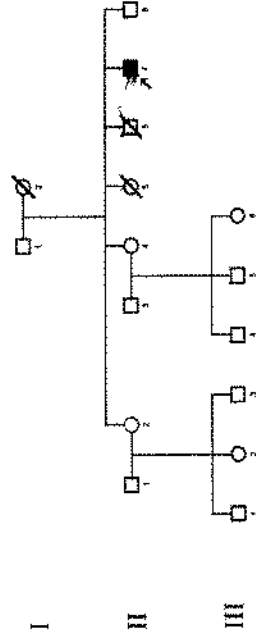


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

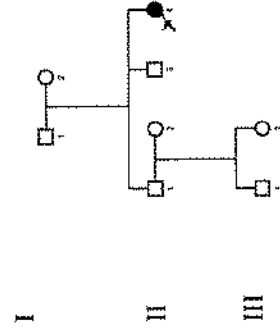
F-9



F-10

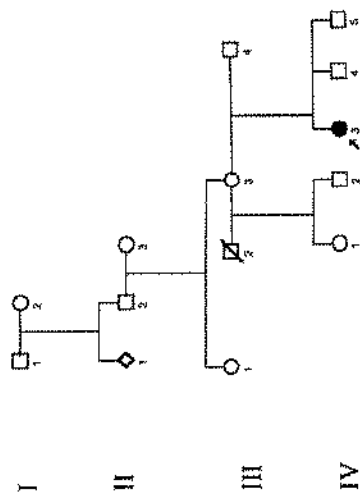


F-11

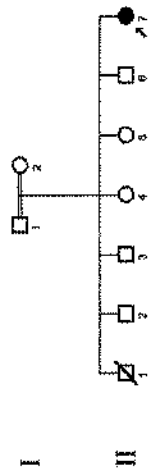


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

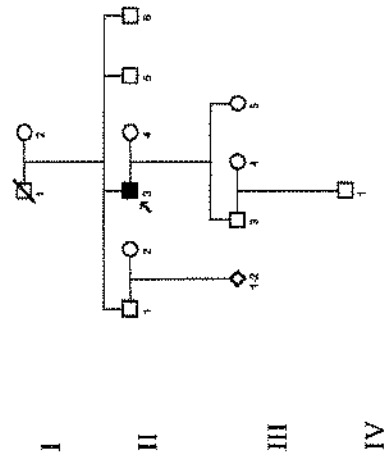
F-16/ Positivo para Af



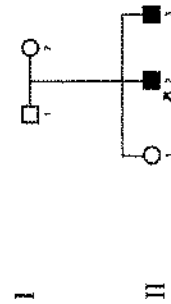
F-18



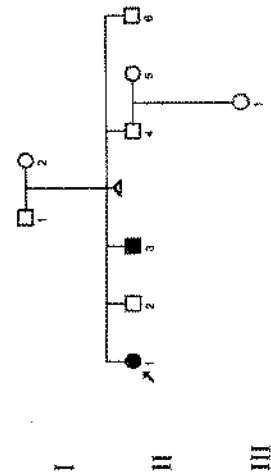
F-19



F-20

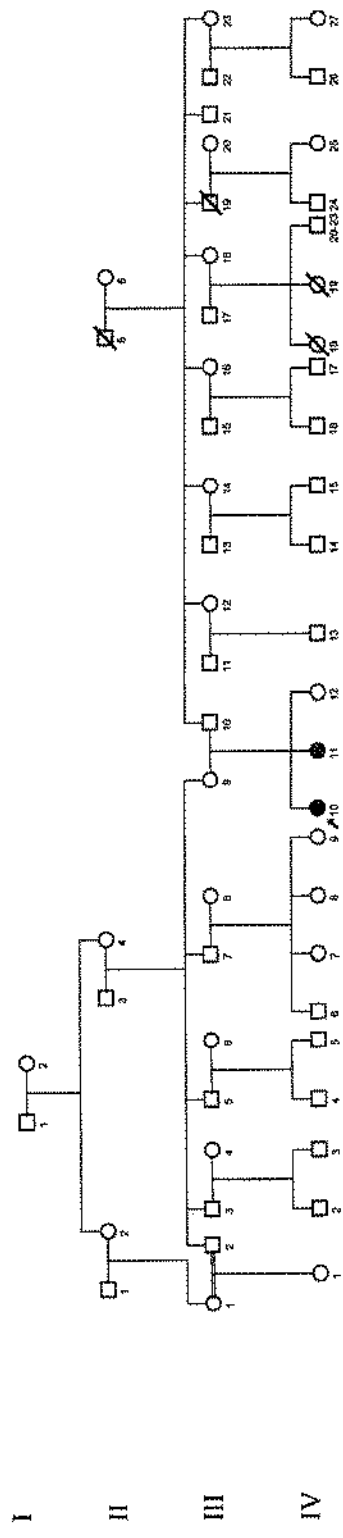


F-17

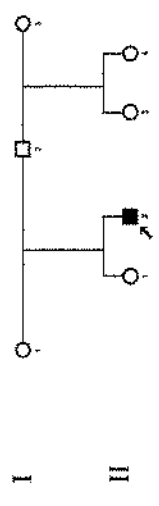


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

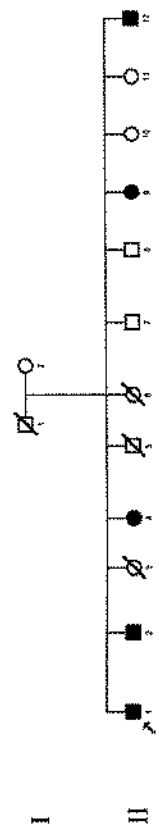
F-21



F-23

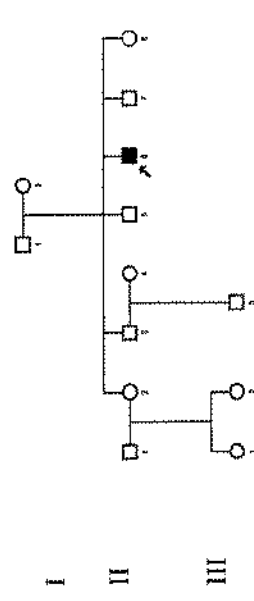


F-22/ Positivo para AF

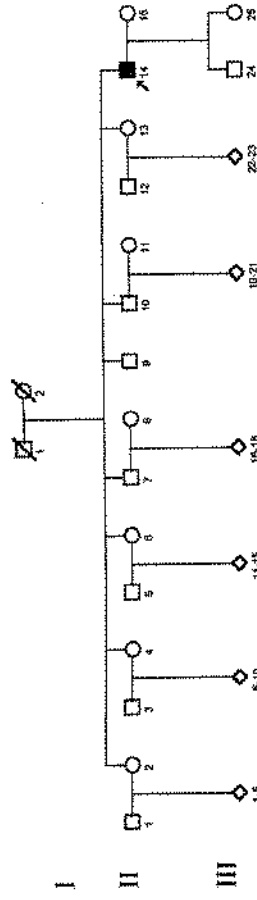


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

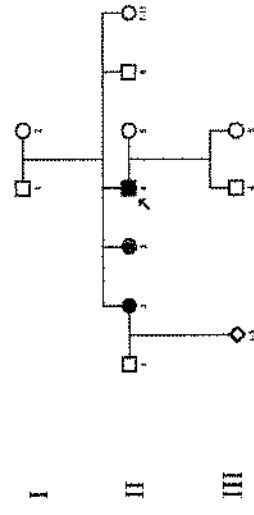
F-26/ Positivo para AF



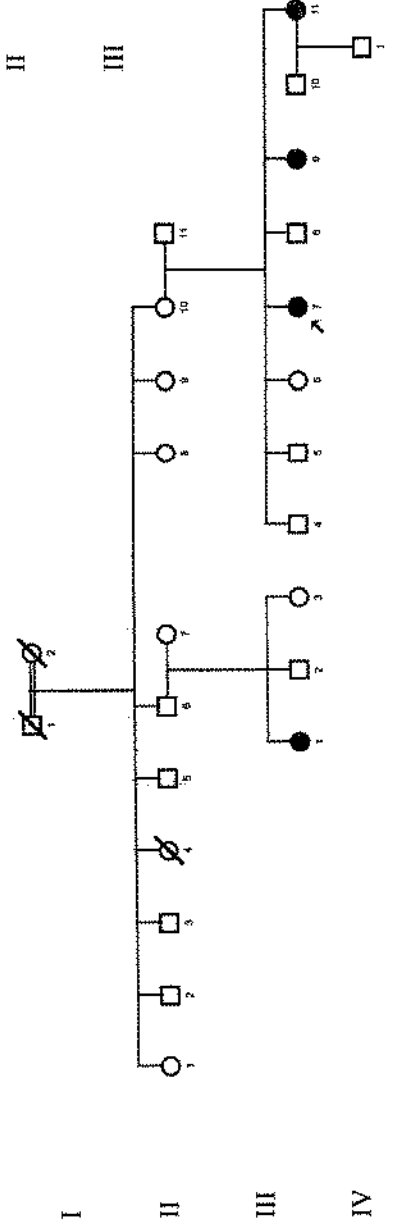
F-24



F-27

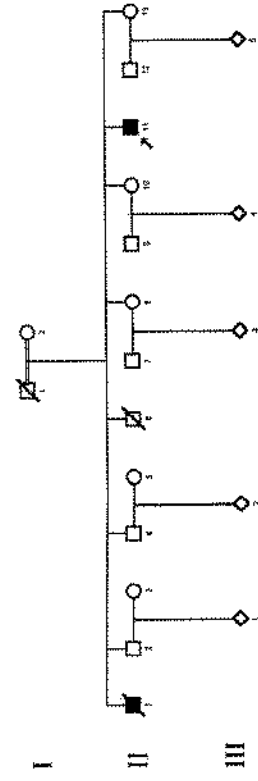


F-25



Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

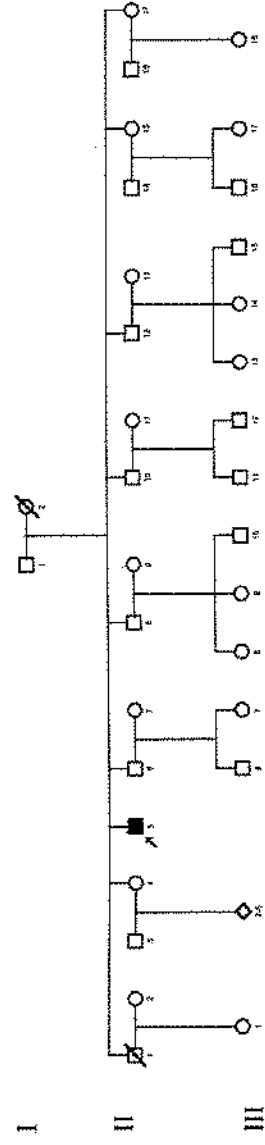
F-29



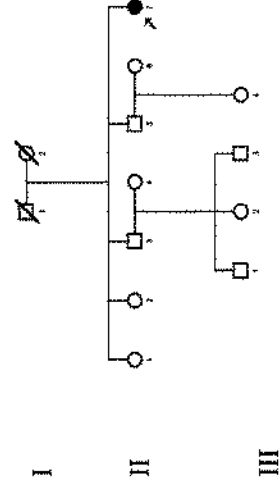
F-31



F-30

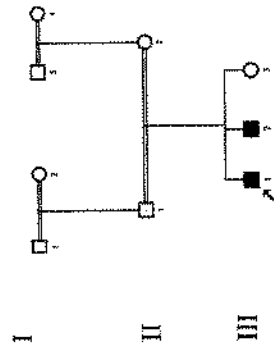


F-32

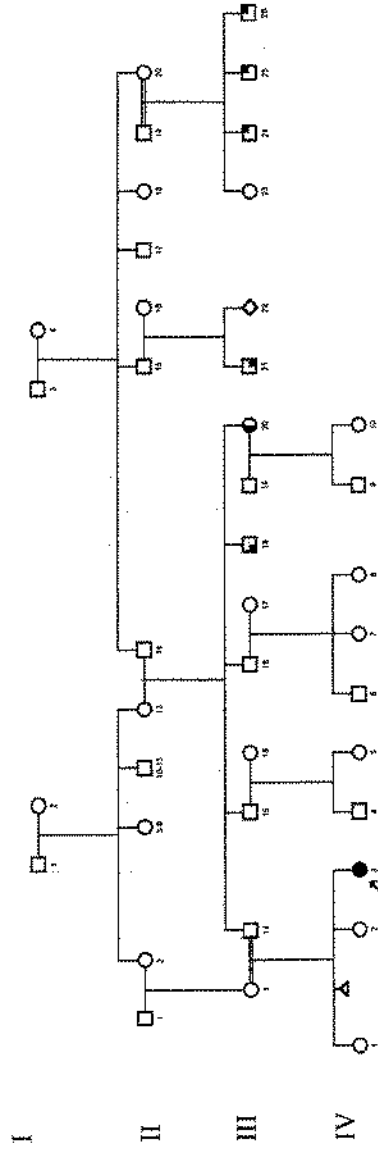


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

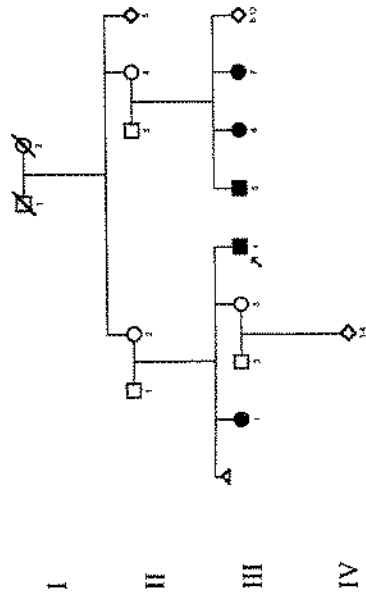
F-33



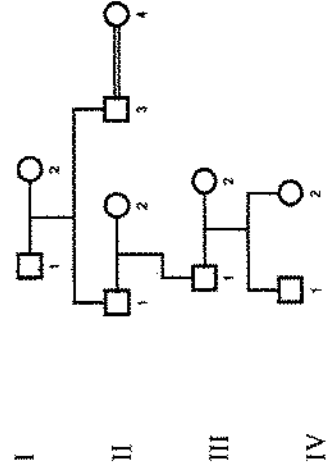
F-34



F-35

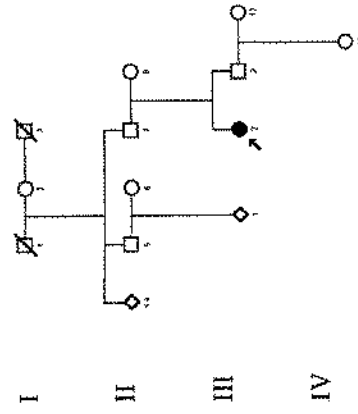


F-36

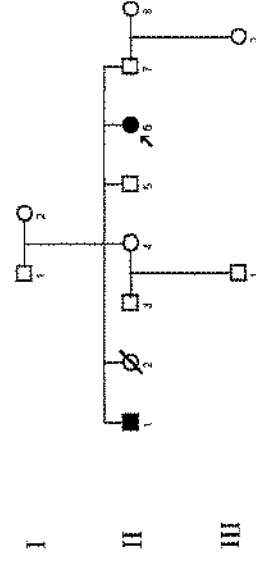


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

F-37



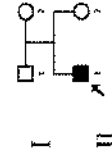
F-39



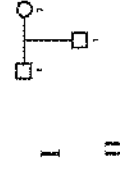
F-38



F-40

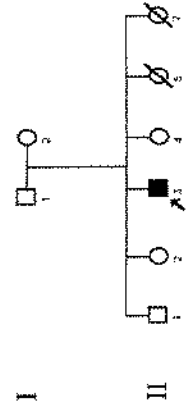


F-41

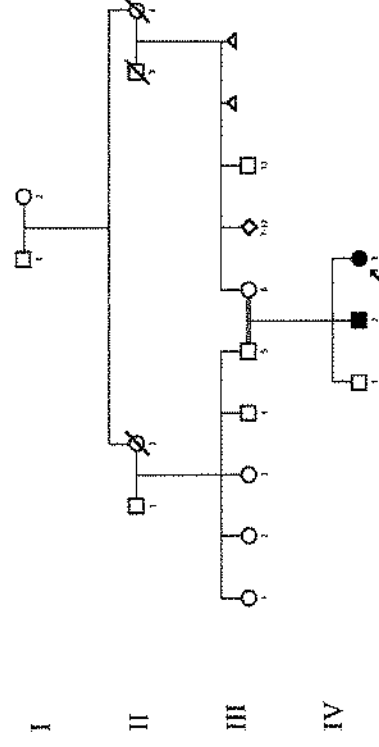


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

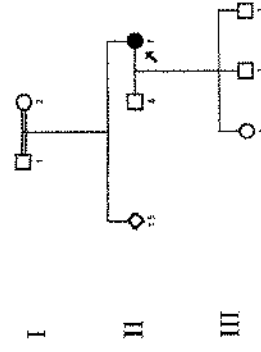
F-42



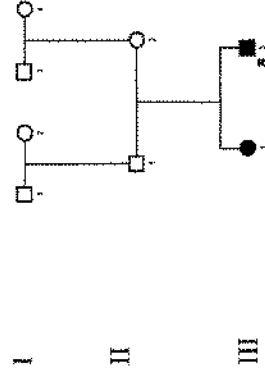
F-43



F-44

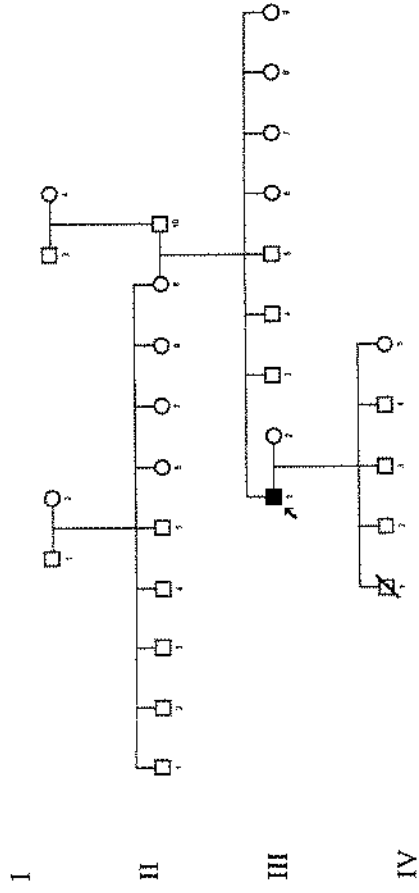


F-45

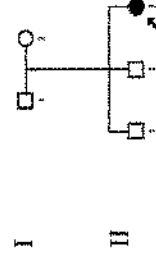


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

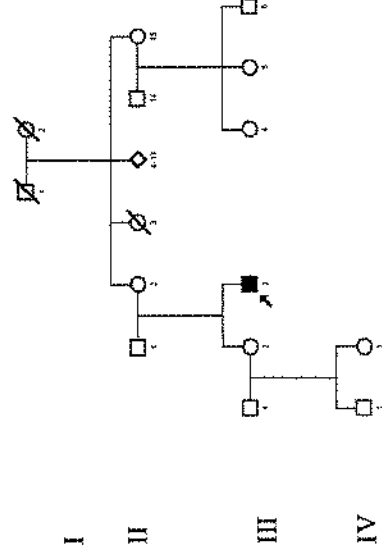
F-47



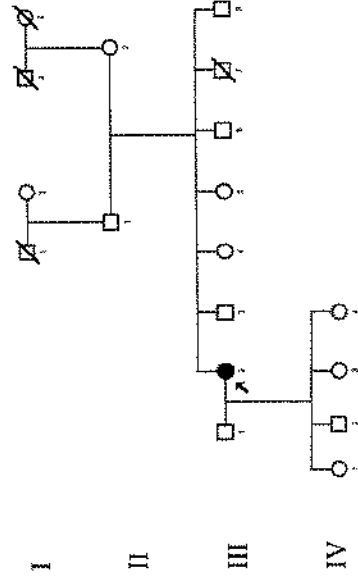
F-49



F-50

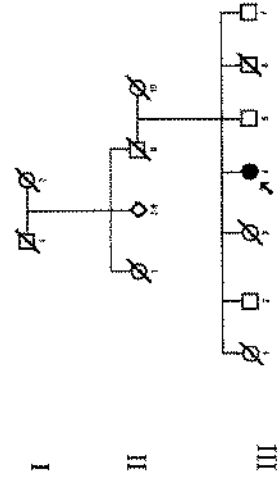


F-48

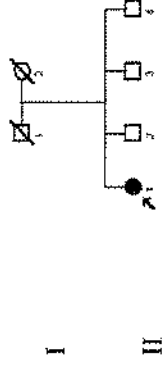


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

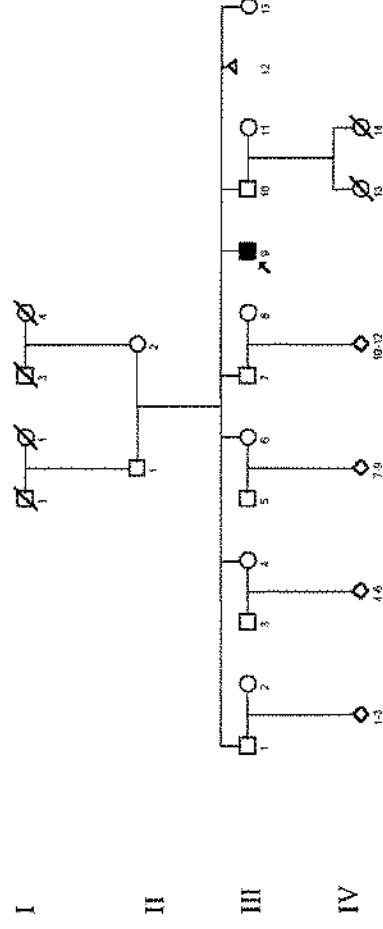
F-51



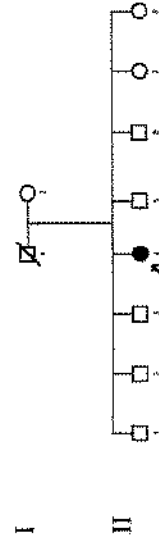
F-53



F-54

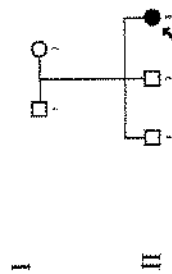


F-52

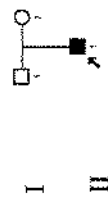


Heredogramas dos Pacientes com Ataxia Espinocerebelar estudados

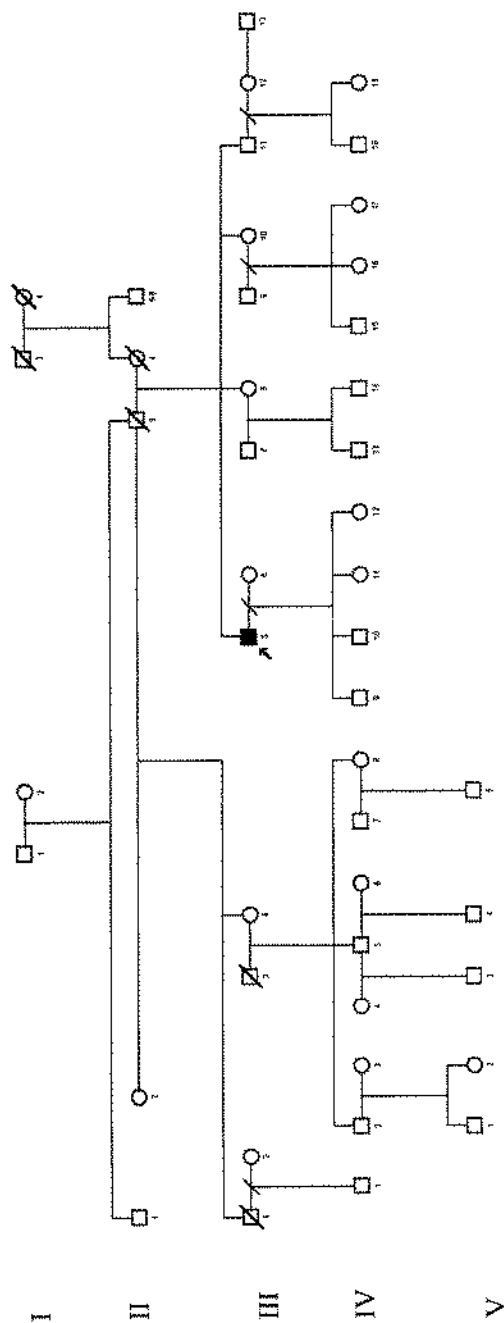
F-55



F-58



F-57



ANEXO 2

Formulário de avaliação clínica utilizado no estudo.



FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM ATAXIA ESPINOCEREBELAR

1. Nome _____
2. HC: _____ 3. DGM: _____
4. Data da consulta: _____ 5. Número no heredograma: _____
6. Origem étnica dos avós: 6.1. Maternos _____ 6.2. Paternos: _____
7. Herança genética: (caso isolado, autossômica recessiva, autossômica dominante, herança materna, herança ligada ao X): _____

8. História Médica Progressiva:

8.1. Diagnóstico de ataxia: Sim () Não () Idade: _____
8.2. Primeiros sintomas: _____ Idade: _____
8.3. Outros sintomas neurológicos: _____
8.4. Outras condições médicas (ex. diabetes, hipertensão, etc.): _____

9. Uso de Drogas ou Medicamentos:

9.1 Bebida alcoólica: _____
9.2 Medicação em uso (incluir dose e por quanto tempo vem tomando): _____

10. Achados Neurológicos:	Sim	Não	Idade de Aparecimento
---------------------------	-----	-----	-----------------------

10.1. Alterações Cognitivas:	_____	_____	_____
------------------------------	-------	-------	-------

10.2. Movimentos Oculares anormais:	_____	_____	_____
-------------------------------------	-------	-------	-------

10.2.1. Nistagmo:	_____	_____	_____
-------------------	-------	-------	-------

10.2.2. Movimentos sacádicos lentos	_____	_____	_____
-------------------------------------	-------	-------	-------

10.3. Diminuição da acuidade visual	_____	_____	_____
-------------------------------------	-------	-------	-------

10.4. Atrofia óptica	_____	_____	_____
----------------------	-------	-------	-------

10.5. Retinite pigmentosa	_____	_____	_____
---------------------------	-------	-------	-------

10.6. Diminuição da acuidade auditiva	_____	_____	_____
---------------------------------------	-------	-------	-------

10.7. Disartria	_____	_____	_____
-----------------	-------	-------	-------

10.8. Disfagia	_____	_____	_____
----------------	-------	-------	-------

10.9. Incoordenação:	_____	_____	_____
----------------------	-------	-------	-------

10.9.1. Membros superiores	_____	_____	_____
----------------------------	-------	-------	-------

10.9.2. Membros inferiores	_____	_____	_____
----------------------------	-------	-------	-------

10.9.3. Marcha	_____	_____	_____
----------------	-------	-------	-------

10.10. Tremor	_____	_____	_____
---------------	-------	-------	-------

10.11. Câimbras musculares	_____	_____	_____
----------------------------	-------	-------	-------

10.12. Fasciculações:	_____	_____	_____
-----------------------	-------	-------	-------

10.12.1. Membros	_____	_____	_____
------------------	-------	-------	-------

10.12.2. Facial	_____	_____	_____
-----------------	-------	-------	-------

10.12.3. Perioral	_____	_____	_____
-------------------	-------	-------	-------

10.12.4. Lingual	_____	_____	_____
------------------	-------	-------	-------

10.13. Sinais extrapiramidais	_____	_____	_____
-------------------------------	-------	-------	-------

10.14. Movimentos involuntários	_____	_____	_____
---------------------------------	-------	-------	-------

10.15. Distonia	_____	_____	_____
-----------------	-------	-------	-------

10.16. Reflexos tendinosos:	Membros superiores:	Normal () Aumentado ()
		Diminuídos () Ausente ()
	Membros inferiores:	Normal () Aumentado ()
		Diminuído () Ausente ()

10.17. Sensibilidade: _____

10.18. CT: _____

10.19. MRI: _____

10.20. EMG: _____

10.21. Autopsia: _____

ANEXO 3

Formulário de consentimento para pesquisa médica aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com ataxia espinocerebelar. O objetivo geral do estudo é o de determinar a frequência e as características moleculares das diferentes formas de ataxia espinocerebelar. Esses estudos poderão levar a identificação do defeito genético que causa a forma de ataxia da qual sou portador. Além de levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado das ataxias espinocerebelares. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares e a informação médica a meu respeito bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com ataxias espinocerebelares. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre as ataxias. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para confirmação do meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a uma tomografia computadorizada ou uma ressonância magnética de crânio. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com ataxia. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares obtidos, serão disponíveis através do meu acompanhamento no Ambulatório de Neurogenética que funciona toda segunda-feira das 8:30 as 12:00hs no 2º andar do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 788-8908. Esse Ambulatório oferece um atendimento multidisciplinar com a participação de geneticista clínico, neurologista, psicólogo(a), assistente social e fisioterapeuta. É importante salientar que qualquer membro da minha família que desejar obter orientação genética poderá ser atendido Ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, e os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos,
desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado,
assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar
desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão
advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma
cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data