

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TEREZA CRISTINA LIMA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DA DOENÇA DE HUNGTINTON
EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

1999

Si38c

38784/BC

Tereza Cristina Lima Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA DE HUNTINGTON EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Farmacologia**

Orientadora: Profª Drª Carmem Sílvia Bertuzzo

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Campinas

1999

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: UNICAMP
Si38c
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 38784
 PROC. 229199
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 30/09/99
 N.º CPD

CM-00126210-4

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

Si38c Silva, Tereza Cristina Lima
 Caracterização molecular da doença de huntington em uma amostra da população brasileira / Tereza Cristina Lima Silva. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Carmem Sílvia Bertuzzo
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Demência. 2. Polimorfismo. 3. Biologia molecular. I. Carmem Sílvia Bertuzzo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dra CARMEN SILVIA BERTUZZO

Membros:

1. Profa. Dra. CARMEN SILVIA BERTUZZO

2. Profa. Dra. EDI LÚCIA SARTORATO

3. Prof. Dr. WALTER PINTO JUNIOR

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 30/07/99

Aos meus pais por todo carinho e dedicação
e a minha família por ensinar a alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Iscia Lopes Cendes, que me acompanhou nesses últimos dois anos, dando-me apoio e contribuindo para minha formação profissional e pessoal. Sempre solicita nas minhas dificuldades acadêmicas, contribuiu de forma significativa para a realização deste trabalho.

A Prof.^a Dr.^a Carmen Silvia Bertuzzo pela oportunidade da realização desse sonho, colaboração e empenho.

A Pro.^{fa} Dr.^a Edi Lúcia Sartorato pela contribuição na minha formação profissional, apoio, dedicação e compressão na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto Jr. Pelo incentivo e colaboração na realização desse trabalho.

A Prof.^a Dr.^a Christine Hackel pelo incentivo e apoio na realização desse trabalho.

Aos Professores do Departamento de Genética Médica pelo incentivo carinho com que sempre me trataram.

Aos colegas do Departamento de Genética Médica pelos momentos de descontração e incentivo e agradável convivência.

As amigas Eugênia , Flávia, Heliane, Rosana e Marilza por tudo.

A Solange e Maria Francisca pelo incentivo e empenho na realização e confecção dos heredogramas.

Aos colegas do HEMOCENTRO pelo apoio e contribuição na realização desse trabalho.

Aos colegas do CEBMEG pelo apoio e contribuição na minha formação profissional

Aos meus familiares pelo apoio incentivo carinho e amizade.

Aos pacientes e familiares pela valorosa colaboração.

ÍNDICES



ÍNDICE GERAL

ABREVIACÕES.....	i
RESUMO.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	4
I.1. Histórico.....	5
I.2. Epidemiologia.....	6
I.3. Neuropatologia.....	10
I.4. Características Gerais.....	11
I.5. Aspectos Moleculares da Doença de Huntington.....	12
I.5.1. O gene IT15.....	12
I.5.2. Mutação do gene IT15.....	13
I.5.3. Mutações Dinâmicas.....	13
I.5.4. A influência do sítio polimórfico CCG na HD.....	14
I.5.5. Variação da sequência CAG em diferentes populações.....	15
I.5.6. Variação da idade de início.....	16
I.5.7. Antecipação.....	18
I.5.7.1. Bases Moleculares da antecipação e instabilidade meiótica.....	18
I.5.8. Genes modificadores.....	20
I.6. Aspectos Bioquímicos.....	22
I.7. Aspectos Éticos.....	24
II. OBJETIVOS.....	26

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	28
III.1. Casuística.....	29
III.2. Metodologia.....	30
III.2.1.Extração de DNA.....	30
III.2.2. Análise do DNA.....	31
IV. RESULTADOS.....	38
V. DISCUSSÃO.....	49
VI. CONCLUSÕES.....	53
VII. APÊNDICE.....	55
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE TABELAS, FOTOS E FIGURAS

Foto 01 - Visualização da repetição CAG em pacientes HD pelo método indireto.....	35
Foto 02 - Visualização da repetição CAG em pacientes HD pelo método direto.....	36
Foto 03 - Visualização da repetição CAG em indivíduos normais pelo método direto.....	37
Tabela 01 - Primers para análise da repetição (CAG) na HD incluindo o sítio polimórfico (CCG) _n (análise indireta do CAG).....	32
Tabela 02 - Condições da PCR para análise do (CAG) _n indireto.....	32
Tabela 03 - Primers para análise da repetição (CAG) _n na HD excluindo o sítio polimórfico (CCG) _n (análise direta do CAG).....	33
Tabela 04 -Condições da PCR para análise do (CAG) _n	33
Tabela 05 - Primers para a repetição (CCG) _n no alelo da HD.....	34
Tabela 06 - Condições da PCR para a análise do sítio polimórfico intragênico (CCG) _n	34
Tabela 07 - Resumo dos resultados obtidos.....	39
Figura 01 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n em alelos normais de pacientes HD.....	41
Figura 02 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n em pacientes HD.....	42
Figura 03 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n em pacientes HD do sexo masculino.....	42
Figura 04 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n em pacientes HD do sexo feminino.....	43
Figura 05 - Frequência da distribuição dos pacientes HD quanto ao tipo de transmissão materna ou paterna.....	44
Figura 06 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n expandida em pacientes HD com transmissão paterna.....	44
Figura 07 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n expandida em pacientes HD com transmissão materna.....	45
Figura 08 - Distribuição da frequência da idade de início dos pacientes HD.....	45
Figura 09 - Correlação entre idade de início e número de repetições CAG. A) Correlação do tamanho da repetição CAG em 32 pacientes HD com a idade de início dos sintomas (coeficiente de correlação de Pearson $r = -0.6$; $r^2 = 0.4$; $p = 0.0001$). B) Ausência de correlação entre a idade de início e o tamanho da repetição CAG nos cromossomos normais ($r = 0.09$; $r^2 = 0.008$; $p = 0.6$).....	47
Figura 10 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG) _n em uma amostra da população brasileira normal.....	48
Figura 11 - Distribuição da repetição trinucleotídica (CCG) _n em uma amostra da população brasileira normal.....	48

Abreviações

HD: Doença de Huntington
CAG: Repetição trinucleotídica (Citosina, Adenina, Guanina)
CCG: Repetição trinucleotídica (Citosina, Citosina, Guanina)
RFLP: Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
Kda: Kilodaltons
RNA: Ácido ribonucleico
Kb: Kilobases
4p16.3: Braço curto do cromossomo 4, na região 16.3
FRAXA: Sítio frágil “A” do cromossomo X
FRAXE: Sítio frágil “E” do cromossomo X
CTG: Repetição trinucleotídica (Citosina, Timina, Guanina)
DM: Distrofia Miotônica
AF: Ataxia de Friedrich
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
Acs: Anticorpos
IINS: Inclusões intranucleares
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
KCl: Cloreto de Potássio
M: Molar
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
rpm: Rotações por minuto
ml: mililitro
µl: microlitro
SDS: Lauril Sulfato de Sódio
RSB: Tampão a base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio
mg: miligrama
°C: grau Celsius
DNA: Ácido desoxirribonucleico
mM: Milimolar
dNTP: Deoxi nucleotídeo trifosfato
dATP: Deoxi adenosina trifosfato
dCTP: Deoxi citosina trifosfato
dGTP: Deoxi guanina trifosfato
µCi: microcurie
^{α32}P: Fósforo ^{α32}
Ci: Curie
mmol: mili molar
DMSO: C₂H₆SO metil sulfoxido
U: Unidades
Taq: DNA polimerase *Termophilis aquaticus*
pb: Pares de base

RESUMO



A doença de Huntington (HD) é uma afecção neurodegenerativa com padrão de herança autossômica dominante caracterizada por demência e movimentos involuntários. O início dos sintomas ocorre em torno dos 40 e 50 anos de idade, progredindo até a morte em um período de cerca de 10 anos após o início da doença. A HD está associada a expansão trinucleotídica CAG presente na porção 5' do gene *IT15*. Nós investigamos a repetição CAG no gene *IT15* em 44 indivíduos brasileiros pertencentes a 34 famílias não relacionadas. Quarenta e dois desses pacientes apresentavam demência e ou movimentos involuntários, dois pacientes eram assintomáticos e pertenciam a uma família com um indivíduo afetado também genotipado. A média da idade de início dos sintomas foi de 39 anos. Um alelo CAG expandido foi encontrado em 32 indivíduos (76%) pertencentes a 25 famílias não relacionadas. Os alelos expandidos variaram de 43 a 73 unidades de repetição CAG e os alelos normais apresentaram uma variação de 18 a 26 unidades de repetição CAG nesses pacientes. Uma significativa correlação negativa foi encontrada entre a idade de início dos sintomas e o tamanho da expansão trinucleotídica CAG ($r=0,6$; $p=0,0001$); no entanto, o tamanho da repetição CAG expandida foi capaz de explicar somente 40% da variação encontrada na idade de início da doença ($r^2=0,4$). Além disso, nós genotipamos um total de 25 indivíduos pertencentes a um grupo controle da população brasileira (50 alelos), sendo que o alelo normal apresentou uma variação de 16 a 33 unidades de repetição CAG. A porcentagem de heterozigotidade do alelo normal na população brasileira controle foi de 88%. É importante notar que existe a possibilidade de superposição entre o tamanho do

alelo normal e expandido, os chamados alelos intermediários. Na **HD** um dos fatores que contribuem para o aparecimento dos alelos intermediários é a presença do polimorfismo

(CCG)_n. Existem algumas evidências de que a frequência desses alelos polimórficos é dependente da origem étnica dos indivíduos^{9,25,26}. Sendo assim para a caracterização da variação do alelo CCG polimórfico na população brasileira foram também analisados 25 indivíduos pertencentes ao controle normal (total de 50 alelos), cujo alelos variaram de 158pb a 185pb (média=167.7), demonstrando uma alta variabilidade polimórfica.

Em conclusão nossos resultados mostraram que nem todos os pacientes com fenótipo “HD” possuíam a expansão CAG no gene *IT15*. Como não foi encontrado, em nossa amostra, nenhum alelo de tamanho intermediário, não tivemos dificuldades para realizar o diagnóstico molecular. Com isso, verificamos que a confirmação molecular do diagnóstico na HD deve ser realizada em todos os casos suspeitos a fim de proporcionar subsídios para um aconselhamento genético adequado.

I-INTRODUÇÃO

I.1.Histórico



A Doença de Huntington (HD) é uma afecção neurodegenerativa que possui padrão de herança autossômica dominante.¹ A HD vem sendo relatada desde 1843, e no decorrer desses 156 anos, recebeu vários nomes devido as regiões ou épocas em que foi descrita. Anteriormente a sua descrição em 1872, por George Huntington, a doença já havia sido descrita na América, Noruega, Inglaterra e Austrália.^{2,3}

Charles O. Water em 1841, em uma correspondência enviada a Robert Duglison, faz menção a uma enfermidade “marcadamente hereditária, muito rara antes da vida adulta, cujos distúrbios de movimento desapareciam durante o sono, evoluindo de forma insidiosa para um quadro demencial e que persistia por toda a vida”. Essa enfermidade relatada por Water desenvolvia-se ao sul do estado de Nova Iorque (EUA) e era popularmente conhecida como “Magrins”. Tal relato foi publicado por Duglison em 1843 na primeira edição de seu livro “The Prattice of Medice”.²

Na França em 1863, Dr. Irving W. Lyon, provavelmente descreve a doença quando em seus relatos faz menção a uma forma de coréia “Migrins” que ocorria em crianças, apresentando história familiar nas cinco últimas gerações.²

Em 1868, na Noruega, duas formas de enfermidades foram descritas uma conhecida como "Arveeskyen" e outra "Rukkjuna". A primeira se iniciava entre 50 e 60 anos, apresentando um curso progressivo e redução dos movimentos anormais durante o sono. A segunda tinha início por volta dos 30 anos, evoluindo para a morte ao longo de 10 a 20 anos.²

Em 1872 George Huntington descreve a doença ,que leva seu nome, ao estudar uma família americana de ascendência inglesa, que apresentava uma patologia que incluía entre outros sinais clínicos, demência progressiva e movimentos coreicos. Assim em 15 de fevereiro de 1872, Huntington apresenta um ensaio para a "Meigs and Mason Academy of Medicine" em Middleport, Ohio, EUA, intitulado "On Chorea" onde identificou e descreveu a coreia hereditária como entidade patológica distinta.^{1,3}

I.2.Epidemiologia



A incidência da HD tem apresentado variações quanto a grupos étnicos, países e regiões dentro de um mesmo continente. Estudos tem demonstrado uma menor incidência entre negros, asiáticos e judeus, em comparação com os brancos caucasianos. Essa variação na frequência geográfica estaria relacionada com a origem étnica da população em questão e da origem da HD naquele país. Estudos genealógicos tem indicado que a HD teria se originado na Europa com a migração do noroeste europeu e se espalhado ao redor do

mundo. Sendo assim uma baixa prevalência da doença seria esperada nas populações que não são de origem européia.^{1,4}

Os mais baixos índices de prevalência da HD foram descritos na China, Japão, Finlândia e entre negros Africanos e têm-se a impressão que esses índices estão diminuindo ano a ano (quadro abaixo).¹

País	Incidência (100.000 hab./ano)
China-1984	0.37
China-1991	0.25
Japão-1957	0.38
Japão-1973	0.45
Japão-1983	0.11

Extensivos estudos no sul da África revelaram que a doença é aproximadamente 40 vezes menos freqüente em africanos negróides do que em Sul Africanos caucasóides. Esses valores são de 10 a 20 vezes menores que a freqüência encontrada na maioria da população européia cuja prevalência varia de 4 a 8 por 100.000 habitantes.^{1,5}

Na Europa as mais baixas taxas de prevalência são encontradas na Finlândia 0,5 , Espanha 1,4 e Bélgica 1,63. Uma prevalência elevada é registrada em Malta e Noruega com índices de 7,8 e 6,7 por 100.000 habitantes respectivamente.¹

Nos Estados Unidos, o índice de prevalência apresenta-se uniforme pelo menos no que diz respeito a população branca com valores que variam de 3 a 5 indivíduos por 100.000 habitantes. Estudos revelaram que a doença também mostrou ser menos freqüente entre negróides do que entre caucasóides americanos. Análises posteriores realizadas por Folstein et.al de forma mais detalhada revelaram que no estado de Maryland a prevalência em negróides era tão similar quanto em caucasóides.^{1,6,7}

Os maiores índices de prevalência da HD são encontrados no Norte da Suécia, em Moray Firth (Escócia), na região do lago Maracaibo na Venezuela e na Tasmânia.^{1,2,8}

País	Incidência (100.000 hab./ano)
Finlândia	0.5
Espanha	1.4
Bélgica	1.63
Malta	7.8
Noruega	6.7
EUA (caucasóide)	3-5

Na Nova Zelândia e Austrália um índice de prevalência uniforme é observado. Estudos realizados em Victória em 1964 revelaram uma prevalência de 4,58 por 100.000 habitantes e em Queslând uma prevalência de 2,3 e 6,3 foi registrada nos anos de 1958 e 1973.¹ Os estudos de prevalência da HD no leste Asiático e África são inconclusivos.¹

Na América do Sul a HD vem sendo descrita em quase todos os países. Os primeiros trabalhos datam de 1890 em Cuba e 1891 no Brasil. Países como Peru e Chile, bem como o Caribe, apresentaram uma prevalência elevada ,porém, é na Venezuela em torno do Lago Maracaibo que se verifica o maior índice da HD, como já descrito anteriormente, não só em comparação com a América Latina como em todo mundo.¹

Índices de mortalidade da HD em diferentes países tem revelado resultados similares no Norte da Europa e no EUA, variando de 1 a 2.25 mortes por milhão de habitantes/ano. Os estudos epidemiológicos nos EUA, tem sido realizados de forma regional no intuito de refletir com mais confiança o padrão de mortalidade, além de ajudar no planejamento dos centros de saúde e de pesquisa. Análises detalhadas de mortalidade da HD entre 1968 e 1974 nos EUA revelaram que os maiores índices de mortalidade são vistos no Sul de Dakota (4,09 por milhão de habitantes/ano) e Wyoming (2,49 por habitantes/ano). O alto índice de mortalidade registrados nos estados da Califórnia, Oregon e Washington refletem provavelmente um aumento da prevalência nessa parte do país. Outros estados como Alasca, Havaí, norte de Dakota, não se detectou qualquer óbito. Nos estudos realizados nos EUA nenhuma diferença quanto ao índice de mortalidade comparada ao sexo do indivíduo tem sido apresentada. Resultados inexpressivos quanto ao índice de mortalidade foi registrado no Novo México com 0,38 por milhão de habitantes/ano.⁶

I.3.Neuropatologia



A característica neuropatológica da HD é a atrofia do corpo estriado, porém outras regiões como o neocórtex, globo pálido, diencefalo, tronco cerebral e a medula espinhal também estão envolvidos com níveis de comprometimento variáveis. Uma redução entre 21% a 31% do peso cerebral é encontrado em pacientes com HD, processando-se de forma difusa e assimétrica ⁹

Devido a alteração gênica nota-se uma vulnerabilidade seletiva das células nervosas e suas estruturas. As estruturas cerebrais onde o fenômeno atrófico é mais evidentes são o núcleo caudado, putâmem, globo pálido e córtex cerebral. O núcleo caudado apresenta um comprometimento mais grave na região dorso medial da cabeça e cauda, seguido de um comprometimento posterior do globo pálido e do putâmem. ^{10,11}

Microscopicamente na HD uma redução de pequenas células ganglionares (goligitipo II) e fibras, com um aumento dos astrócitos fibrosos e oligodendritos constituem características obrigatórias nos achados histopatológicos da doença. Essa redução de células neuronais e o aumento dos astrócitos e oligodendrócitos ocorre primeiramente na porção dorsomedial da cabeça e do núcleo caudado, avançando no sentido ventro-lateral. Contudo há um comprometimento menos intenso da porção lateral em relação a porção medial. ^{1,10,11}

I.4.Características Clínicas



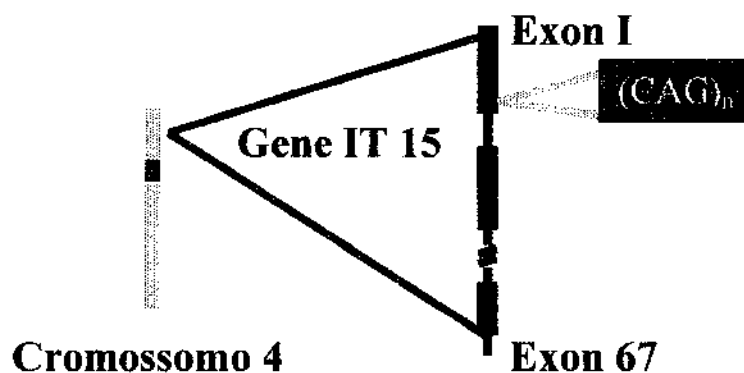
A HD é caracterizada por distúrbios de movimento, coreia, alterações de personalidade, distúrbios emocionais, e demência.^{1,12} Os movimentos involuntários aparecem usualmente no decorrer da doença, sendo mais freqüentes em estágios avançados da HD e tornando-se mais acentuado com a severidade da doença. A rigidez é um sinal inicial proeminente na HD juvenil e nos casos mais avançados. Uma minoria de pacientes com início da doença na idade adulta apresentam esse sinal como sendo o principal sintoma. Bradicinesia e acinesia são características importantes e freqüentes da HD. Não somente elas podem ser características proeminentes tardias no curso da doença, mas também podem ser observadas no curso inicial da doença até mesmo quando o sinal neurológico predominante é coreia. Como regra geral, a demência evolui paralelamente com o distúrbio motor. Eventualmente ela pode surgir antes ou após a coreia, em raros casos pode ser leve ou faltar totalmente. O progresso da doença é lento. Ocorre crescente incapacidade devido aos movimentos involuntários e as alterações mentais, que terminam após muitos anos com morte por infecção intercorrente ou, não raramente por suicídio.^{1,6,12-15}

A idade de início da HD é variável, ocorrendo normalmente entre a terceira e a quinta década de vida, levando o indivíduo a morte num período de 15 a 20 anos ⁴. A gravidade da doença está diretamente relacionada com a precocidade de instalação da mesma. Desse modo, os casos juvenis principalmente aqueles de transmissão paterna, apresentam um prognóstico mais grave.^{1,7,15}

I.5.Aspectos Moleculares da Doença de Huntington

I.5.1.O gene IT15

No início da década de 80 através de estudos de ligação de RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), o gene da **HD** foi identificado no braço curto do cromossomo 4, mais especificamente na região 4p16.3^{16,17} (esquema abaixo). Este gene possui 210 kb com 67 exons, cujo RNA mensageiro codifica uma proteína com 348 Kda denominada huntingtin.^{18,19}



I.5.2.Mutação do gene IT15

A mutação responsável pela doença apresenta um segmento de poliglutamina aumentado devido a presença de uma repetição trinucleotídica (CAG)_n expandida na porção 5' do gene IT15 na região codificadora do mesmo¹⁸ (esquema anterior). Indivíduos normais apresentam alelos que podem variar de 8 a 35 unidades de CAG, portanto polimórficos. Por outro lado, indivíduos afetados possuem alelos com **mais de 40 unidades CAG**¹⁸⁻²¹. Uma relação inversa entre a idade de início e o número de repetições é observada, sendo esta, mais evidente em pacientes juvenis, principalmente quando a transmissão da doença se faz via paterna.²²⁻²⁶ Entretanto, o valor do número de repetições na determinação do prognóstico e na idade de início da doença, necessita ser melhor estabelecido²⁷

I.5.3.Mutações Dinâmicas



A HD pertence a um grupo de doenças causadas por trinucleotídeos que começaram a ser identificadas a partir de 1991 com a clonagem do gene responsável pela Síndrome do X-Frágil. Essas mutações são caracterizadas por diferentes tipos de seqüências de trinucleotídeos que são instáveis durante a transmissão gênica. Essa nova classe de mutações tem sido dividida em três categorias de acordo com o tipo de trinucleotídeo

envolvido, sua localização estrutural no gene causador da doença e seu possível mecanismo de ação no processo patológico. São elas: 1) a primeira categoria envolve as grandes mutações de trinucleotídeos (CCG)_n, muito instáveis, associadas a sítios frágeis, como na Síndrome do X-Frágil (FRAXA e FRAXE). 2) na segunda, temos as grandes expansões de trinucleotídeos (CTG)_n localizados no terminal 3' da região não codificadora do gene DMPK causando a Distrofia Miotônica (DM). 3) a terceira, envolve as expansões moderadas de trinucleotídeos (CAG)_n localizadas nas regiões codificadoras dos genes causadores de doenças neurodegenerativas. Mais recentemente, com a clonagem do gene responsável pela Ataxia de Friedreich (AF) uma quarta categoria de mutações dinâmicas foi descrita.^{1,28}

I.5.4.A influência do sítio polimórfico CCG na HD



A maioria das análises que definiram o limite do tamanho do alelo normal e expandido da repetição CAG empregavam técnicas de PCR que incluíam uma repetição CCG considerada invariante, presente no gene IT15, logo após a repetição CAG polimórfica. Muitos desses experimentos revelaram uma sobreposição entre o alelo normal e o alelo expandido.¹⁸⁻²⁰

Estudos posteriores revelaram que o tamanho da extensão CCG variava de 7 a 12 repetições na população normal, sendo portanto, também polimórfico. Isso sugeriu que os limites do tamanho do alelo normal e expandido deveriam ser reavaliados com análises que excluía a repetição CCG polimórfica.^{18,29}

Assim esse polimorfismo intragênico na região do gene IT15 que contém duas extensões ricas em CCG é consideravelmente importante na confirmação do diagnóstico, principalmente nos casos onde o número de repetições variava entre 35 e 40 CAG_s.²⁹⁻³²

Com as análises populacionais e familiares da mutação presente na HD, novos estudos apresentaram uma série de métodos importantes e significativos para a caracterização dessa mutação. Análises diretas passaram a ser realizadas com a utilização de *Primers* internos específicos tanto para a extensão (CAG)_n quanto para (CCG)_n.³²

I.5.5. Variação da seqüência CAG em diferentes populações



De forma geral a expansão CAG presente no gene IT15 tem no mínimo 17 alelos diferentes, podendo variar entre a população normal de 11 a 34 CAG_s.

Estudos realizados na população alemã demonstraram uma frequência de heterozigotidade de 87% com 18 alelos que variavam de 11 a 37 trinucleotídeos. Entre os alelos expandidos a variação foi de 42 a 66 CAG_s. Desse total 29% dos alelos expandidos encontravam-se entre 37 e 41 trinucleotídeos, 59% entre 42 e 47 CAG_s. Apenas 12% das

expansões apresentaram alelos acima de 48 CAG_s, o que difere de outras populações onde o percentual chega a 59%.³³

As maiores prevalência encontradas em famílias escocesas foram de 16 CAG_s para os alelos normais e 41 CAG_s para os alelos expandidos. Os alelos normais apresentaram uma variação de 8 a 33 CAG_s e os expandidos de 35 a 62 CAG_s. Apesar de nenhuma sobreposição ter sido encontrada nessa população, verificou-se nesse estudo a presença de um indivíduo clinicamente afetado para HD portando dois alelos normais.³⁴

A população chinesa apresenta uma variação muito estreita se comparada a população Americana e Européia. A distribuição da expansão CAG encontrada nessa população aproxima-se da população Japonesa e Africana. Os alelos expandidos apresentaram uma variação de 40 a 45 CAG_s em 65,7 % dos casos e alelos acima de 50 CAG_s em apenas 17,1 %. Os alelos normais apresentaram uma frequência em torno de 17 CAG_s. Nenhuma sobreposição de alelos foi encontrada na população chinesa.³⁵

I.5.6. Variação da idade de início

Um fato relevante na análise da idade de início seria a imprecisão em se detectar a mesma o que dificulta a sua correlação com o tamanho da expansão CAG.³⁶

A variabilidade da idade de início na HD tem sido atribuída a heterogeneidade mutacional bem como a influência genes modificadores.³⁷⁻³⁹ De forma geral, estudos revelam que a extensão da sequência CAG é responsável por apenas 50% da variação na idade de início. Na forma juvenil quando analisada separadamente o tamanho da sequência CAG passa a ser responsável por 73% na variação da idade de início da doença. Sendo assim a associação entre a idade de início e o tamanho da expansão parece ser relevante para doentes cujos sintomas tiveram início antes dos 25 anos.⁴⁰

A contribuição da sequência CAG na determinação da idade de início, será tão menor, quanto menor for o tamanho da sequência. Assim a relação entre o tamanho da repetição CAG e a idade de início, pode ser vista em 20% dos casos quando o tamanho da sequência for menor ou igual a 52 repetições.²⁰

Nos casos de início tardio cujo aparecimento dos sintomas ocorre por volta dos 50 anos de idade, com uma frequência que gira em torno de 10 a 25% dos casos, apenas 7% da variação da idade de início está relacionada com a expansão CAG.³⁶

Sendo assim, outros fatores, que não o tamanho da sequência CAG, podem estar envolvidos na determinação da idade de início, principalmente para aqueles indivíduos cujo aparecimento dos sintomas ocorre após os 50 anos de idade.³⁷⁻³⁹

Vale aqui ressaltar que o tamanho da expansão CAG apesar de apresentar uma certa correlação com a idade de início, o mesmo não pode ser dito quanto ao tipo de sintoma apresentado no início da doença, nem quanto a progressão da mesma.

I.5.7. Antecipação



A antecipação é definida como um fenômeno em que a severidade de uma doença hereditária é aumentada em sucessivas gerações de uma família afetada. A antecipação vem sendo observada em doenças neuropsiquiátricas desde o século 19, no entanto o primeiro estudo abrangendo fenômeno de antecipação foi realizado em 1911 por Mott.⁴⁰ O primeiro artigo sobre antecipação foi publicado em 1919 sobre DM.⁴¹ Em 1948 Penrose defendeu a hipótese de que a antecipação descrita na DM era apenas um artefato estatístico.⁴² Penrose argumentou que a antecipação aparente na DM veio puramente de um resultado de diversas dados claramente induzidos. Durante 40 anos a antecipação foi desconsiderada.⁴² Somente após a descoberta do gene da DM em 1992 é que a antecipação voltou a ser discutida e revista.⁴³

I.5.7.1. Bases Moleculares da antecipação e instabilidade meiótica



A antecipação está associada com a amplificação progressiva da repetição trinucleotídica específica de cada doença e a origem do gene.

O mecanismo biológico do fenômeno de antecipação na HD é desconhecido. Estudos quantitativos tem confirmado que tanto a antecipação quanto a diferença na origem do gene são mediados principalmente pelo número de repetições trinucleotídicas CAG. Duas hipóteses sugerem a explicação para a antecipação na HD: 1) inversa correlação entre idade de início e número de repetições CAG e 2) instabilidade meiótica das repetições CAG expandidas com tendência para futuras expansões.

A antecipação foi descrita tanto na Síndrome do X-frágil quanto na DM (Distrofia Miotônica), bem como na HD entre outras.⁴³ Na Síndrome do X-frágil e na DM o tamanho da amplificação está associado com o fenótipo, enquanto que na HD a idade de início da doença está relacionado com o número de repetições CAG.¹

Nessas doenças as expansões trinucleotídicas podem exibir notável variação tanto dentro das células de um mesmo indivíduo quanto entre membros de uma mesma família. Nas doenças de repetição trinucleotídica, como a Síndrome do X-frágil e a DM, onde o tamanho da repetição é muito maior que na HD, há considerável evidência de que a instabilidade genética afeta tanto células somáticas quanto células germinativas. A extensão vista na repetição HD é muito menor que nessas outras doença, não sendo surpreendente que a instabilidade somática na HD pareça ser menos significativa.⁴⁴

O risco de uma prole afetada nessas doenças pode depender do sexo do transmissor (genitor). Na HD a expansão do alelo associado com o decréscimo da idade de início ocorre preferencialmente durante a transmissão paterna enquanto que na Síndrome do X-frágil e na DM o aumento da amplificação é predominantemente resultante de eventos meióticos maternos.⁴⁵ A instabilidade meiótica da repetição durante a espermatogênese sugere ser a

principal causa da antecipação masculina e da transmissão paterna nos casos de HD juvenil, antes da subsequente instabilidade somática durante o desenvolvimento embrionário. O principal achado desses estudos é que a média do número de repetições encontradas em análises “espermáticas” é muito maior que aquela encontrada no sangue dos mesmos indivíduos.²⁶

I.5.8. Genes modificadores



Com a recente descoberta do gene e da mutação envolvida na HD, vários estudos vem sendo realizados quanto a probabilidade de outros locus gênicos desempenharem um importante papel na expressão e patogênese da doença.

A primeira tentativa sistemática para análise de dados na variação quantitativa na HD foi realizada por Bell (1934), esse estudo foi a base não somente de uma correta distribuição da idade de início e morte, mas de análises detalhadas de variância.⁴⁶ Bell calculou coeficientes de correlação da idade de início de pares irmão-irmão e pares pai-filho com HD, e obteve valores de $r=0,465$ e $r=0,593$, respectivamente. Observou-se também, que as diferenças na idade de início em uma mesma genealogia foi quase tão grande como aquela entre famílias diferentes.⁴⁶ A interpretação de Haldene sobre esses dados de Bell foi que se o mesmo gene principal era responsável por todos os casos de HD, haveriam mais genes modificadores que explicariam as diferenças na idade de início da doença.³⁷

Haldene, em 1941 sugeriu que a heterogeneidade clínica entre indivíduos de diferentes famílias poderia ser devido a vários fatores: 1) locus heterogêneos, com diferentes genes causando a doença em diferentes famílias, mas sem nenhuma variabilidade entre as famílias; 2) genes modificadores, que não seriam suficientes para causar a doença mas poderiam modificar o fenótipo da doença em diferentes famílias, ou em indivíduos de uma mesma família; 3) fatores ambientais que afetariam a expressão do gene principal causando a doença.³⁷

Farrer et al., desenvolvendo a sugestão prévia de French (1980), propôs que genes normais envelhecidos afetando a degeneração normal no gânglio basal poderia estar envolvido, e que esses seriam provavelmente não alelos a HD porque, se fossem, eles poderiam não ser compartilhados pelo irmãos discordantes da HD.³⁸

Assim bem antes do reconhecimento da mutação HD, já era claro que nem toda variação genética na HD poderia ser atribuída somente ao locus HD. Estudos de correlação entre o tamanho da repetição CAG, idade de início da HD e outras características fenotípicas tem confirmado isso, embora a repetição CAG seja responsável pela maioria dos casos de origem paternas diferentes e de antecipação vista na transmissão paterna, ela tem sido estimada na confirmação de apenas metade dos casos de toda variação de idade de início, e nos casos de início tardio de apenas 7%.^{40,41}

Seguindo a sugestão de que genes normais envelhecidos podem estar envolvidos na HD, o mesmo grupo iniciou um estudo de indivíduos de risco para HD para analisar a variação de uma série de testes psicológicos relevantes para o envelhecimento. Vários desses dados mostraram correlação com idade de início dos parentes afetados.⁴² Como

genes específicos envolvidos no processo de envelhecimento e outras funções principais do sistema nervoso central são identificados, seria também possível testar se esses estão significativamente envolvidos na HD.¹

I.6.Aspectos Bioquímicos



O gene da **HD** se expressa em uma grande variedade de células.²⁰ A huntingtin está presente em todas as estruturas do cérebro e tecidos da periferia. No cérebro, a expressão da huntingtin é predominantemente neuronal⁴². Até o momento, a função do gene, bem como seu defeito bioquímico, ainda permanecem desconhecidos⁴⁷. Não se concluindo ainda, se a proteína mutante provoca a doença por ganho ou perda de função. Em experimentos onde a inativação dos genes normais em modelos animais, os heterozigotos eram fenotipicamente normais e não apresentavam as alterações neuropatológicas do HD adulto, enquanto os homozigotos apresentavam uma gastrulação anormal entre o 7º e o 8º dia da embriogênese e eram absorvidos entre o 8º e o 9º dia. Estes estudos levam a concluir que a proteína huntingtin é de fundamental importância no desenvolvimento embrionário antes mesmo do aparecimento do sistema nervoso.^{1,48,49}

A expansão (CAG) no gene IT15 não altera o processo de transcrição e tradução do gene na HD, portanto, a produção da proteína huntingtin é normal.

Com estudos envolvendo anticorpos (Acs) monoclonais específicos a 4 regiões distintas da proteína, verificou-se que a expressão do gene ocorre em todos os tecidos porém, sua expressão mais evidente é no cérebro e nos testículos.⁵⁰

A nível cerebral, de acordo com a região analisada, verificou-se diferenças quanto aos índices de expressão gênica da huntingtin embora estatisticamente não significativos. Esses achados não podem ser sobrepostos ao padrão neuropatológico da HD, onde no corpo estriado a expressão da huntingtin não é maior que a observada em outras regiões cerebrais normais. A expressão do RNA mensageiro do gene IT15 é observada praticamente em todos os neurônios estriais, e tanto os grandes interneurônios colinérgicos como os interneurônios médios apresentam padrão de expressão equivalente.^{1,51}

Em contra partida estudos realizados por um grupo Suíço, envolvendo anticorpos ligados a região NH₂-terminal da proteína huntingtin foram testadas quanto ao acúmulo seletivo da mesma em neurônios que se degeneram. Embora haja a formação das inclusões intracelulares (IINs), a proteína encontra-se presente no conjunto protéico total mas não na fração nuclear.⁵²

Na verdade o que ocorre é que fragmentos da proteína huntingtin, migra para o núcleo contribuindo para a formação dos IINs.^{53,54}

I.7. Aspectos Éticos



Com os recentes avanços da Genética Molecular, tem se tornado possível a realização de testes genéticos que podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico clínico da HD através da presença da expansão CAG no gene IT15. É a primeira vez na ciência médica que nos vemos diante de testes altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico de doenças genéticas de início tardio. Não se pode negar o acesso de indivíduos sintomáticos ou a risco a essa tecnologia, porém muita cautela deve ser tomada durante o processo de aconselhamento genético desses indivíduos, já que fatores emocionais muito complexos estão envolvidos.^{18,55-60}

Uma vez confirmado a hipótese diagnóstica de HD através da análise molecular, o resultado recai sobre toda família, uma vez que há 50% de probabilidade dos descendentes desenvolverem a doença.

Até o momento não existe nenhuma medida terapêutica que possa evitar o aparecimento dos sintomas ou retardar a evolução dessa doença. Por essa razão tem sido enfatizado pela comunidade médica e científica mundial a necessidade de se compor um conjunto estruturado e apropriado de medidas que promovam um suporte e uma preparação adequada para os interessados em se submeterem ao teste preditivo da HD.

Algumas recomendações básicas para a utilização do teste preditivo da HD foram descritos por um comitê composto por representantes da INTERNATIONAL

HUNTINGTON ASSOCIATION (IHA) e da WORLD FEDERATION OF NEUROLOGY (WFN). Entre as recomendações para a realização do teste para a detecção precoce da HD o qual envolve aspectos de aconselhamento pré e pós teste, podemos citar: 1) procura espontânea, 2) privacidade das informações, 3) aplicação do teste somente em indivíduos que já alcançaram a maioridade, 4) fornecimento de informação com avaliação psicossocial pré e pós teste com acompanhamento e 5) privacidade das informações entre outros.⁶¹

É importante salientar que ainda não existe nenhum estudo sobre esses aspectos na população brasileira e que fatores sócio-culturais são relevantes para uma melhor adequação do protocolo as necessidades dos usuários locais, como demonstrado por diferenças entre padrões de utilização, motivações e respostas entre usuários da América do Norte e Europa.⁶²

Ampliar o conhecimento sobre as possíveis implicações do teste preditivo para o indivíduo em risco e seus familiares, é fator importante para que a sua utilização seja cada vez mais apropriada.

Para assegurar que toda a manipulação da informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos e amostras de sangue de DNA são aqui identificados por um código comum fornecido no ingresso do indivíduo na pesquisa. A chave de identificação entre o nome do indivíduo, seu dossiê clínico e amostra de DNA será conhecido pelo clínico responsável pelo atendimento direto do paciente e pelo conselheiro genético responsável. Informações geradas nesse projeto que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos já sintomáticos, foram comunicadas aos profissionais responsáveis pelo tratamento direto dos pacientes.

II-OBJETIVOS

- 1 - Caracterização molecular da expansão $(CAG)_n$ nos indivíduos portadores da HD, previamente diagnosticados clinicamente.
- 2 - Comparação entre o diagnóstico clínico e molecular.
- 3 - Correlação entre características fenotípicas e genotípicas na HD.
- 4 - Análise da distribuição da repetição $(CAG)_n$ presente no gene IT15 em 50 alelos pertencentes a população normal.
- 5 - Análise da distribuição do polimorfismo $(CCG)_n$ intragênico em 50 alelos pertencentes a população normal.

III-CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1. Casuística:

A casuística foi composta por 44 indivíduos pertencentes a 34 famílias não relacionadas, enviados pelo ambulatório com suspeita clínica para **HD** com ou sem história familiar da doença. Quarenta e dois desses pacientes apresentavam demência e ou movimentos involuntários, dois desses pacientes eram assintomáticos e pertenciam a uma família com um indivíduo afetado também genotipado. Desses 44 indivíduos analisados, 28 eram do sexo feminino (63,5%) e 16 do sexo masculino (36,5%). Todos possuíam padrão de herança autossômica dominante, exceção de 8 pacientes que pertenciam a casos isolados(apêndice 03). A identificação desses pacientes foi realizada no Ambulatório de Neurogenética (cód. 26.066) do Hospital das Clínicas da Unicamp, em funcionamento desde agosto de 1997 sob a supervisão da Dr.^a Iscia T.Lopes Cendes. Para a realização desse projeto contamos também com a colaboração de outros centros de referência no país. Além da história familiar e informações para construção do heredograma, foi colhido do paciente, quando este o consentiu (apêndice 01), 20ml de sangue através de punção endovenosa . Amostras de indivíduos assintomáticos não foram colhidos para a realização desse projeto.

Para análise da variação do sítio polimórfico CAG e CCG na população brasileira normal, foram estudados 50 alelos pertencentes a 25 indivíduos não relacionados.

III.2. Metodologia

III.2.1-Extração de DNA

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 porção intermediária onde estavam localizados os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1× (Tris 0,01M, KCL 0,1M, MgCl₂ 0,01M) até completar o volume de 11ml e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada à 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10%, 500 µl de RSB 1X e 60µl de proteinase K(100 mg/ ml) foram adicionados a amostra, e esta incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação foi acrescentado três ml de fenol, seguido de centrifugação à 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5ml de fenol e 1,5ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (24:1), seguido de 3ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (24:1). O DNA genômico foi então precipitado com 6ml de etanol absoluto.⁶³ Este protocolo utilizado em nosso laboratório, além de fornecer bons resultados, proporciona uma maior concentração de DNA com baixo custo.

III.2.2- Análise do DNA

Os fragmentos de DNA contendo a repetição $(CAG)_n$ e $(CCG)_n$ foram obtidos pela amplificação *in vitro* através da PCR (" *Polymerase Chain Reaction* "). Essa técnica baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento de DNA que é flanqueado por dois iniciadores ou *Primers* (oligonucleotídeos curtos), que se hibridizam com os filamentos opostos da sequência alvo e desencadeiam a síntese da fita de DNA complementar pela enzima *Taq* DNA polimerase. Ciclos repetidos de desnaturação pelo calor, hibridização dos *primers* e síntese enzimática de DNA resultaram na amplificação exponencial da sequência de DNA alvo. A reação da PCR foi composta por 100ng de DNA, tampão Armersham 1X, 1,6 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 4 pmol de cada primer, 1uCi de αP^{32} dCTP (3000 Ci/mmol, Armesham), 5% de DMSO, 0,2 U Perfect Match (Stratagene) e 0,5 U *taq* DNA polimerase (Armersham) ⁶⁴. Essas amostras foram submetidas a condições ideais de temperatura para o conjunto de *Primers* utilizado nesse trabalho. Os produtos da PCR foram então submetidos a eletroforese em géis de sequenciamento por aproximadamente 4 horas. A leitura dos alelos foi feita por auto-radiografia após 3 dias de exposição a filmes de raio X, a temperatura ambiente.

Para investigação molecular dos alelos **HD** quanto ao número de repetições trinucleotídicas $(CAG)_n$ as amostras de 44 indivíduos foram submetidas a análise indireta (**tabela 01e 02**) que incluía o sítio polimórfico CCG(Foto 1) e análise direta (**tabela 03 e 04**) com apenas o seguimento que contém a repetição trinucleotídica CAG (Foto 2).^{34,65} Uma investigação da variação e da distribuição do alelo normal para a repetição trinucleotídica CAG e CCG na população brasileira normal foi aqui estudada analisando-se

apenas a sequência direta de cada um desses sítios polimórficos no total de 50 alelos investigados.

Tabela 01 - *Primers* para análise da repetição (CAG) na HD incluindo o sítio polimórfico (CCG)_n (análise indireta do CAG).

Primers	Sequência
Hu4_(sense)	5' ATG GCG ACC CTG GAA AGC TGA TGA A 3'
Hu3_(antisense)	5'GGC GGC TGA AGG AAG CTG AGG A 3'

Tabela 02 - Condições da PCR para análise do (CAG)_n indireto.

Temperatura			
N.º de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
30	94°C	50°C	72°C

Tabela 03 - Primers para análise da repetição (CAG)_n na HD excluindo o sítio polimórfico (CCG)_n (análise direta do CAG).

Primers	Sequência
HD1 (<i>sense</i>)	5' (ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC)
HD3 (<i>antisense</i>)	5' (GGC GGT GGC GGC TGT TGC TGC TGC TGC TGC)

Tabela 04 - Condições da PCR para análise do (CAG)_n.

Temperatura			
N.º de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
40	95°C	70°C	70°C

Análise do sítio polimórfico CCG foram utilizados os *primers* HD4F e HD5R (Foto 3), onde sua sequência e as condições da PCR são citados nas tabelas 05 e 06 respectivamente. O tamanho do alelo normal e expandido, bem como o tamanho da variação CAG e CCG polimórficos na população normal foi determinado por comparação com fragmentos de

DNA de tamanhos conhecidos que serão submetidos a eletroforese paralelamente aos produtos da PCR.

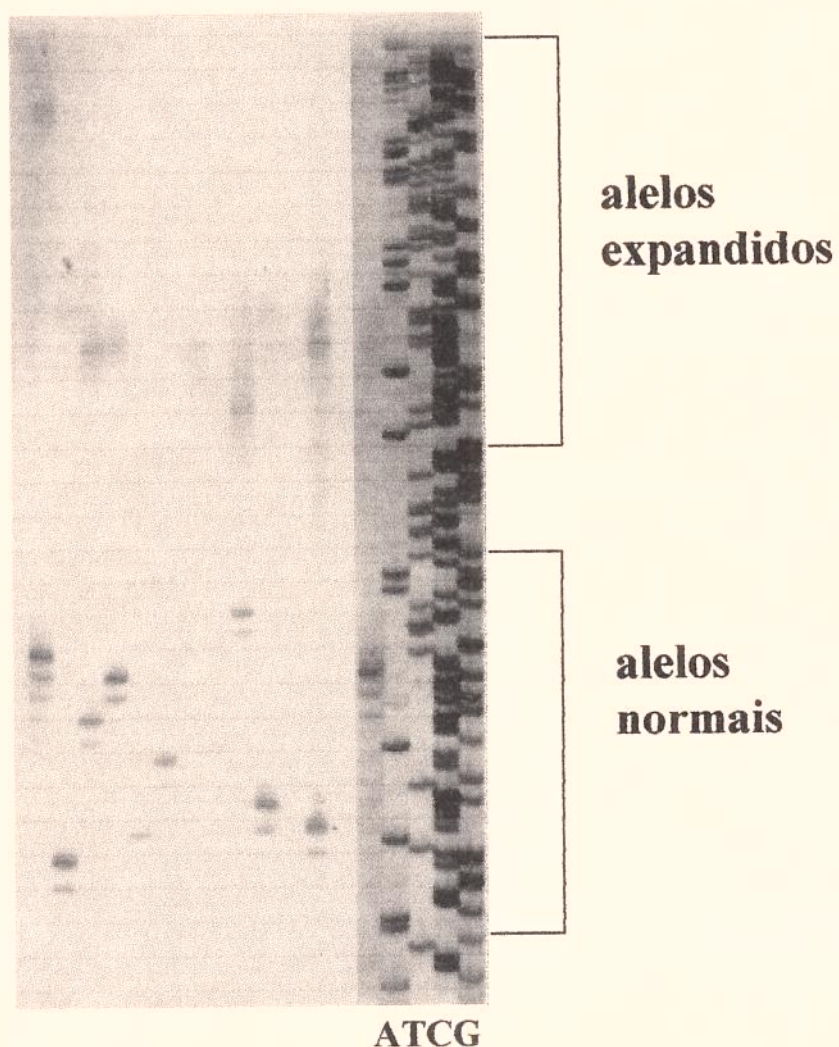
Tabela 05 - Primers para repetição (CCG)_n no alelo da HD.

Primers	Sequência
HD4F (<i>antisense</i>)	5'(GCA GCA GCA GCA GCA ACA GCC GCC ACC GCC) 3'
HD5R (<i>sense</i>)	5'(CTT TCT TTG GTC GGT GCA GCG GCT CCT CAG) 3'

Tabela 06 - Condições da PCR para análise do sítio polimórfico intragênico (CCG)_n.

Temperatura			
N.º de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
40	95°C	70°C	70°C

FOTO 1- VISUALIZAÇÃO DA REPETIÇÃO CAG EM PACIENTES HD PELO MÉTODO INDIRETO.



**FOTO 2- VISUALIZAÇÃO DA REPETIÇÃO CAG EM
PACIENTES HD PELO MÉTODO DIRETO.**

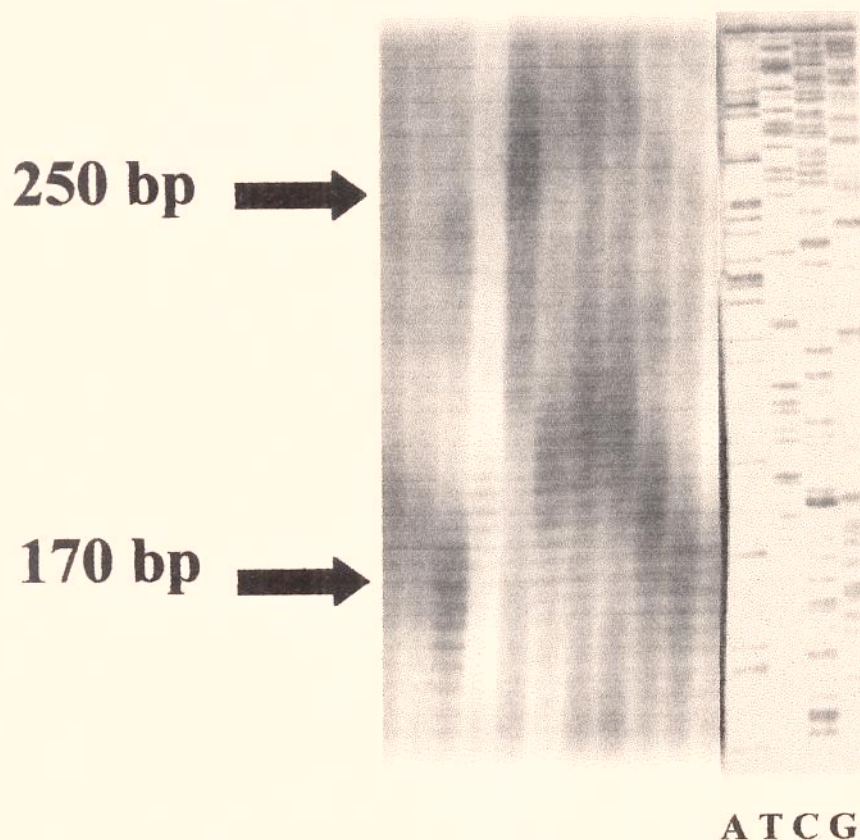
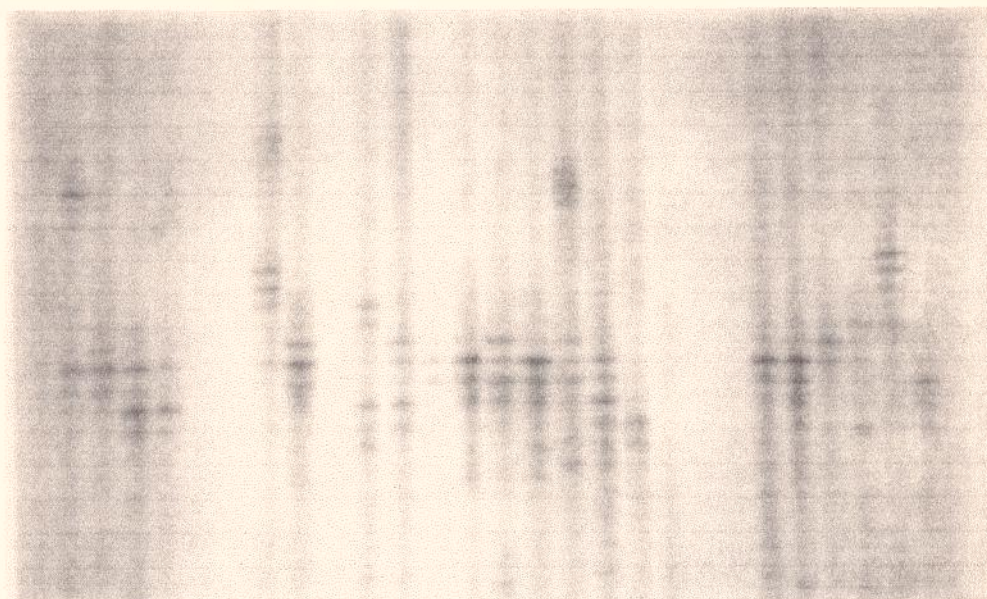


FOTO 3- VISUALIZAÇÃO DA REPETIÇÃO CAG EM INDIVÍDUOS NORMAIS PELO MÉTODO DIRETO.

107 bp →



IV- Resultados

Tanto na análise direta quanto na análise indireta da repetição CAG no total de 44 indivíduos analisados 32 (75%) apresentaram o alelo expandido CAG no gene IT15 enquanto 12 (25%) desses indivíduos foram negativos para HD apresentando apenas alelos de tamanhos normais para repetição CAG (Tabela 07).

Tabela 07: Resumo dos resultados obtidos.

CASO	FAMÍLIA	CAG _(indireto)	CAG _(direto)	TRANSMISSÃO	SEXO	INÍCIO
01	HD1	21/44	20/52	PATERNAL	M	38
02	HD1	21/46	19/49	P	M	40
03	HD2	16/55	19/55	P	F	26
04	HD3	23/46	22/47	P	M	40
05	HD3	23/45	23/48	P	M	26
06	HD4	26/69	22/72	MATERNAL	F	12
07	HD5	19/41	22/43	M	M	58
08	HD6	21/50	26/52	M	F	26
09	HD7	16/50	22/47	M	F	37
10	HD8	15/45	18/48	M	F	32
11	HD10	21/45	21/45	CASO ISOLADO	M	22
12	HD11	24/50	26/54	CI	F	20
13	HD12	24/45	20/45	P	M	25
14	HD13	21/50	20/52	M	F	29
15	HD14	25/46	26/46	P	M	38
16	HD14	25/46	26/50	P	M	39
17	HD20	18/51	26/53	P	M	32
18	HD22	18/50	20/54	M	M	30
19	HD24	26/47	25/50	P	F	53
20	HD24	19/47	25/49	P	F	34
21	HD25	28/40	20/43	CI	F	54
22	HD26	18/43	25/26	P	F	53
23	HD26	21/43	25/46	M	F	A
24	HD26	17/43	26/49	M	F	A

25	HD27	18/44	20/52	P	M	42
26	HD28	20/42	19/50	P	F	50
27	HD29	18/46	20/53	P	F	40
28	HD29	18/46	20/54	P	M	14
29	HD30	22/52	25/58	M	F	34
30	HD31	18/51	20/58	P	M	25
31	HD33	18/69	20/73	P	F	16
32	HD34	18/46	20/46	M	F	32

P = Paterna

M = Materna

CI = Caso Isolado

Quanto a análise indireta da repetição (CAG)_n entre os pacientes HD analisados os alelos normais apresentaram uma variação de 15 a 28 repetições (média= 20 repetições CAG) e o expandido de 41 a 69 repetições (média= 48 CAG_s). Os alelos mais freqüentes foram os com 18 repetições (28%) entre os normais e 46 repetições (22%) entre os expandidos. **(figuras 01).**

Pela análise direta da repetição (CAG)_n nos 32 pacientes HD investigados os alelos normais variaram de 18 a 26 repetições CAG (média=22 CAG_s) enquanto o alelo expandido variou de 43 a 73 repetições (média=51.6 CAG_s). O alelo normal mais freqüente foi de 20 repetições, presente em 34% dos casos. Os alelos de 46 e 52 repetições foram os mais freqüentes entre os expandidos presentes em 12% dos casos. **(figuras02).**

Nenhuma diferença significativa existiu entre o tamanho do alelo expandido de pacientes HD do sexo masculino (média=49.7) e pacientes HD do sexo feminino (média=52.3); $p=0,7$. (figuras 03 e 04)

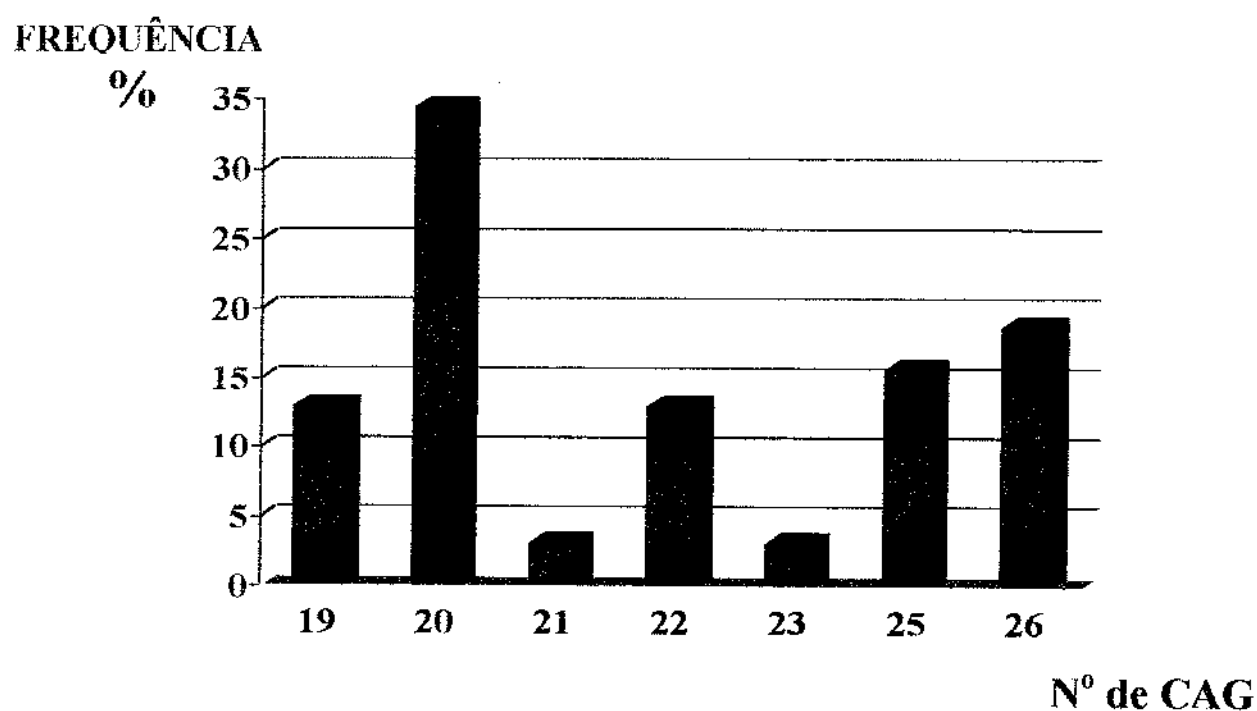


Figura 01. Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n em alelos normais de pacientes HD.

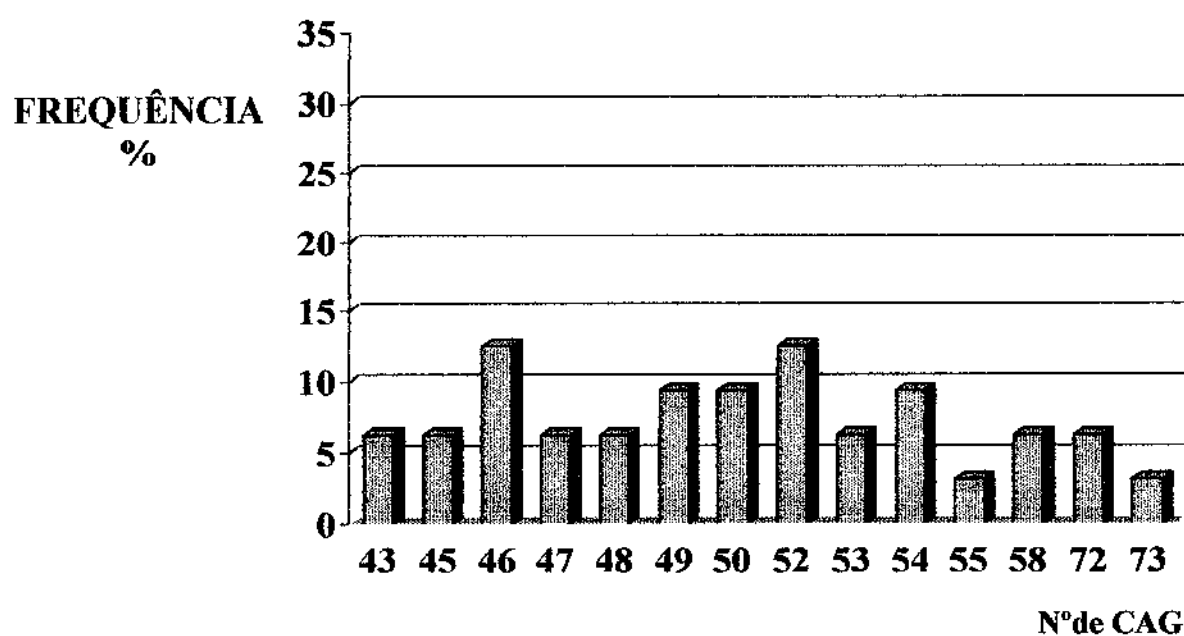


Figura 02. Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n expandida em pacientes HD.

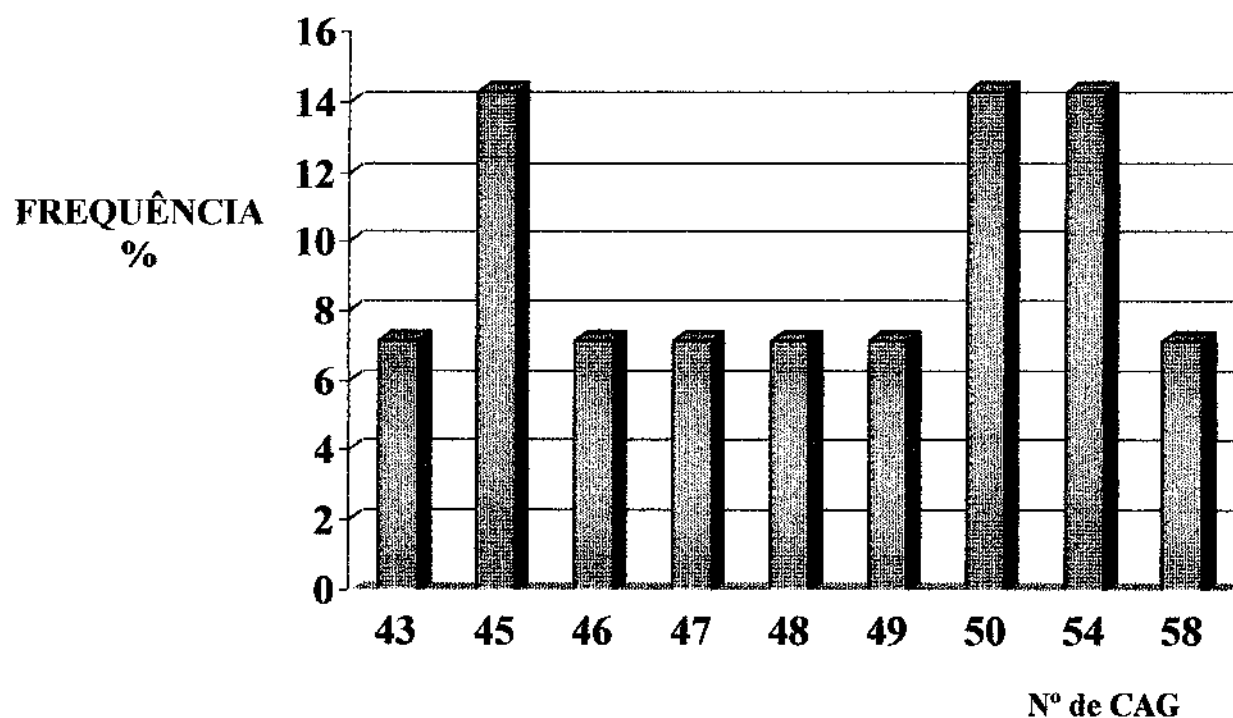


Figura 03. Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n em pacientes (HD) do sexo masculino.

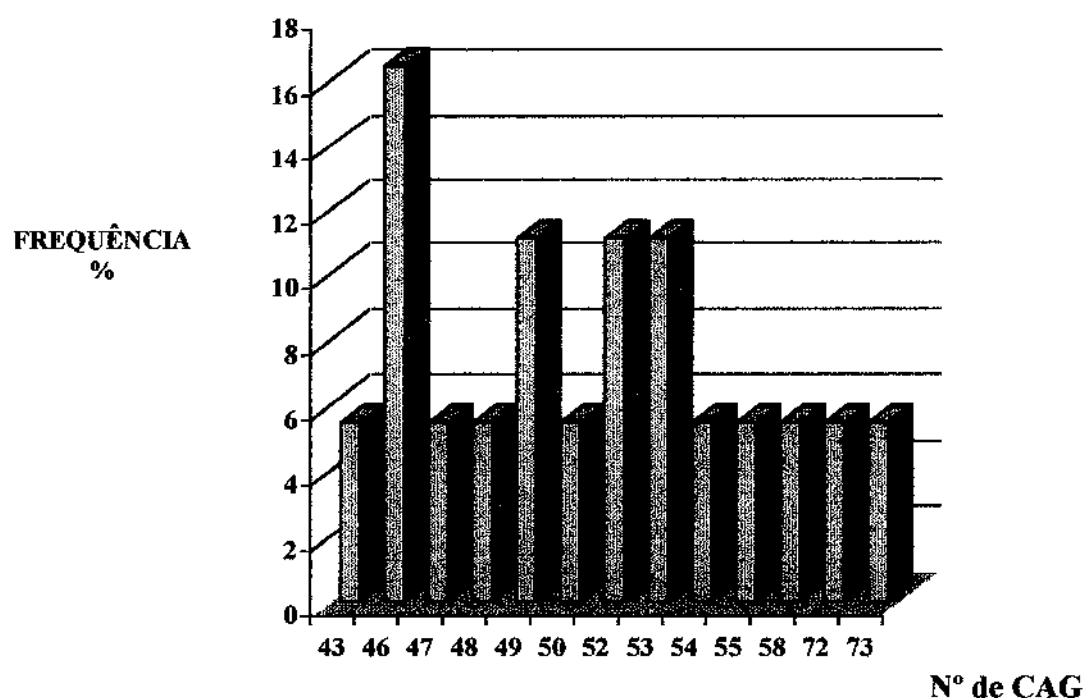


Figura 04. Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n expandida em pacientes (HD) do sexo feminino.

Herança autossômica dominante pode ser documentada em todos os pacientes exceto em 3 casos que não tinham história familiar da doença. A transmissão paterna da doença foi registrada em 18 pacientes e a materna em 11 pacientes.(figura 05) Não houve nenhuma diferença significativa no tamanho da repetição trinucleotídica (CAG)_n entre pacientes com transmissão paterna (média=51,6 CAG_s) e transmissão materna (média=51.5CAG_s); p=1.00.(figura 06 e 07).

Dos 32 indivíduos analisados nesse estudo 30 apresentaram idade de início variando de 12 a 58 anos (média=34), sendo que dois desses indivíduos eram assintomáticos. As idades mais freqüentes registradas foram as de 26 e 40 anos presentes em 10% dos casos (Figura 08). Uma inversa correlação entre o tamanho do alelo expandido e a idade de início

da doença é mostrado na **figura 09**. Um coeficiente de correlação de -0.6 foi obtido ($r^2=0.4$; $p=0.0001$), assumindo uma correlação linear entre a idade de início e tamanho da

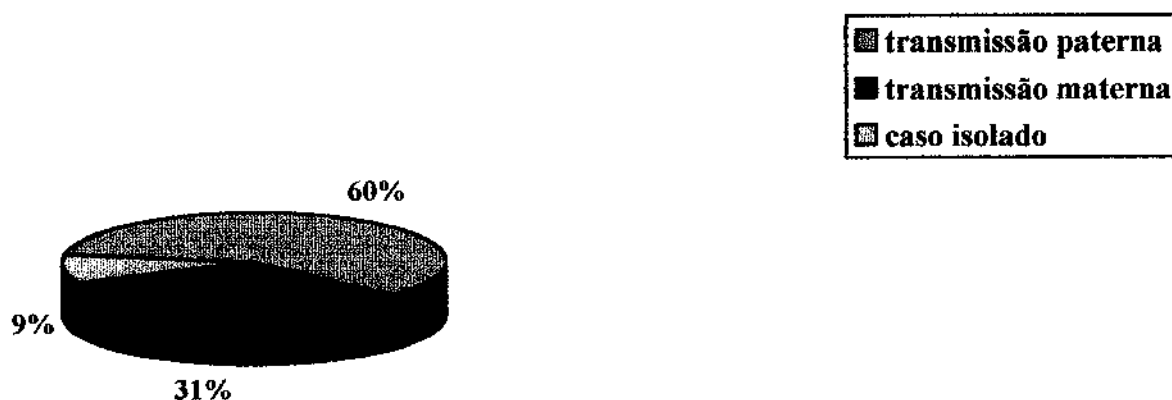


Figura 05. Frequência da distribuição dos pacientes HD quanto ao tipo de transmissão materna ou paterna

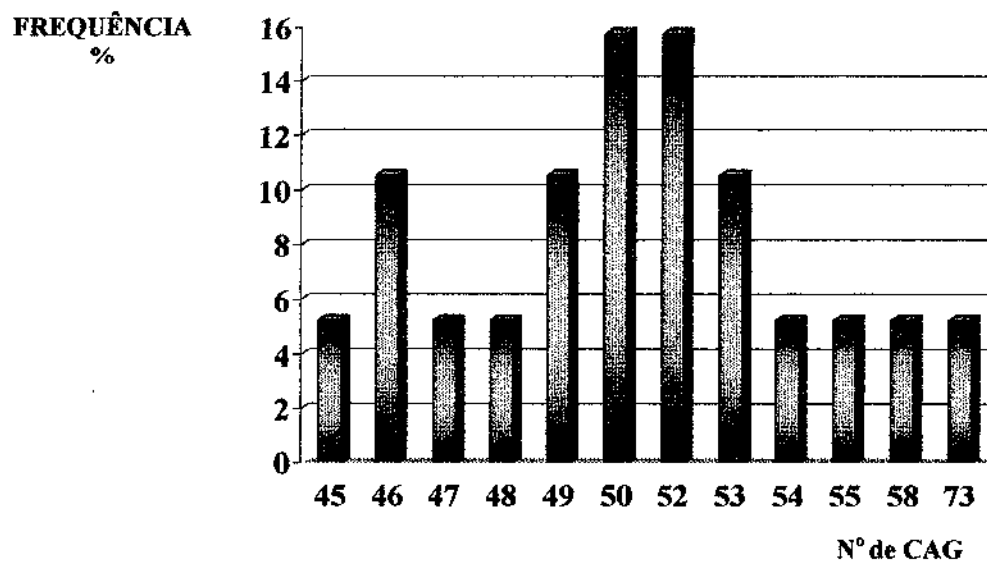


Figura 06: Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n expandida em pacientes HD com transmissão paterna.

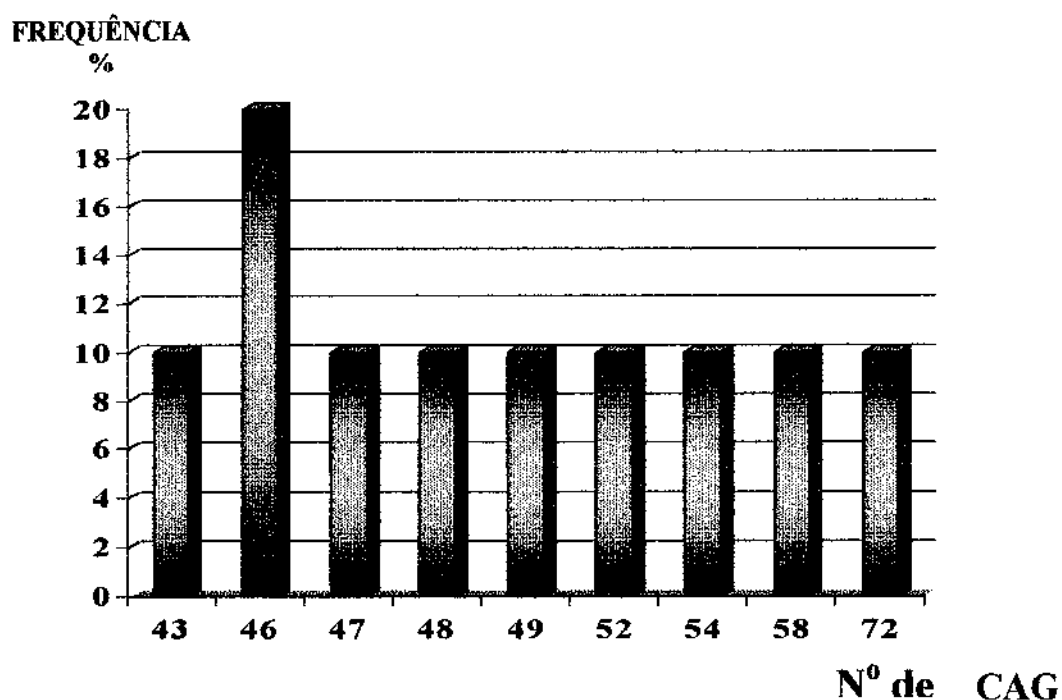


Figura 07: Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n expandida em pacientes HD com transmissão materna.

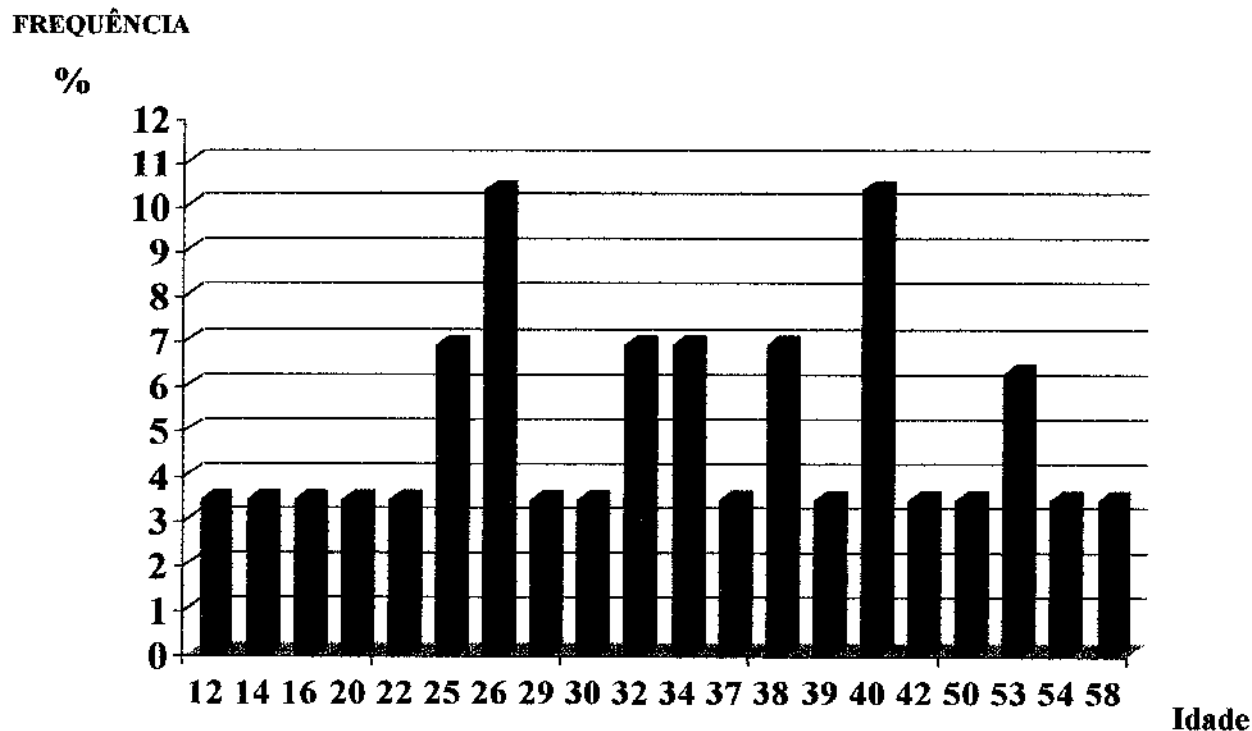


Figura 08. Distribuição da frequência da idade de início dos pacientes HD

repetição nos cromossomos HD. Isso indica uma tendência para idade de início decrescer com o aumento do tamanho da repetição (CAG)_n. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o alelo CAG normal dos pacientes e a idade de início da doença ($r=0.09$, $r^2=0.008$, $p=0.6$) (**figura 09**).

Em 25 indivíduos do grupo controle (total de 50 alelos) para análise direta da repetição trinucleotídica (CAG)_n foi encontrada uma variação de 16 a 33 repetições (média=20.9 CAG_s), sendo os alelos mais frequentes aqueles com 18 e 20 repetições presentes em 18% dos casos; uma heterozigotidade de 88% para a repetição CAG foi registrada nesse grupo. (**Figura 10**)

Quanto a análise da variação do sítio polimórfico intragênico (CCG)_n no grupo controle da população brasileira, foi registrada em 25 indivíduos analisados (total de 50 alelos) uma variação de 158pb a 185pb (média=167.7). O alelo mais frequente de 164pb apresentou uma porcentagem de 33%. Com relação a frequência de heterozigotidade da repetição trinucleotídica (CCG)_n na em nossa população essa esteve presente em 72% do total de indivíduos analisados. (**Figura 11**)

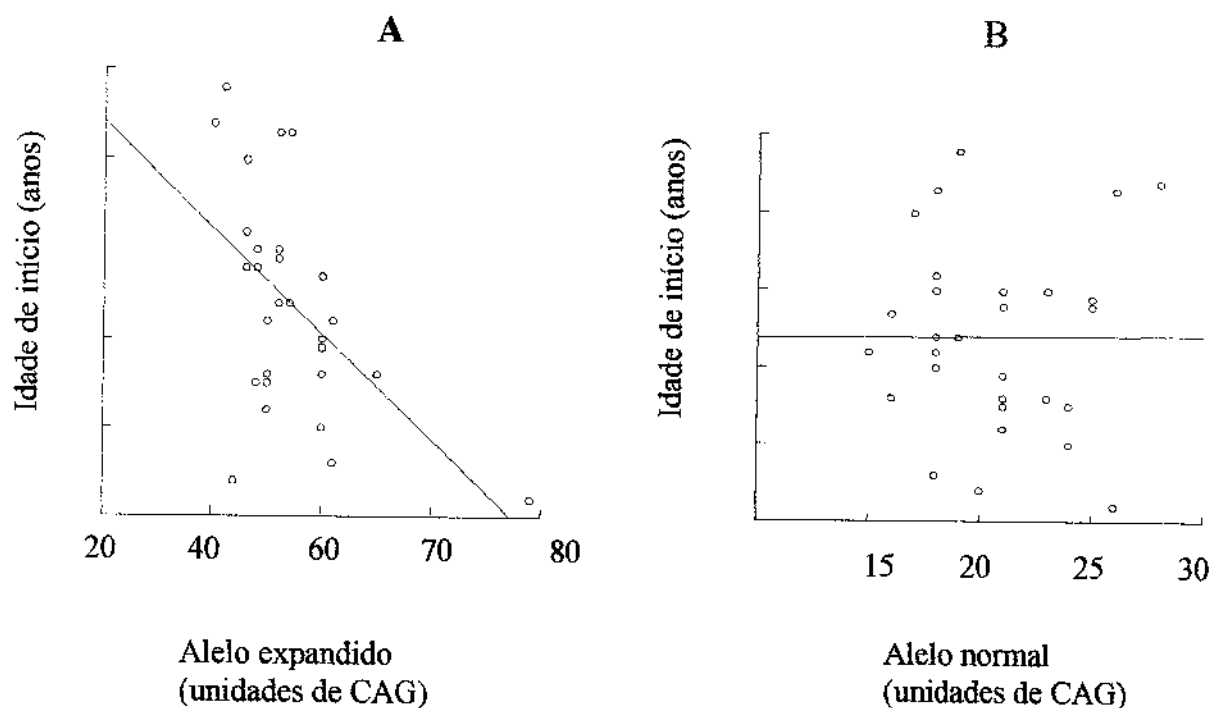


Figura 09: Correlação entre idade de início e número de repetições CAG. **A)** Correlação do tamanho da repetição CAG em 32 pacientes HD com a idade de início dos sintomas (Pearson correlation coefficient (r) = - 0.6; r^2 = 0,4; p =0,0001). **B)** Ausência de correlação entre a idade de início e o tamanho da repetição CAG nos cromossomos normais (r = 0.09; r^2 = 0.008; p =0.6).

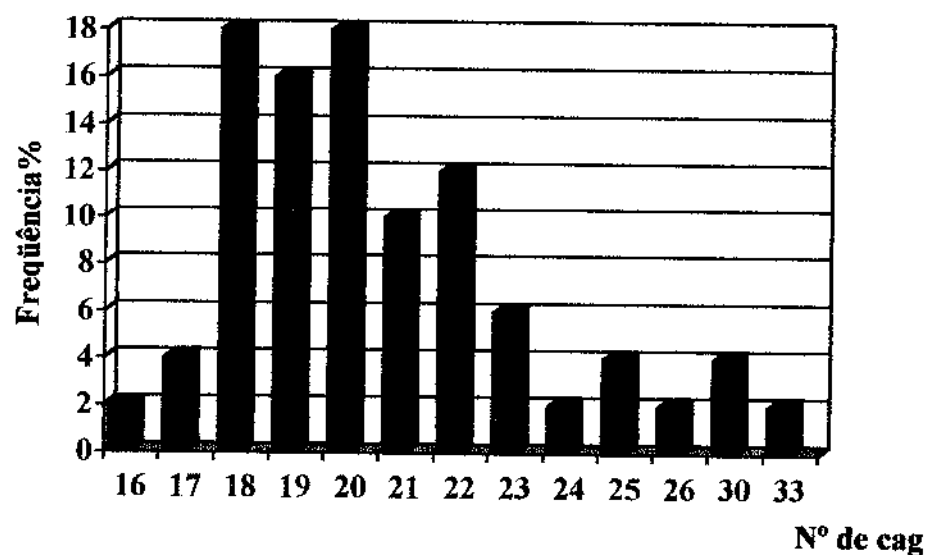


Figura 10. Distribuição da repetição trinucleotídica (CAG)_n em uma amostra da população brasileira normal.

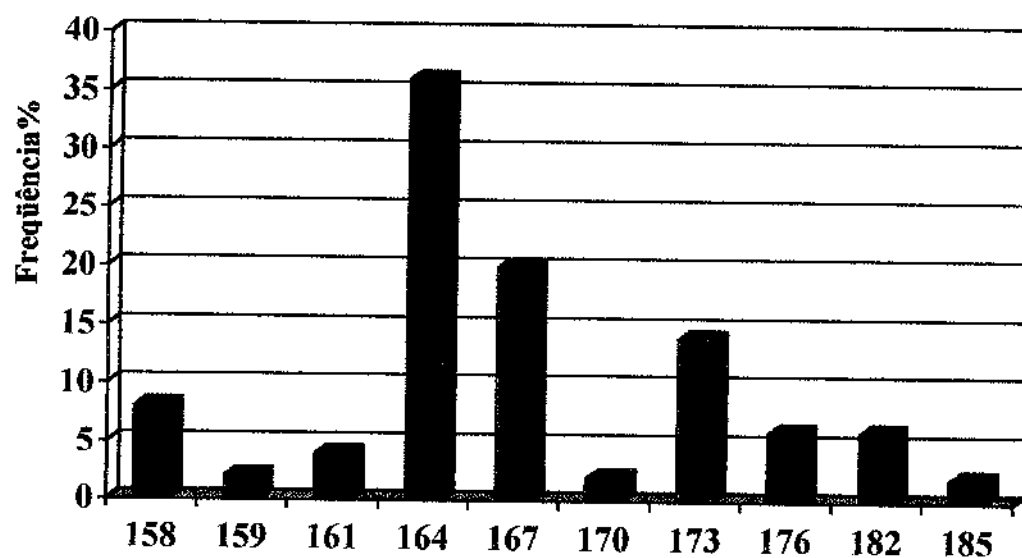


Figura 11. Distribuição da repetição trinucleotídica (CCG)_n em uma amostra da população brasileira normal

V - Discussão

Com a clonagem do gene IT15 em 1993 e a caracterização da mutação pela expansão do trinucleotídeo (CAG)_n responsável pela HD, o diagnóstico molecular da doença tornou-se possível tanto em grandes famílias como em um único indivíduo afetado.

É interessante notar que alguns tipos da mutação instável têm sido encontrada em outras doenças degenerativas e que a função da maioria dos genes envolvidos nessa doença ainda permanecem desconhecidos. Embora, recentes evidências em estudos de proteínas e modelos animais transgênicos sugerem uma toxicidade devido ao ganho de função por proteínas contendo um segmento de glutamina expandido.

Este é o primeiro estudo reportando a análise molecular da HD em pacientes na população brasileira. Análises da repetição (CAG)_n no gene IT15 em famílias brasileiras confirmam a presença da expansão CAG em 76% dos pacientes com diagnóstico clínico para HD. Evidenciando que em 24% dos casos, apesar de haver uma suspeita clínica de Huntington, o diagnóstico molecular descartou essa hipótese diagnóstica. Com isso o diagnóstico molecular demonstrou ser uma importante ferramenta para o diagnóstico de certeza da HD.

O tamanho dos alelos normais e expandidos encontrados em nosso estudo foi similar ao reportado na literatura, e a presença de nenhum alelo intermediário entre 35 a 40 (CAG)_n foi encontrado tanto na análise indireta, que envolve o sítio polimórfico CCG, quanto na análise direta do CAG. O que mostra que nossa população de pacientes HD é similar a de outras regiões. Nenhuma diferença da distribuição dos alelos CAG foi registrada quanto ao tipo de transmissão paterna ou materna. Não havendo portanto um

mecanismo preferencial de transmissão. Em relação a idade de início das manifestações e tamanho da expansão. Nossos dados vem a confirmar a correlação negativa existente entre essas duas variáveis. Na nossa amostra, percebemos claramente essa relação ao verificarmos a expansão daqueles pacientes que tiveram o início da manifestação da doença antes dos vinte anos. Dois desses pacientes (caso 6 e 31), tem cerca de 70 repetições, as maiores encontradas em nosso estudo. Por outro lado, naqueles casos que encontramos as menores ampliações (43 CAG), a idade de início das manifestações da doença foi mais de 50 anos.

Nós identificamos três pacientes sem história familiar da doença, os quais apresentaram o alelo expandido responsável pela mutação na HD. No entanto, em todos esses três pacientes, as informações clínicas precisas não puderam ser obtidas dos familiares pois ou eram muito jovens ou não haviam sido examinados. Sendo assim, nesses três pacientes o padrão de herança autossômico dominante não pode ser evidenciado devido a falta de informações mais precisas.

Com relação a análise do sítio polimórfico CAG e CCG na população brasileira controle, a avaliação do alelo normal CAG se mostrou condizente com os achados na literatura, por outro lado, a repetição (CCG)_n intragênica se mostrou altamente polimórfica em nossa população devendo assim ser ressaltada a importância da análise direta da repetição CAG, a qual exclui o sítio polimórfico CCG.

É importante enfatizar que, por se tratar de uma anomalia genética incurável, de início tardio, em que é possível realizar o diagnóstico molecular, torna-se fundamental a existência de uma estrutura multidisciplinar envolvida, tanto na fase inicial de diagnóstico,

quanto no acompanhamento desses pacientes, ainda mais quando se trata de diagnóstico de indivíduo assintomático.

E por fim enfatizar a importância de um diagnóstico correto na orientação genética de uma família.

VI- Conclusões

- 1 - Quanto a caracterização molecular da HD, no total de amostras analisadas, a variação do alelo $(CAG)_n$ normal e do expandido se mostrou condizente com os achados mundiais.
- 2 - Uma inversa correlação entre o número de repetições trinucleotídicas $(CAG)_n$ e a idade de início dos sintomas foi identificada entre os pacientes HD analisados.
- 3 - Nenhuma correlação foi constatada quanto ao número de $(CAG)_n$ do alelo normal dos pacientes HD e início dos sintomas.
- 4 - Quanto a análise da repetição trinucleotídica $(CCG)_n$ na população brasileira, esse sítio intragênico se mostrou altamente polimórfico.
- 5 - Conforme já descrito na literatura mundial, a análise direta da repetição trinucleotídica $(CAG)_n$ mostrou uma maior eficácia, tendo em vista a alta variação polimórfica $(CCG)_n$ em nossa população.
- 6 - A importância do diagnóstico molecular para a confirmação do diagnóstico clínico, tendo em vista o aconselhamento genético, é demonstrada quando em 42 indivíduos clinicamente diagnosticados como portadores da HD, 32 (76%) apresentaram o alelo expandido para a doença.
- 7 - Não foi possível analisar a presença ou não do fenômeno de antecipação em nossa amostra, devido a dificuldade de coleta de material informativo dentre as famílias estudadas.

APÊNDICE

Apêndice 1: Formulário de Consentimento

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos na doença de Huntington

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com diagnóstico clínico de doença de Huntington. O objetivo geral do estudo é o de determinar a frequência e as características moleculares da mutação responsável pela doença de Huntington. Esses estudos poderão levar a identificação do defeito genético que causa a doença da qual sou portador. Além de levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado da doença de Huntington. 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 a doença de Huntington. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre a doença de Huntington. 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 confirmar meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a uma tomografia computadorizada ou a 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 doença de Huntington. 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.

Título do projeto: Estudos Genéticos na doença de Huntington

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 no Ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como 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.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos na doença de Huntington

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 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

Apêndice 2: Formulário Clínico

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE HUNTINGTON

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 clínico de doença de Huntington: 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): _____

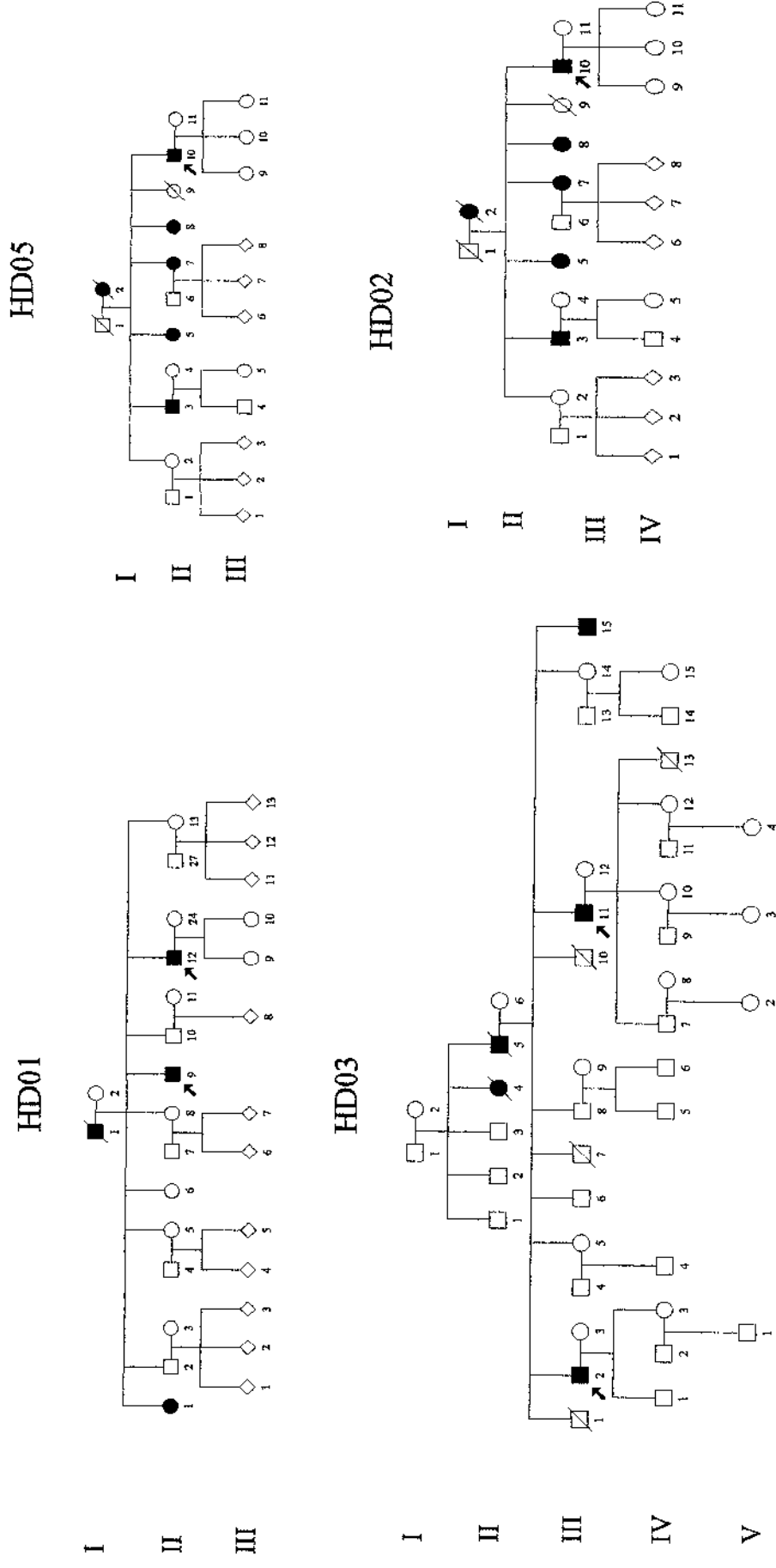
10. Achados Neurológicos:	Sim	Não	Idade de Aparecimento
10.1. Alterações cognitivas	_____	_____	_____
10.2. Alterações da memória	_____	_____	_____
10.3. Alterações da personalidade:			
10.3.1. Irritabilidade	_____	_____	_____
10.3.2. Agressividade	_____	_____	_____
10.4. Alterações do sono	_____	_____	_____
10.5. Diminuição da acuidade visual	_____	_____	_____
10.6. Atrofia óptica	_____	_____	_____
10.7. Retinite pigmentosa	_____	_____	_____
10.8. Diminuição da acuidade auditiva	_____	_____	_____
10.9. Disartria	_____	_____	_____
10.10. Disfagia	_____	_____	_____
10.11. Incoordenação:			
10.11.1. Membros superiores	_____	_____	_____
10.11.2. Membros inferiores	_____	_____	_____
10.11.3. Marcha	_____	_____	_____
10.12. Tremor	_____	_____	_____
10.13. Câimbras musculares	_____	_____	_____
10.14. Fasciculações:			
10.14.1. Membros	_____	_____	_____
10.14.2. Facial	_____	_____	_____
10.14.3. Perioral	_____	_____	_____

10.14.4 Lingual	_____	_____	_____
10.15. Sinais extrapiramidais	_____	_____	_____
10.16. Movimentos coréicos	_____	_____	_____
10.17. Distonia	_____	_____	_____
10.18. Reflexos tendinosos:	Membros superiores:	Normal ()	Aumentado ()
		Diminuídos ()	Ausente ()
	Membros inferiores:	Normal ()	Aumentado ()
		Diminuído ()	Ausente ()
10.19.			
Sensibilidade:	_____		
10.20.	_____		
CT:	_____		
10.21.	_____		
MRI:	_____		
10.22.	_____		
EMG:	_____		
10.23.	_____		
Autopsia:	_____		

Apêndice 3:

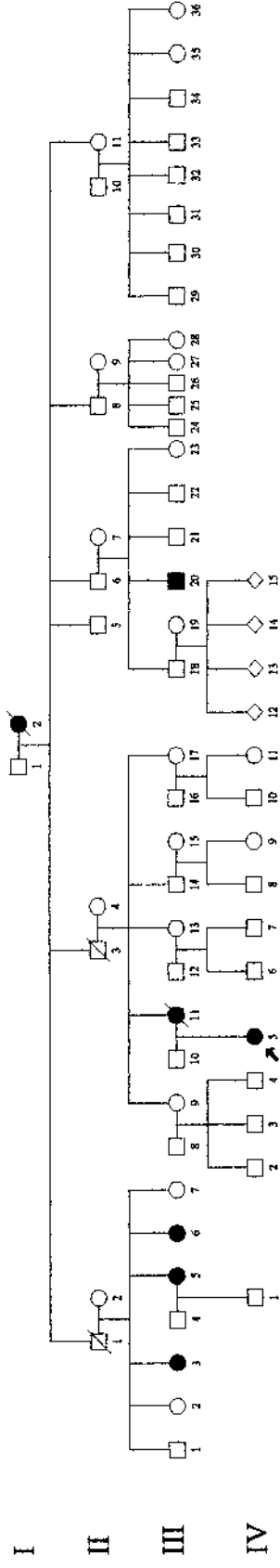
Heredogramas das 32 famílias HD.

Famílias com HD

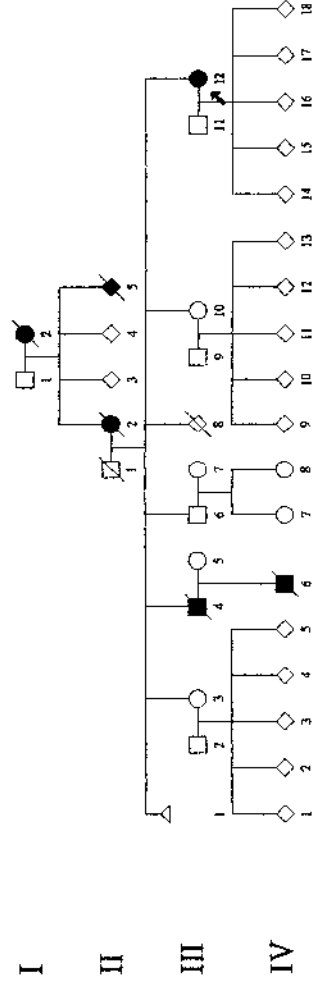


Famílias com HD

HD04

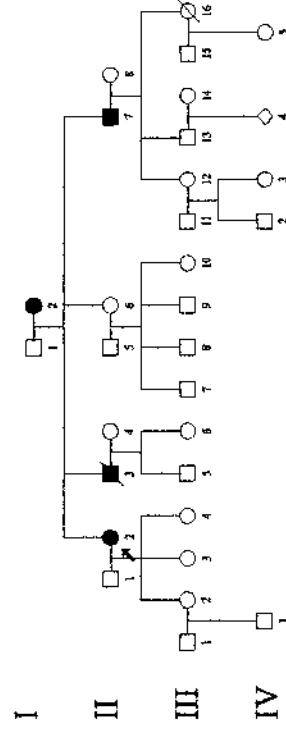


HD06

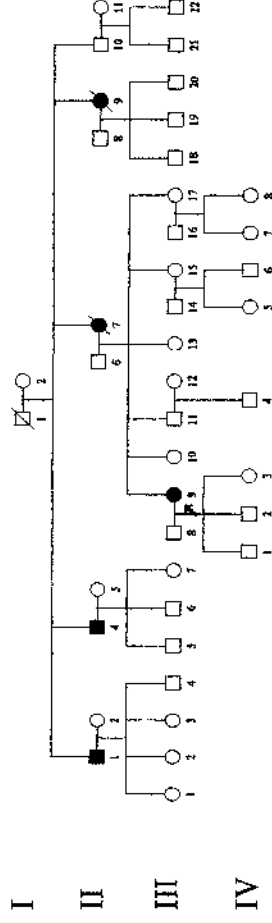


Famílias com HD

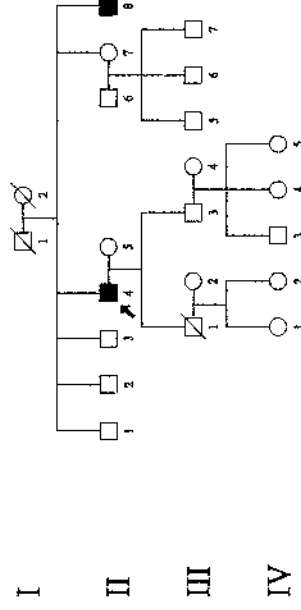
HD07



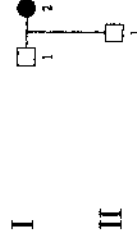
HD08



HD10

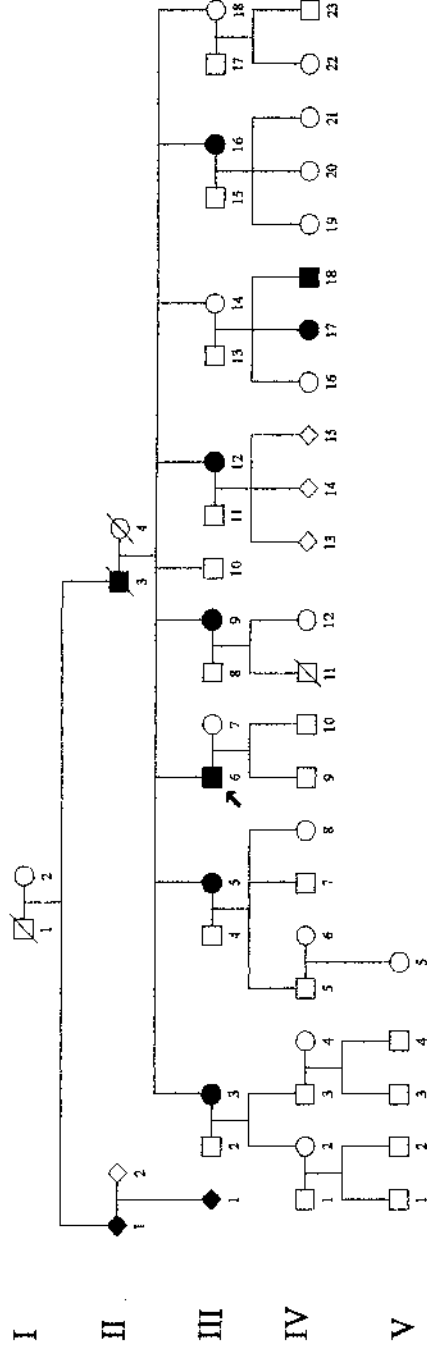


HD11

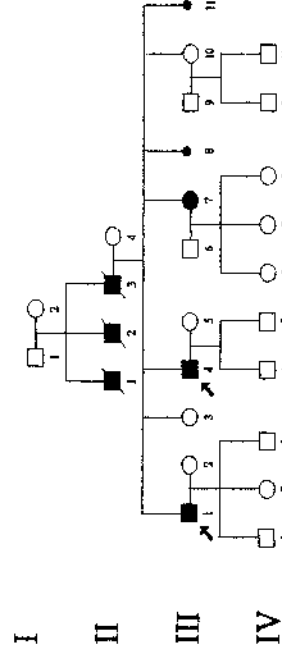


Famílias com HD

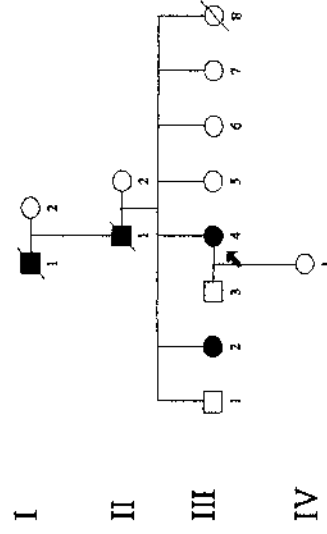
HD12



HD14

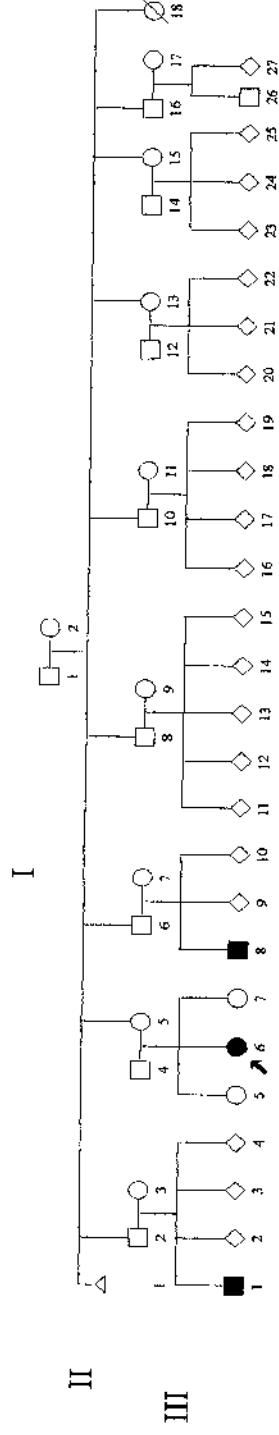


HD13



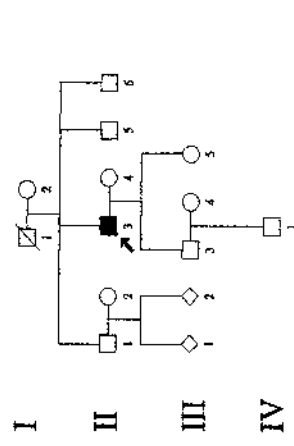
Famílias com HD

HD15

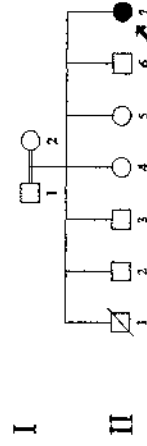


Famílias com HD

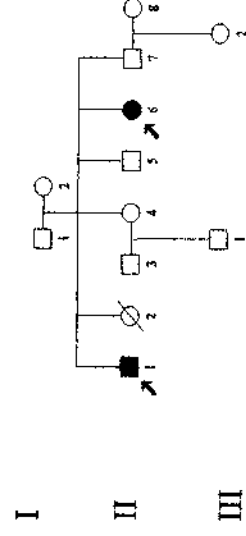
HD16



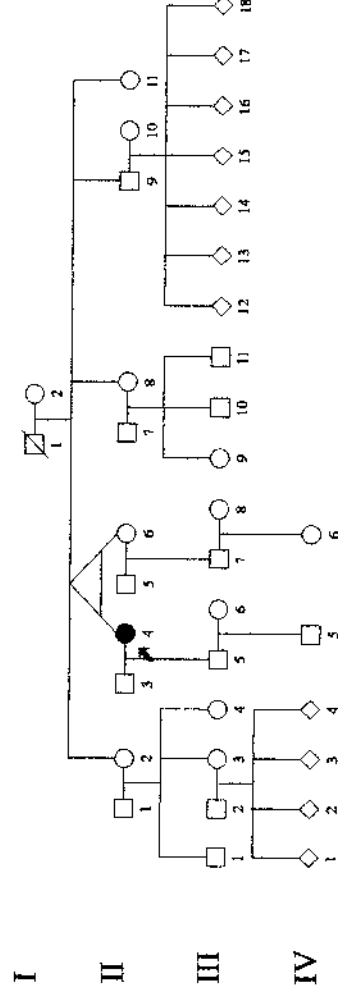
HD17



HD18

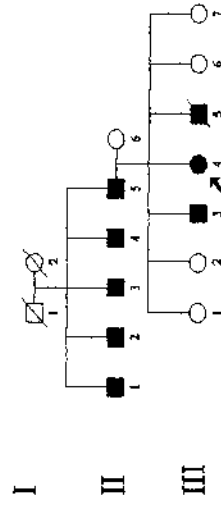


HD19

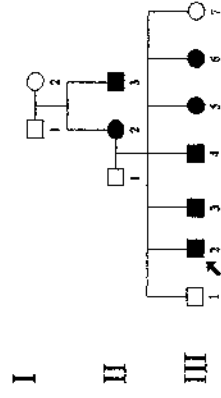


Famílias com HD

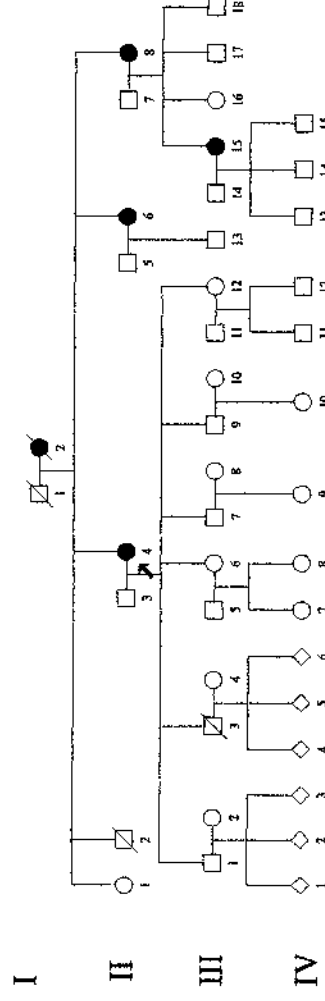
HD20



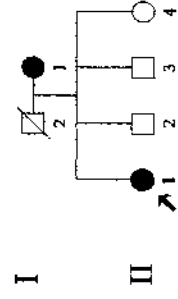
HD22



HD21

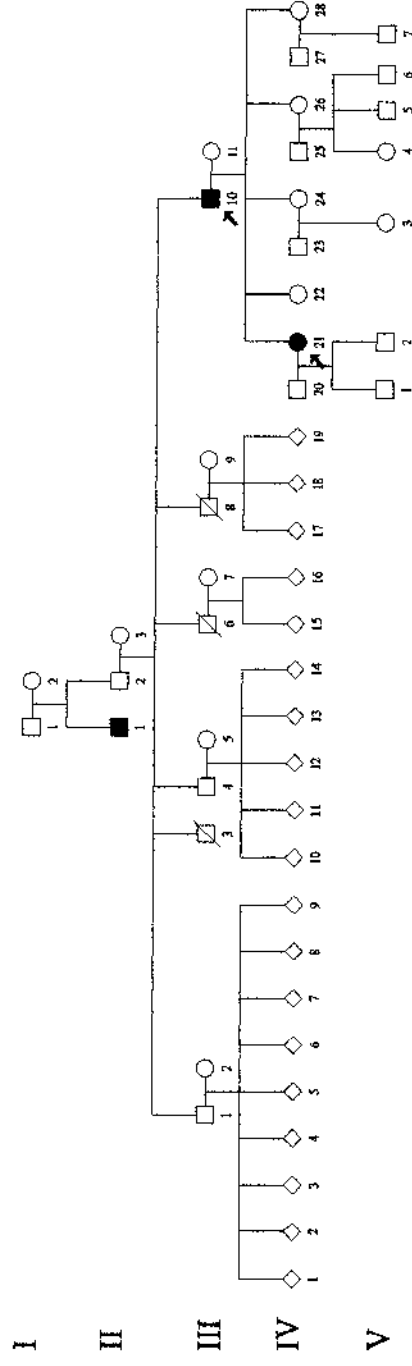


HD23

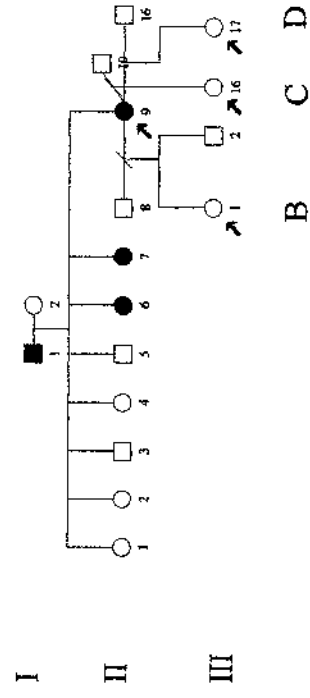


Famílias com HD

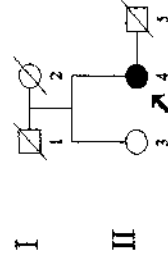
HD24



HD26

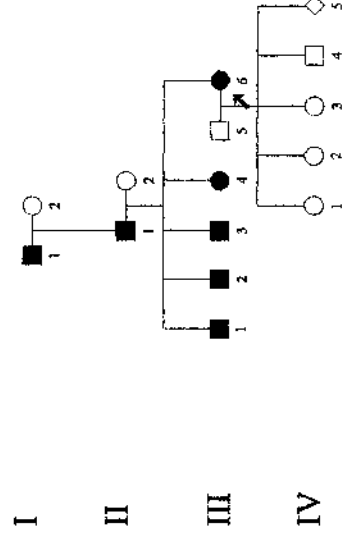


HD25

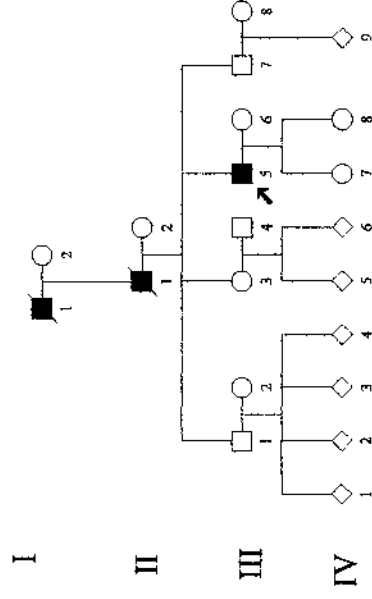


Famílias com HD

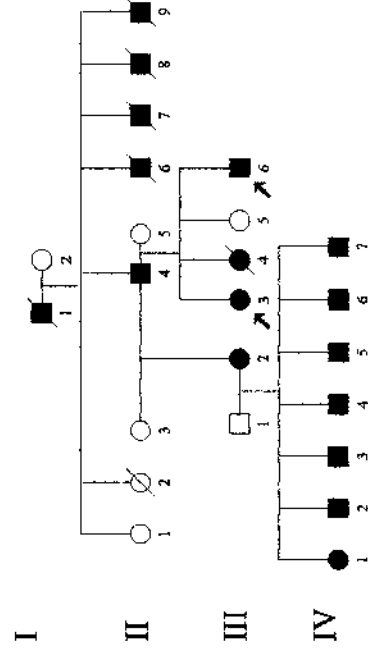
HD28



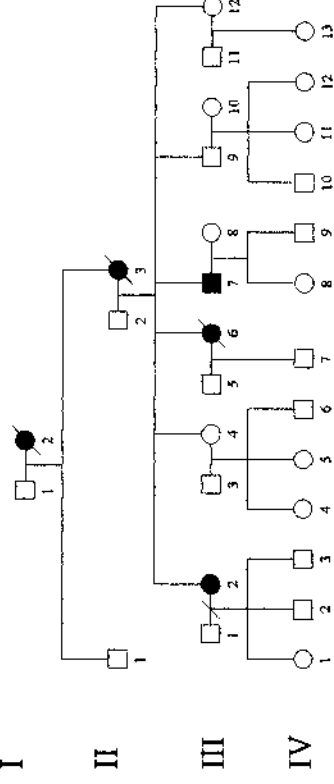
HD27



HD29

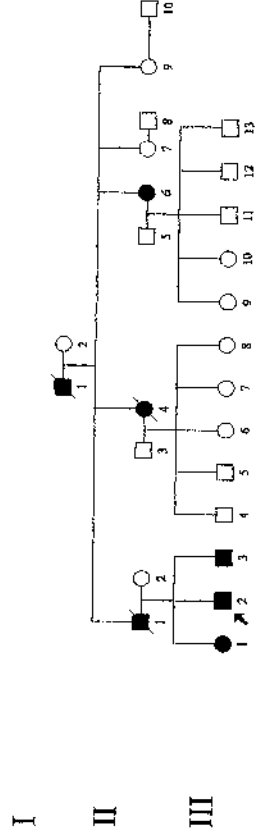


HD30

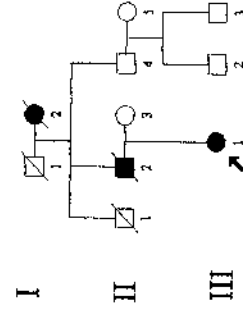


Famílias com HD

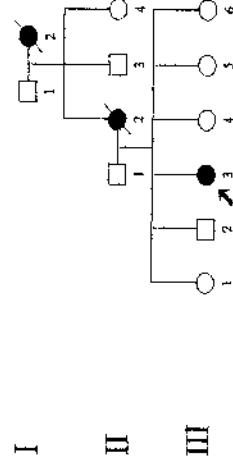
HD31



HD33



HD34



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.HARPER, P. S.- Huntington's disease . London: Saunders, 2^a ed., 438 pg. (1996).
- 2.BRUYN, G. W. -Huntington's chorea: Historical, clinical and laboratory synopsis.
In: Vinken, P.I.; Bruyn, G.W. ed. **Extrapyramidal disorders**. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1968.
- 3.DURBACH, N. E HAYDEN, M.R.- George Huntington: the man behind the eponym. *J. Med. Genet.*, 30: 406-409, 1993.
- 4.SHIWACH, R.; E LINDENBAUM, R.H.- Prevalence of Huntington's Disease among UK Immigrants from the Indian Subcontinent. **Br. J. Psychiatry**, 157:598-599, 1990.
- 5.LEUNG, C.M.; CHAN, Y.W.; CHANG, C.M.; YU, Y.L.; CHEN, C.N.-Huntington's Disease in Chinese- a hypothesis of its origin. **J. Neurosurg. And Psychiatry**, 55:681-684. 1992.
- 6.HAYDEN, M. R. -Huntington's chorea. New York, Springer-Verlag. 1981.
- 7.FOLSTEN, S.E.- Huntington's disease: A disorder of Families. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1989.
- 8.HATHFIELD, K.W.G.- Huntington's chorea: a centenary review. **Post-graduate Medical Journal**, 49: 32-45, 1973.

9. DELA MONTE, S.; VONSATTEL, J.P. E RICHARDSON, E.P.. -Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neustriatum in Huntington's disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **47**: 516-525, 1988.
10. VONSATTEL, J.P.; MYERS, R.; STEVENS, T.J.; FERRANT, R.J.; BIRD, E.D. E RICHARDSON, E.P. - Neurological classification of Huntington's disease. **J. Neuropathol. And exp. Neurol.**, **44**: 559-577, 1985.
11. JACOBS, D.H.; HUBER, S.J. -The role of the conduct in nonmotor behaviors in Huntington's Disease. **Behav. Neurol.**, **5**: 205-214, 1992.
12. MARTIN, J.B. E GUSELLA, J.F.. -Huntington's disease: pathogenesis and management. **N Engl J Med**, **315**: 1267-1276, 1986.
13. BEHAN, P.O. E BONE, I.- Hereditary chorea without dementia. **J. Neurol. Neurosurg, Psychiat.**, **40**:687-691, 1977.
14. BAMFORD, K.A.; CAINE, E.D.; KIDO, D.K.; COX, C.; SHOULSON, I.- A prospective evaluation of cognitive decline in early Huntington's disease: functional and radiographic correlates. **Neurology**, **45**:1867-1873, 1995.
15. CHANDLER, J.H.; REED, T.E.; DEJONG, R.N.- Huntington's chorea in Michigan. **Neurology**, **10**:148-153, 1960.
16. BUETOW, K.H.; SHIANG, R.; YANG, P.; NAKAMURA, Y.; LATHROP, G.M.; WHITE, R.; WASMUTH, J.J.; WOOD, S.; BERDAHL, L.D.; LEYSENS, N.J.; RITTY, T.M.; WISE, M.E.; MURRAY, J.C.- A detailed multipoint map of human chromosome 4 provides evidence for linkag heterogeneity and position-specific recombination rates. **Am. J. Hum. Genet.**, **48**:911-925, 1991.

17. GUSELLA, J.F.; WEXLER, N.S.; CONEALLY, P.M.; NAYLOR, S.L.; ANDERSON, M.A.; TANZI, R.E.; WATKINS, P.C.; OTTINA, K.; WALLACE, M.R.; SAKAGUCHI, A.Y.; YOUNG, A.B.; SHOULSON, I.; BONILLA, E.; MARTIN, J.B.- A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, **306**: 234-238, 1983.
18. THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, **72**: 971-983, 1993.
19. DUYAO, M.; AMBROSE, C.; MYERS, R.; NOVELLETTA, A.; PERSICHETTI, F.; FRONTALI, M.; FOESTEIN, S.; ROSS, C.; FRANG, M.; ABBOTT, M.; GRAY, J.; CONNELLY, P.; ET AL. - Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington disease. **Nat Genet**, **4**: 387-392, 1993.
20. RUBINSZTEIN, D.C.; LEGGO, J.; COLES, R.; ALMQVIST, E.; BIANCALANA, V.; CASSIMAN, J.J.; CHOTAL, K.; CONNARTY, M.; CRAUFURD, D.; CURTIS, A.; CURTIS, D.; DAVIDSON, M.J.; DIFFER, A.-M.; DODE, C.; DODGE, A.; FRONTALI, M.; RANEN, N.G.; STINE, O.C.; SHERR, M.; ABBOTT, M.H.; FRANZ, M.L.; GRAHAM, C.A.; HARPER, P.S.; HEDREEN, J.C.; JACKSON, A.; KAPLAN, J.-C.; LOSEKOOT, M.; MACMILLAN, J.C.; MORRISON, P.; TROTTIER, Y.; NOVELLETTA, A.; SIMPSON, S.A.; THEILMANN, J.; WHITTAKER, J.L.; FOLSTEIN, S.E.; ROSS, C.A. E HAYDEN, M.R.- Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in Huntington's disease (HD) gene reveals HD cases with 36-39 repeats. **Am. J. Genet.** **59**:16-22, 1996.

21. GASSER, T. E. GROßHADERN, K. - Advances in the genetics of movement disorders: implications for molecular diagnosis . **J. Neurol.**, **244**: 341-348, 1997.
22. REDMAN, J.B.; FENWICK, R.G. JR.; FU, Y.H.; PIZZUTI, A. E. CASKEY, C.T. - Relationship between parental trinucleotide CTG repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. **J. Am. Med. Assoc.**, **269**:1960-1965, 1993.
23. ILLARIOSHKIN, S.N.; IGARASHI, S.; ONODERA, O.; MARKOVA E. D.; NIKOESKAYA N. N.; TANAKA H.; CHABRASHIWILI T.Z. -Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease. **Ann Neurol**, **36**: 630-635, 1994.
24. KIEBURTZ, K.; MACDONALD, M.; SHIH, C.; FEIGIN, A.; STEINBERG, K.; BORDWELL, K.; ZIMMERMAN, C.; SRINIDHI, J.; SOTACK, J.; GUSELLA, J. E. SHOULSON, I. -Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease . **J. Med. Genet.**, **31**: 872-874, 1994.
25. KREMER, B.; GOLDBERG, P.; ANDREW, S.E.; THEILMANN. J.; TELENUS, H.; ZEISLER, J.; SQUITIERI, F.; LIN, B.; BASSET, A.; ALMQVIST, E.; BIRD, T.D. E. HAYDEN, M.R.. -A worldwide study of the Huntington's disease mutation: The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. **N.E.J.Med.**, **330**: 1401-1406, 1994.
26. SNELL, R.G.; MacMILLAN, J.C.; CHEADLE, J.P.; FENTON, I.; LAZAROU, L.P.; DAVIES, P.; MacDONALD, M.E.; GUSELLA, J.F.; HARPER, P.S. E SHAW, D.J. - Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. **Nat. Genet.**, **4**: 393-397, 1993.

27. STINE, O. C.; PLEASANT, N.; FRANZ, M. L.; ABBOTT, M. H.; FOSTEIN, S. E.; ROSS C. A.- Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of trinucleotide repeat in IT-15. **Hum. Molec. Genet.**, 2:1547-1549, 1993.
28. SHUTERLAND, G.R. E RICHARDS, R.L.- Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. **Proc Nat. Acad Sc. USA**, 92:3636-3641, 1995.
29. RUBINSZTEIN, D.C.; BARTON, D.E.; DAVISON, B.C.C. E FERGUSON-SMITH, M.A.- Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. **Hum. Mol. Genet.**, 2:1713-1715, 1993.
30. BARRON, L.H.; ERA, A.; HOLLOWAY, S.; BROCK, D.J.H. E WARNER, J.P.- A single allele from the polymorphic CCG rich sequence immediately 3' to the unstable CAG trinucleotide in the IT15 cDNA shows almost complete disequilibrium with Huntington's disease chromosomes in the scottish population. **Hum. Mol. Genet.**, 3:173-175, 1994.
31. ANDREW, S.E.; GOLDBERG, Y.P.; THEIMANN, J.; ZEISLER, L.J. E HAYDEN, M.R.- A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. **Hum. Mol. Genet.**, 3:65-68, 1994.
32. GELLERA, C.; MEONI, C.; CASTELLOTTI, B.; ZAPPACOSTA, B.; GIROTTI, F.; TARONI, F.; DiDONATO, S.- Errors in Huntington disease diagnostic test caused by trinucleotide deletion in the IT15 gene. (Letter) **Am. J. Hum. Genet.** 59:475-477, 1996.

33. DE ROOIJ, K. E.; DE KONING GANS; P. A. M.; STRASTAD, M. I.; BELFROIDR. D.M.; VEGTER-VAN DER VLIS, M.; ROOS, R.A.C.; BAKKER, E.; VAN OMEN, G.-J. B.; DEN DUNNERN, J. T. E LOSEKOOT, M. -Dynamic mutation in dutch Huntington's disease patients: increased paternal repeat instability extending to within the normal size range. **J. Med. Genet.**, **30**: 996-1002, 1993.
34. BARRON, L.H.; WARNER, J.P.; PORTEOUS, M.; HOLLOWAY, S.; SIMPSON, S.; DAVIDSON, R. E BROCK, D.J.H.- A study of the Huntington's Disease associated trinucleotide repeat in the Scottish population. **J. Med. Genet.**, **30**: 1003-1007, 1993.
35. SOONG, B.W. E WANG, J.T.- A comparison of the Huntington's disease associated trinucleotide repeat between chinese and white populations. **J. Med. Genet.**, **32**:404-408, 1995.
36. KREMER, B.; SQUITIERI, F.; TELENUS, H.; ANDREW, S.E.; THEILMANN, J.; SPENCE, N.; GOLDBERG, Y.P. E HAYDEN, M.R.- Molecular analysis of late onset Huntington's disease . **J. Med. Genet.**, **30**: 991-995, 1993.
37. HALDANE, J.B.S.- The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. **J. Genet.**, **41**:149-157, 1941.
38. FARRER, L.A.; LONNEALLY, P.M. E YU, P.- The natural history of Huntington's disease possible role of agling genes. **Am. J. Med. Genet.**, **18**: 115-123, 1984.
39. CONEALLY, P.M.- Huntington disease: genetics and epidemiology. **Am. J. Hum. Genet.**, **36**:506-526, 1984.
40. CRAUFURD, D.; DODGE, A.; KERZIN-STORRAR, L.; HARRIS, R.- Uptake of presymptomatic predictive testing for Huntington' disease. **Lancet II**:603-605, 1989.
41. MOTT, F.W.- A lecture on heredity and insanity. **Lancet**, **1**: 1251-1259, 1911.

42. PENROSE, L.S.C.- The problem of anticipation in pedigrees of dystrophia myotonica. **Ann. Eugen.**, **14**: 125-132, 1948.
43. VERKERK, A. J. M. H., PURETTI, M.; SUTCLIFFE, J. S.; FU, Y.-H.; KUHE, D. P. A.; PIZZUTI, A.; RUNER, O.; RICHARDS, S.; VICTORI, M. F.; ZANG, F.; EUSSSEN, B. E.; VAN OMMEN, G.-J. B.; BLONDEN, L. A. J.; RIGGINS, G. J.; CHASTAIN, J. L.; KUNST, C. B.; GALGARD, H.; CASKEY, C. T.; NELSON, D. L.; OOSTRA, B. A. E WARREN, S. T.- Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, **65**: 905-914, 1991.
44. MacDONALD, M.E.; BARNES, G.; SRINIDHI, J.; DUYAO, M.P.; AMBROSE, C.M.; MYERS, R.H.; GRAY, J.; CONNEALLY, P.M.; YOUNG, A.; PENNEY, J. SHOULSON, I.; HOLLINGSWORTH, Z.; KOROSHETZ, W.; BIRD, E.; VONSATTEL, J.P.; BONILLA, E.; MOSCOWITZ, C.; PENCHASZADEH, G.; BRZUSTOWICZ, L.; ALVIR, J.; BICKHAM CONDE, J.; CHA, J.-H.; DURE, L.; GOMEZ, F.; RAMOS-ARROYO, M.; SANCHEZ-RAMOS, J.; SNODGRASS, S.R.; de YOUNG, M.; WEXLER, N.S.; MacFARLANE, H.; ANDERSON, M.A.; JENKINS, B.; GUSELLA J.F.- Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. **J. Med. Genet.**, **30**:982-986, 1993.
45. DUVOISIN, R.C.; CHOKROVERTY, S.; LEPORE, F.; NICKLAS, W.- Glutamate dehydrogenase deficiency in patients with olivopontocerebellar atrophy. **Neurology**, **33**:1322-1326, 1983.
46. BELL, J.- Huntington's chorea. **Treas. Hum. Inher.**, **4**: 1-13, 1934.
47. SCHERZINGER, E.; LURZ, R.; TURMAINE, M.; MANGIARINI, L.; HOLLENBACH, B.; HASENBANK, R.; BATES, G.P.; DAVIES, S.W.;

- LEHRACH, H. E WANKER, E.E.. -Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. **Cell**, **90**:549-558, 1997.
- 48.GUSELLA, J.F. E MACDONALD, M.E.- Huntington's Disease and repeating trinucleotides. **N. Engl. J. Med.**, **330**:1450-1451, 1994.
- 49.DUYAO, M.P.; AUERBACH, A.B.; RYAN, A.; PERSICHETTI, F.; BARNES, G.T.; MCNEIL S.M.; GE, P.; VONSATTEL, J.-P.; GUSELLA, J.F.; JOYNER, A.L.; MACDONALD, M.E. -Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homologus HDH. **Science**, **269**: 407-409, 1995.
- 50.DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K.O.; DAVIES, S.W.; BATES, G.P.; VONSATTEL, J.P.; ARONIN, N. - Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, **277**:1990-1993, 1997.
- 51.TROTTIER, Y.; DEVYS, D.; IMBERT, G.; SAUDOU, F.; NA, I.; LUTZ, Y.; WEBER, C.; AGID, Y.; HIRSCH, E.C., MANDEL, J.L.- Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. **Nature Genétics**, **10**:104-110, 1995.
- 52.LANDWEHRMEYER, G.B.; M.C NEIL, S.M.; DURE, L.S.; AIZAWA, H.; HVANG, Q.; AMBROSE, C.M.; DUYAO, M.P.; BIRD, E.D.; BONILLA, E.; YOUNG,M.; GONZALES, A.J.A.; WEXLER, N.S.; DIFIGLIA, M.; GUSELLA, J.F.; MACDONALD, M.E.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B.; VONSATTEL, J.P.- Huntington's disease gene-regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. **Annals of Neurology**, **37**:218-230, 1995.
- 53.DAVIES, S.W.; TURMAINE, M.; COZENS, B.; DIFIGLIA, M.; SHARP, AH.; ROSS, C.A; SCHERZINGER, E.; WANKER, E.E.; MANGIARINI, L.; BATES, G.P.-

- Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell**, **90**: 537-548, 1997.
- 54.DAVIES, S.W.; BEARDSALL, K.; TURMAINE, M.; DIFIGLIA, M.; ARONIN, N.; BATES, G.P.- Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions? **Lancet**, **351**:131-133, 1998.
- 55.BENJAMIN, C.M.; ADAM, S.; WIGGINS, S. E OUTROS.- Proceed with care; direct predictive testing for the Huntington disease. **Am J Genet**, **55**:606-617, 1994
- 56.SERQUEIROS, J.(ed)- O teste preditivo da Doença de Machado Joseph, UnIGENE, Porto, 1996.
- 57.GENETIC TESTING TASK FORCE.- The Genetic testing alert: practice parameter, American Academy of Neurology. **Practice Handbook**, 312-313, 1996.
- 58.RICHARDS, R.I.; SUTHERLAND, G.R.- Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. **Cell**, **70**:709-712, 1992.
- 59.ROSS, C.A.- When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. **Neuron** ,**15**: 493-496, 1995.
- 60.GASSER, T.; Grobhadem, K.- Advances in the genetics of movement disorders: implication for molecular diagnosis. **J. Neurol**, **244**: 341-348, 1997.
- 61.GUIDINES FOR THE MOLECULAR GENETICS PREDITIVE TEST IN HUNTINGTON DISEASE. **Neurology**, **44**: 1533-1536, 1994.
- 62.NANCE, M.A.; SEVENCIDH, E.A.; SCHUT, L.J.; Knowledge of genetics and attitudes toward genetic testing in two hereditary ataxia's (SCA 1) kindreds. **Am J Med Genet**, **54**:242-248, 1994.

- 63.SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. E MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual Second Edition. Cold Pring Harbor Laboratory, 1989.
- 64.RIESS, O.; NOERREMOELLE, A.; SOERENSEN, A.S. E EPPLEN, J.T.- Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease. **Hum. Mol. Genet.**, 2:637, 1993.
- 65.WARNER, J.P.; BARRON, L.H. E BROCK, D.J.H.- A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington`s disease chromosomes. **Mol. Cel. Probes**, 7: 235-239, 1993.