



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
MESTRADO EM NEUROLOGIA

LUCIANA DE ANDRADE AGOSTINHO

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR INTER E INTRAGERACIONAL DAS REPETIÇÕES
TRINUCLEOTÍDICAS CAG E CCG EM PACIENTES AFETADOS E GRUPO DE
RISCO DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

RIO DE JANEIRO
2011

LUCIANA DE ANDRADE AGOSTINHO

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR INTER E INTRAGERACIONAL DAS REPETIÇÕES
TRINUCLEOTÍDICAS CAG E CCG EM PACIENTES AFETADOS E GRUPO DE
RISCO DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva

RIO DE JANEIRO
2011

616.8
A275i Agostinho, Luciana de Andrade,
Investigação molecular inter e intrageracional das
repetições trinucleotídicas CAG e CCG em pacientes afetados
e grupo de risco da doença de Huntington. / Luciana de
Andrade Agostinho - Rio de Janeiro, 2011.

187 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Lucia Antão Paiva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Mestrado em Neurologia, 2011.

1. Doença de Huntington. 2. CAG. 3. CCG. Alelos expandidos.
I. Paiva, Carmen Lucia Antão. II. Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

LUCIANA DE ANDRADE AGOSTINHO

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR INTER E INTRAGERACIONAL DAS REPETIÇÕES
TRINUCLEOTÍDICAS CAG E CCG EM PACIENTES AFETADOS E GRUPO DE
RISCO DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Joelma Freire de Mesquita
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Rosa Rita dos Santos Martins
Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia - IEDE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a base de tudo.

Ao meu companheiro, Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo;

Aos meus pais que me deram a melhor herança que qualquer um pode dar: minha Educação, e à minha irmã pelo apoio;

À Profa. Carmen Lúcia Antão Paiva, minha chefe MÃE, pelo carinho e apoio;

À Dra. Suely pela efetiva co-orientação;

À Profa. Regina Alvarenga, sempre disposta a ajudar;

Ao Prof. Simão por confiar no desenvolvimento deste estudo e colaborar com ele, e pelas oportunidades;

Aos meus familiares, que me mostraram o verdadeiro valor da palavra família,

Ao Prof. Enrique Medina por abrir as portas do seu laboratório sem ao menos me conhecer e pelo apoio técnico;

À Profa. Joelma, que me acompanha de perto desde o início;

Ao Prof. Thuler pela colaboração na análise estatística;

À Catielly e Ana Amélia, família carioca, pelo companheirismo, pelo apoio, pelas risadas e lágrimas;

À família Caetano e a Maria, exemplo de vida;

À Dr. Cecília, pelo apoio profissional e bons conselhos;

À família Palma, que me deu um segundo lar;

Aos amigos Mariana e Bruno, pela confiança e apoio;

Ao meu companheiro Rodrigo, pela imensa dedicação, carinho e apoio;

Ao Dr. Guilherme Ricciopo e o Laboratório de Neurologia Experimental e Aplicada (USP) que tem como responsável o Dr. Wilson Marques Junior;

Ao secretário da PPGneuro, Luiz, o que seria de mim sem ele?

A todos meus amigos, pois ninguém vive sem amigos;

Ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da FIOCRUZ coordenado pelo Dr. Salvatore Giovanni De Simone pelo apoio técnico;

Aos amigos Eduardo Paradela, Eduardo Nogueira e André Figueiredo, sempre dispostos a ajudar e apoiar;

Ao Diego Coelho, que fez da rotina em laboratório, um local descontraído;

E principalmente àqueles que me disseram ser impossível e que eu não seria capaz, porque foi com ajuda deles que eu consegui mais forças para realizar este sonho;

Ao auxílio financeiro da CAPES/PROAP.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”
(FILIPENSES 4:13)

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença genética rara, neurodegenerativa, progressiva e fatal. A DH é uma desordem autossômica dominante que possui semelhanças com outras doenças também causadas por mutações genéticas por repetições de trinucleotídeos. Esta doença, apesar de se manifestar em idade adulta, pode surgir mais cedo, em casos juvenis. Nestes casos, os indivíduos normalmente apresentam quadro mais severo e a idade de início mais cedo que o esperado em relação à DH adulta. O objetivo deste estudo foi investigar duas regiões polimórficas de repetições de trinucleotídeos CAG e CCG, em uma amostra de 65 indivíduos e seus familiares, e correlacioná-las com a idade de início da doença, além de, correlacionar a região polimórfica CCG com a origem ancestral da mutação responsável por causar a DH no gene *IT15*. Os alelos mais predominantes da região polimórfica CCG possuem 7 e 10 unidades. Na população da Europa, região considerada com alta prevalência da DH, a maior frequência destes alelos têm 7 unidades CCG, e no Japão, país considerado de baixa prevalência, os alelos CCG com maior frequência possuem 10 unidades. A técnica de PCR-SSP foi utilizada na amplificação das regiões alvo deste estudo e a eletroforese capilar foi utilizada para medir o tamanho dos amplicons. Nossos resultados mostraram que 17 indivíduos, dos 65 estudados, tiveram alelos normais para DH. Dos 48 indivíduos, portadores de alelos anormais para DH, dois possuem alelos intermediários (27 a 35 CAG) sem fenótipo da DH e 46 possuem alelos expandidos, dentre eles, 11 portadores de alelos com penetrância reduzida (36 a 39 CAG) e 35 com penetrância completa (maior que 39 CAG). A média da idade de início dos pacientes foi de 41,7 anos. A análise estatística realizada entre tamanho das unidades CAG e a idade de início da DH mostrou forte correlação negativa ($r = -0,84$). O tamanho das unidades CCG em relação à idade de início não mostrou significância estatística ($r = 0,26$). Apenas oito casos, dos 35 com alelos de penetrância completa, ainda não apresentam o quadro clínico da doença. Os alelos CCG com sete unidades foram encontrados em 78% da amostra de pacientes com DH investigados. Portanto, pode-se sugerir, que os indivíduos com DH estudados possuem origem ancestral, em relação à mutação do gene *IT15*, da Europa Ocidental. A análise intrageracional do tamanho das unidades CAG de alelos expandidos não mostrou diferença significativa entre os irmãos. A análise intergeracional dos alelos expandidos mostrou

maior número de ocorrência de expansões nas transmissões paternas. A prevalência mínima calculada na cidade de Ervália - MG foi nove vezes maior em relação à prevalência da Europa Ocidental.

Palavras-chave: Doença de Huntington. CAG. CCG. Alelos expandidos.

ABSTRACT

Huntington disease (HD) is a rare neurodegenerative autosomal dominant genetic disease. It is a progressive and fatal disorder, and in common with other triplet-repeat diseases, HD shows anticipation, whereby successive generations display more severe manifestations or earlier onset of the disease. The aim of this study was to investigate the polymorphic regions CAG and CCG in a Brazilian sample of 65 individuals and correlate them to age at onset of HD and to correlate CCG repeats to ancestral origin of *IT15* gene. CCG sequence is also polymorphic, alleles of 7 or 10 repeats are predominant in populations, and strong linkage disequilibrium between the CCG₍₇₎ allele and HD has been shown in Western HD chromosomes, whereas Japanese HD chromosomes strongly associate with an allele of (CCG)₁₀. PCR-SSP was used for amplifying the target regions and capillary electrophoresis was used for measuring the amplicons. Our results have shown that 17, out of a total of 65 individuals, had normal alleles for HD. Out of the 48 subjects with abnormal alleles, two of them had intermediate alleles of CAG repeats (27-35) and no HD phenotype; and 46 individuals had expanded alleles. The average age of onset of HD was 41.7 years. The correlation between number of CAG repeats and age of onset of clinical manifestations was negative ($r = -0.84$). There was no statistically significant correlation between CCG repeats and age at onset of HD ($r = 0.26$). Among those cases that had expanded alleles, 11 had alleles with reduced penetrance (36-39 CAG repeats) and 35 had alleles with complete penetrance (>39 CAG repeats). Only eight out of the later cases have not showed the disease yet. CCG₍₇₎ alleles were found in 78% of 48 individuals who had abnormal alleles. Therefore, the majority of Brazilian subjects who participated in this study had HD mutated genes with Western European ancestry. Intragenerational investigation of CAG expanded alleles showed no significant difference in the brotherhood. Intergenerational analysis of expanded alleles has shown that their variability was greater in paternal transmission, but occurrence of contractions was greater in maternal transmission. In most Brazilian HD-affected participants of this research, the putative origin of the mutated gene was in Western Europe (GCC)₇. Minimum prevalence of HD for Eralia was found to be nine times higher than HD prevalence in Europe.

Key words: Huntington disease. CAG. CCG. Expanded alleles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Artigo original do médico George Huntington, quando ele descreveu a Coréia, termo usado antes para se referir a Doença de Huntington (HUNTINGTON, 1872)	27
Figura 2	Histórico detalhado da DH (BATES, 2005)	28
Figura 3	Diagrama do gene <i>IT15</i> mostrando a localização das repetições de trinucleotídeos CAG e a classificação dos intervalos de unidades CAG que definem um indivíduo portador de alelos normais, intermediários, com penetrância reduzida ou com penetrância completa (KENNEY; POWELL; JANKOVIC, 2007; THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993, apud ANDRICH, 2008)	29
Figura 4	Modelos de mecanismos mutacionais que explicam a variação das unidades de repetição, durante a replicação do DNA. a) recombinação genética desigual e b) deslizamento da DNA polimerase (slippage) (WEBER; WONG, 1993, apud GEMAYEL et al., 2010)	32
Figura 5	Auto radiograma de um gel mostrando os produtos da PCR de três indivíduos afetados pela DH. Onde estão demonstrados os alelos normais (N) e os expandidos (E) de diferentes amostras biológicas de cada indivíduo testado, como linfócitos (L) e células do esperma (S) (WHEELER, et al., 2007)	36
Figura 6	Fotografia de um gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. No <i>slot</i> de número um do gel foi aplicada a escala alélica, no <i>slot</i> dois, três e cinco foram aplicados os amplicons das reações de PCR com a <i>AmpliTaq[®] DNA Polymerase</i> , nas quais foram variadas as concentrações de DNA: entre 50, 100 e 200 ng, respectivamente, para 12,5 µL de volume total. No <i>slot</i> quatro foram aplicados amplicons nas mesmas condições da reação do <i>slot</i> cinco, exceto a enzima utilizada que foi a <i>GoTaq[®] Green Master Mix</i>	51
Figura 7	Eletroferograma resultante de uma análise de fragmentos polimórficos das reações de PCR com 10 ng de DNA da amostra de número 001. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais; picos azuis vazios: <i>stutters</i> e picos cor laranja: escala alélica padrão (<i>G5 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA</i>)	52
Figura 8	Eletroferograma resultante de uma análise de fragmentos polimórficos das reações de PCR com 100 ng de DNA da amostra de número 001. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais; picos azuis vazios: <i>stutters</i> e picos cor laranja: escala alélica padrão (<i>G5 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA</i>)	52

Figura 9	Representação das duas regiões polimórficas analisadas, localizadas na região inicial do primeiro exon do gene <i>IT15</i> . Em azul encontra-se a região polimórfica de interesse deste estudo com repetições de trinucleotídeos CAG e em amarelo encontra-se a região de repetição da trinca CCG	53
Figura 10	Localização da região de hibridação dos <i>primers</i> no primeiro exon do gene <i>IT15</i> . Em amarelo a região do <i>primer</i> HD1-6FAM com fluoróforo, em azul a do HD3 e em vermelho a do HD4	53
Figura 11	Análise da região polimórfica CAG de um indivíduo afetado pela DH, variando os número dos ciclos de amplificação da PCR entre 20, 25, 30, 35, 40 e 45 (WILLIAMS et al. 1999)	54
Figura 12	Eletroferograma da amostra de número 004 analisada com os <i>primers</i> HD1-6FAM/HD3 na UNIRIO. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais. Primeiro pico vazio: artefato correspondente ao <i>primer</i>	59
Figura 13	Eletroferograma da amostra de número 004 analisada com os <i>primers</i> HD1-6FAM/HD3 no NUDIM	59
Figura 14	Eletroferogramas das reações de controle negativos sem DNA, cada reação representa um lote de reações de PCR realizadas em cada dia de experimento	60
Figura 15	Heredograma de número 15, parcial, mostrando somente os indivíduos testados em nível molecular, pelo presente estudo, com oito indivíduos afetados para DH. Abaixo de cada símbolo no heredograma aparecem os valores das repetições CAG e, logo embaixo destes, os dois alelos da região CCG. Entre parênteses está o número de identificação correspondente a cada objeto de pesquisa. Legenda: - Afetado do sexo feminino; - Afetado do sexo masculino	65
Gráfico 1	Frequência dos indivíduos apresentados nos heredogramas	65
Figura 16	Heredograma 001 apenas com a parte de indivíduos testados (símbolo do heredograma ampliado) para DH	66
Figura 17	Heredograma 005 com indivíduos testados	67
Figura 18	Heredograma 008 com quatro indivíduos testados, três afetados e um não afetado	67
Figura 19	Heredograma 011 com três irmãs afetadas, testadas	68
Figura 20	Heredograma 015, com 15 indivíduos, foram testados para DH, e oito tiveram teste positivo para DH	69
Figura 21	Heredograma 016 com cinco indivíduos testados, todos afetados .	70
Figura 22	Heredograma 017 com sete indivíduos testados, quatro diagnosticados pelo teste molecular como afetados	71

Figura 23	Heredograma 019 com nove indivíduos testados, sendo que oito foram diagnosticados como portadores de alelos expandidos pelo teste molecular	71
Gráfico 2	Análise intrageracional: variação do número de repetições CAG do alelo expandido entre irmãos, classificados por heredograma e origem materna ou paterna. As barras de cores diferentes identificam os irmãos portadores de alelos expandidos. As cores variadas das barras representam cada irmão da mesma família	72
Gráfico 3	Distribuição das repetições CAG em todos os alelos genotipados (n=122). O número de unidades de repetições trinucleotídicas CAG por alelo está representado no eixo x e o número dos alelos detectados para cada repetição no y	75
Gráfico 4	Frequência dos alelos intermediários (mutáveis) e dos expandidos com penetrância completa e reduzida na amostra estudada	76
Gráfico 5	Frequência absoluta dos alelos da região polimórfica CCG, no gene <i>IT15</i> (n=48)	76
Figura 24	Cópia da página do <i>software Oligonucleotide Properties Calculator</i> , utilizado para analisar os <i>primers</i>	78
Figura 25	Resultado da avaliação do <i>primer</i> HD1 pelo <i>software Olig Calc</i> , mostrando as regiões com capacidade de formação de <i>hairpin</i>	79
Figura 26	Resultado da avaliação do <i>primer</i> HD2-HEX pelo <i>software Olig Calc</i> , mostrando as regiões com capacidade de formação de <i>hairpins</i>	79
Figura 27	Resultado da avaliação do <i>primer</i> HD3-6FAM <i>software Olig Calc</i> , mostrando a inexistência de regiões com capacidade de formação de <i>hairpins</i>	79
Figura 28	Eletroferogramas dos produtos de amplificação dos alelos de tamanhos normais para o gene <i>IT15</i> , de amostras diferentes. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais. Picos azuis vazios: picos de bandas <i>stutters</i>	81
Figura 29	Eletroferograma dos produtos de amplificação dos alelos anormais para o gene <i>IT15</i> , de amostras diferentes. Picos azuis cheios: picos principais. Picos azuis vazios: picos de bandas <i>stutters</i> . a) perfil alélico com 1 a 3 bandas de <i>stutters</i> que acompanham o pico principal; b) perfil alélico com grupo de 3 a 10 bandas de <i>stutters</i>	82
Figura 30	Eletroferogramas de amplicons produzidos por PCR, com os primers HD1-FAM e HD3 de amostras diferentes, com picos inespecíficos de 100 e 234 pb, indicados por setas vermelhas. Os picos azuis cheios são picos principais e os picos azuis vazios são bandas <i>stutters</i> . Os valores de fluorescência estão lançados no eixo y	83

Figura 31	<p>Eletoferograma dos amplicons da reação de PCR, com os <i>primers</i> HD1-FAM e HD4. Pico azul cheio: pico principal que representa o fragmento com 162,65 pb. Pico azul vazio vizinho ao principal: pico de banda <i>stutter</i>. Demais picos azuis vazios: picos inespecíficos de 100; 159, 74 e 170,4 pb indicados pelas setas vermelhas</p>	83
Gráfico 6	<p>Correlação negativa entre número de unidades CAG dos alelos anormais (expandidos e mutáveis) para DH e idade de início das manifestações clínicas</p>	88
Gráfico 7	<p>Correlação entre número de repetições CCG dos alelos anormais (expandidos e mutáveis) para DH e idade de início das manifestações clínicas</p>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Doenças neurodegenerativas causadas por repetições de trinucleotídeos	23
Tabela 2	Perfil alélico da região polimórfica CAG de populações diferentes .	34
Tabela 3	Mediana e idade de início dos primeiros sintomas da DH na ilha de Creta	35
Tabela 4	Distribuição do número de repetições CAG em indivíduos com DH de acordo com a nacionalidade e grupo étnico	35
Tabela 5	Perfil alélico da região polimórfica CCG de diferentes populações .	37
Tabela 6	Transmissão do alelo expandido CAG na população da Venezuela	38
Tabela 7	Transmissão do alelo expandido CAG na população brasileira	39
Tabela 8	Transmissão do alelo expandido CAG a prole do sexo feminino e masculino na população da Venezuela	39
Tabela 9	Iniciadores genéticos utilizados no protocolo de PCR do presente estudo	50
Tabela 10	Exemplificação do cálculo realizado para determinar o número de repetições de trinucleotídeos CAG de cada amplicon. Fórmula: $(A)-[(B)+(C)]/3=$ Número de repetições CAG	57
Tabela 11	Demonstração do cálculo realizado para determinar o número de repetições de trinucleotídeos CCG de cada indivíduo. Fórmula: $(E)-[(F)+(G)]/3=$ Número de repetições CCG	57
Tabela 12	Descrição das variáveis avaliadas na amostra estudada	63
Tabela 13	Transmissão do alelo expandido CAG nos indivíduos do presente estudo	73
Tabela 14	Análise intergeracional da variação do tamanho dos alelos expandidos transmitidos para os filhos afetados pela DH, em relação a herança materna ou paterna do alelo mutado	73
Tabela 15	Transmissão do alelo expandido CAG a prole do sexo feminino e masculino na população estudada	74
Tabela 16	Marcadores genéticos utilizados no primeiro protocolo da PCR utilizado	78
Tabela 17	Estudo estatístico do tamanho dos fragmentos (em pb) correspondentes aos alelos CAG genotipados	85
Tabela 18	Estudo estatístico do tamanho dos fragmentos (em pb) correspondentes aos alelos CCG genotipados	86

Tabela 19	Descrição dos resultados de determinação do número de repetições CAG dos dois alelos de cada indivíduo determinados pelo presente estudo (UNIRIO) e realizados em outros laboratórios (n=12 amostras reanalisadas). Alelo 1 corresponde ao menor alelo da região polimórfica CAG, e o alelo 2, o maior, de cada indivíduo testado em nível molecular	86
Tabela 20	Descrição entre o tamanho dos alelos CAG de indivíduos portadores de alelos anormais para DH e a idade de início das manifestações clínicas	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic factor</i>
CAG	Citosina, Adenina e Guanina (trinucleotídeos)
CCG	Citosina, Citosina e Guanina (trinucleotídeos)
DH	Doença de Huntington
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Deoxy Nucleotide Triphosphate</i>
DRPLA	<i>Dentatorubropallidoluyisian Atrophy</i>
EDTA	<i>Tris Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
GRIK2	<i>Glutamate receptor Ionotropic Kainate 2</i>
HDL	<i>Huntington's disease-like</i>
HTT	Huntintina
HUGG	Hospital Universtitário Gaffrée e Guinle
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>IT15</i>	Gene responsável por causar a doença de Huntington
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MJD	<i>Machado Joseph disease</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NUDIM	Núcleo de Dignóstico e Investigação Molecular
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
q.s.p.	quantidade suficiente para
RHES	<i>Ras homolog enriched in striatum</i>
SCA	<i>Spinocerebellar Ataxy</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UCHL1	<i>Ubiquitin Carboxyl Terminal Eserase L1</i>
UF	unidade fluorescência
6FAM	6 carboxifluoresceína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS CAUSADAS POR MUTAÇÕES DINÂMICAS	22
2.2	MUTAÇÕES DINÂMICAS	24
2.3	DOENÇA DE HUNTINGTON	25
2.3.1	Breve histórico	26
2.3.2	Genética	28
2.3.2.1	Gene responsável pela DH	28
2.3.2.2	Regiões polimórficas de trinucleotídeos de repetição CAG e CCG	33
2.3.2.3	Fatores inter e intrageracionais dos alelos expandidos	38
2.3.3	Huntintina (HTT)	39
2.3.4	Mecanismos de neurodegeneração	42
2.3.5	Sinais e sintomas clínicos presentes na DH	44
2.3.6	Tratamento atual e perspectivas sobre o tratamento	45
3	OBJETIVO GERAL	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	CASUÍSTICA	48
4.1.1	Crítérios de inclusão/exclusão	48
4.1.2	Instrumentos utilizados para a coleta de dados	48
4.2	MÉTODOS	49
4.2.1	Coleta de material biológico	49
4.2.2	Extração de DNA	49
4.2.3	Reações da PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	49
4.2.4	Deteção do produto de amplificação	55
4.3	COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS	55
4.3.1	Análise e seleção dos fragmentos polimórficos gerados pela PCR	56
4.3.2	Cálculo das regiões CAG e CCG	57
4.3.3	Classificação dos indivíduos investigados em relação ao tamanho dos alelos CAG	58
4.3.4	Análise estatística	58

4.4	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS	58
4.5	ASPECTOS ÉTICOS	60
5	RESULTADOS	62
5.1	DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA	62
5.1.1	Heredogramas	64
5.1.2	Expansão ou contração inter e intrageracional dos alelos anormais para DH	66
5.1.3	Distribuição dos alelos da região polimórfica CAG na amostra estudada	74
5.1.4	Distribuição dos alelos da região polimórfica CCG na amostra	76
5.3	REAÇÃO DE PCR	77
5.3.1	Padronização da PCR quanto aos <i>primers</i>	77
5.3.2	Produtos de amplificação	80
5.3.3	Determinação dos tamanhos dos alelos	84
5.4	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS	86
5.5	CASOS DE DH SELECIONADOS	87
5.6	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	87
5.6.1	Casuística	87
5.6.2	Correlação entre o tamanho da região polimórfica CAG e idade de início das manifestações clínicas	88
5.6.3	Correlação entre o tamanho da região polimórfica CCG e a idade de início das manifestações clínicas	90
5.6.4	Comparação dos resultados validados por outros laboratórios	90
6	DISCUSSÃO	91
6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS UTILIZADOS	91
6.1.1	Extração de DNA	91
6.1.2	Reações da PCR	92
6.1.2.1	Produtos de amplificação	93
6.1.3	Eletroforese capilar	94
6.1.3.1	Definição do tamanho dos alelos	95
6.2	CASUÍSTICA	95
6.2.1	Investigação inter e intrageracional dos alelos anormais para DH ..	98
6.2.2	Região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CAG	100
6.2.3	Região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CCG	103
6.3	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS	105

6.4	ALELOS EM HOMOZIGOSE E SNP (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM</i>)	106
6.5	ASPECTOS ÉTICOS	107
7	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110
	APÊNDICE A - Questionário de coleta de dados para os indivíduos que participaram do estudo	122
	APÊNDICE B - Heredogramas dos objetos de estudo	123
	APÊNDICE C - Artigo de revisão enviado para publicação	138
	APÊNDICE D - Tabela com informações dos indivíduos portadores de alelos anormais para DH analisados	149
	APÊNDICE E - Resultados da análise de fragmentos por eletroforese capilar (eletroferogramas) de cada paciente	151
	ANEXO A - Carta de colaboração da Associação Brasil Huntington	184
	ANEXO B - Aprovação do Comitê de ética e de pesquisa em seres humanos	186
	ANEXO C - Documento de colaboração do projeto da cidade de Ervália - MG	187

1 INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (DH) é uma doença genética neurodegenerativa rara, progressiva e fatal. Nesta dissertação foi realizada uma investigação, em nível molecular, da variabilidade das expansões ou contrações das repetições CAG e CCG no gene *IT15*, em indivíduos afetados e grupo de risco de DH provenientes do Estado do Rio de Janeiro e do município de Ervália-MG. Tal estudo teve enfoque intergeracional, em relação à transmissão materna ou paterna dos alelos mutados e investigará a relação entre as regiões polimórficas com repetições de trinucleotídeos CAG e CCG com a idade de início da DH. Além de investigar a origem ancestral do gene mutado da DH em relação a sua origem ancestral por meio da região polimórfica CCG.

1.1 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A DH é uma desordem neurodegenerativa e não existe tratamento que retarde ou previna seu início e progressão, por isso, causa grande ônus para as famílias e para a sociedade.

A variabilidade clínica da doença exige uma investigação genética precisa em nível molecular para que seja feito o diagnóstico definitivo, uma vez que os primeiros sintomas da DH podem ser semelhantes aos de outras doenças com melhor prognóstico, e também para a realização de um estudo epidemiológico fidedigno no Brasil, país onde a prevalência e a origem ancestral da DH são desconhecidas.

No Brasil, os estudos intergeracionais e investigações moleculares sobre a Doença de Huntington são poucos, os custos são elevados e as técnicas aplicadas laboriosas. Além disso, as informações sobre os alelos responsáveis por causar a DH existentes na literatura ficam confusas diante de casos curiosos como o relatado por Andrich e colaboradores (2008), no qual um alelo intermediário foi capaz de causar a DH em um indivíduo, e o outro caso reportado por Kenney, Powell e Jankovic (2007) cujo tamanho de repetições causadoras do quadro de DH foi de apenas 29 tripletos CAG.

Pelo exposto torna válida e interessante a investigação molecular de pacientes brasileiros afetados pela DH e grupo de risco, inclusive a análise entre gerações destes alelos expandidos com foco na antecipação.

Um benefício extra desta dissertação, uma vez que as técnicas moleculares para o diagnóstico laboratorial de rotina da DH não estão disponíveis na rede SUS do Brasil, foi a realização das técnicas para determinação das expansões CAG, sem nenhum custo para o paciente. O que representa um passo importante para se estabelecer o diagnóstico preciso em indivíduos afetados e grupo de risco da DH, possibilitando assim, a definição do prognóstico e o aconselhamento genético familiar dos indivíduos.

Realizar um estudo sobre a DH é muito difícil, seja pelos fatores financeiros, seja pelos fatores governamentais e/ou pelos aspectos éticos. Existem estudos intergeracionais e investigações moleculares da Doença de Huntington em muitos outros países, porém, no Brasil, são necessárias maiores investigações, pois a grande miscigenação genética existente na população brasileira possibilita a ocorrência de relatos de casos inéditos e características distintas sobre a DH em relação a outros países. Portanto, um estudo nessa área será uma contribuição importante para a ciência brasileira para que possa estabelecer o diagnóstico preciso da DH em indivíduos afetados e grupo de risco, possibilitando assim, a definição do prognóstico e o aconselhamento genético dos pacientes envolvidos. Desse modo, pretende-se contribuir com as estatísticas nacionais sobre DH e indivíduos portadores do gene mutado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS CAUSADAS POR MUTAÇÕES DINÂMICAS

As doenças neurodegenerativas formam um grupo muito heterogêneo de doenças, compreendendo entidades causadas por uma série de mecanismos distintos. Um desses mecanismos é a ocorrência de mutações dinâmicas (CHILDS; VALLE, 2000, apud CENDES, 2004).

As doenças causadas por mutações dinâmicas começaram a ser identificadas em 1991, com a clonagem do gene responsável pela síndrome do X-frágil (CUMMINGS; ZOGHBI, 2000 apud CENDES, 2004). Vale ressaltar que existem registros de pelo menos 18 doenças neurológicas resultantes desse tipo de mutação (PULST, 2003, apud CENDES, 2004).

Cada uma dessas doenças possui o quadro clínico relacionado com determinada região acometida do sistema nervoso central, onde ocorre a degeneração, cujo mecanismo, apesar de muitos estudos realizados, ainda não está totalmente compreendido (ZUCCATO; VALENZA; CATTANEO, 2010).

A variabilidade clínica em indivíduos portadores de uma mesma doença e a semelhança de sinais e sintomas entre seus vários tipos faz das doenças neurodegenerativas um grupo de patologias para as quais o teste molecular é uma ferramenta indispensável para o diagnóstico definitivo. As expansões instáveis de trinucleotídeos têm sido pesquisadas em um grande número de doenças neurodegenerativas (Tabela 1) incluindo a Doença de Huntington, as ataxias espinocerebelares SCA1 (*spinocerebellar ataxy 1*), SCA2, SCA3 (ou Doença de Machado-Joseph), SCA6, SCA7, SCA8, SCA12 e SCA17, as *Huntington's disease-like* tipo 1, 2, 3 e 4 (HDL1, HDL2, HDL3 e HDL4), a DRPLA (*dentatorubropallidoluysian atrophy*) atrofia dentatorrubropalido-luisiana (SILVA et al., 2000; SCHNEIDER; WALKER; BHATIA, 2007) e a Doença de Kennedy, que apresenta atrofia muscular bulbo espinhal (FERNANDES; SILVA 2009).

Tabela 1: Doenças neurodegenerativas causadas por repetições de trinucleotídeos

Doença	Gene produtor	Repetição	Local afetado	Número de repetições	
				Normal	Afetado
Doença de Huntington	<i>IT15</i> (4p16.3)	CAG	Córtex cerebral (estriado)	11 a 34	40-121
Doença de Machado-Joseph ou SCA3	<i>MJD</i> (14q32.1)	CAG	Córtex cerebral	13-36	68-79
Atrofia dentatorrubropalidoluisiana	Atrofina (12p12-13)	CAG	Medula espinhal	7 a 25	49-68
Doença de Kennedy	Receptor androgênico (Xq11-12)	CAG	Neurônios motores	11 a 33	40-62
Síndrome de tremor e ataxia associada ao X frágil	<i>FXTAS</i> (Xq27.3)	CpG	Dendritos neuronais	10 a 52	53-200
Distrofia miotônica (<i>Steinert</i>)	<i>DM</i> (19q13.3)	CTG	Multissistêmico	5 a 30	45-3000
Ataxia espinocerebelar 1 (SCA1)	<i>ATXN1</i> (6p23)	CAG	Células de Purkinje, oliva e sistema espinocerebelar	25-35	44-91
Ataxia espinocerebelar 2 (SCA2)	<i>ATXN2</i> (12q24)	CAG	cerebelo e outras áreas cerebrais	15 a 24	35-59
Ataxia espinocerebelar 6 (SCA6)	<i>CACNA1A</i> (19p13)	CAG	cerebelo (canais de cálcio-dependentes)	< 18	20-33
Ataxia espinocerebelar 7 (SCA7)	<i>ATXN7</i> (3p21.1-p12)	CAG	Cerebelo (perda neuronal)	até 33	>36
Ataxia espinocerebelar 8 (SCA8)	<i>ATXN8OS</i> (13q21)	CTA/CTG	cerebelo	15-50	80-50
Ataxia espinocerebelar 12 (SCA12)	<i>PPP2R2B</i> (5q32)	CAG	cerebelo	4-32	51-78
Huntington-like 1	<i>PRNP</i> (20p12)	CAG	gânglios da base, cerebelo, lobo frontal e temporal	-----	proteína priônica expandida
Huntington-like 2	<i>JPH3</i> (16q24.3)	CTG/CAG	regulação intracelular de cálcio	6 a 28	44-57
Huntington-like 3	4p15.3	CAG	núcleo caudado e córtex frontal	-----	ainda não identificado
Huntington-like 4 ou SCA17	<i>TBP</i> (6q27)	CAA/CAG	cerebelo	25 a 42	>48

Fonte: (KAIMEN-MACIEL et al., 1998; SCHNEIDER; WALKER; BHATIA, 2007; FERNANDES et al., 2009).

2.2 MUTAÇÕES DINÂMICAS

As mutações dinâmicas são caracterizadas como expansões instáveis de trinucleotídeos e determinam mais de 40 doenças neurológicas, neurodegenerativas e neuromusculares. As mutações dinâmicas são consideradas instáveis por possibilitarem a transmissão de alelos de números variados através das gerações (ALBANO, 2000). Este tipo de mutação são alterações no número das unidades de repetições de trinucleotídeos, que podem apresentar expansões por meio de inserções ou contrações por meio de deleções. A alteração de apenas uma parte da unidade de repetição é muito rara (GEMAYEL et al., 2010).

A taxa de mutação dessas regiões com repetições trinucleotídicas é em geral, de 10 a 100.000 vezes superior a média das ocorrências de mutações em outras partes do genoma, representada por 10^{-3} a 10^{-7} por divisão celular. Já nas regiões de microssatélites, regiões do DNA compostas de um a seis nucleotídeos repetidos *in tandem*, a taxa de mutação é maior que 10^{-2} (WEBER; WONG, 1993, apud GEMAYEL et al., 2010).

A instabilidade destas regiões provavelmente leva a uma formação incomum da estrutura do DNA durante o processo de replicação, reparo e recombinação genética (PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005).

Os indivíduos não afetados por doenças genéticas causadas por este tipo de mutações apresentam repetições trinucleotídicas dentro de um limite normal (menores que 27 cópias CAG), porém, os indivíduos afetados possuem um número de cópias CAG maior que 35, sendo essas mutações as determinantes de alelos expandidos (HARDING, 1993, apud CENDES, 2004). Os alelos normais são estáveis quando transmitidos de uma geração a outra, ao contrário dos alelos expandidos, que são altamente instáveis quando transmitidos à prole (HAYDEN, 2000).

As doenças causadas por mutações dinâmicas podem ser classificadas em dois grandes grupos, em relação à região onde se encontra a alteração genética: doenças envolvendo sequências intrônicas ou não codantes, e doenças envolvendo regiões exônicas ou codantes (CENDES, 2004). A Doença de Huntington, alvo do presente estudo, se inclui neste último grupo.

O grupo de doenças neurodegenerativas causadas especificamente por repetições CAG (citosina, adenina, guanina), cujo alelo expandido está localizado

em regiões codantes do DNA é composto por algumas doenças com quadro clínico semelhante, e por isso, o diagnóstico é mais difícil sem a investigação molecular do indivíduo (ORR; ZOGHBI, 2007).

As expansões de trinucleotídeos localizadas nas regiões de repetições CAG no primeiro exon do gene *IT15* (4p16.3) ocorrem, como já mencionado, devido à inserção de sequências repetidas de trinucleotídeos maior que 26 cópias (LA SPADA et al., 1992; ASHLEY; WARREN, 1995) e são de causa incerta. Uma das possibilidades seriam erros ocorridos no processo de replicação ou de reparo do DNA (HORMOZIAN et al., 2004).

Avanços experimentais nessa área, na tentativa de explicar os mecanismos de instabilidade das repetições gênicas e de trinucleotídeos, ampliaram a compreensão desse processo de mutação. Já foram reveladas vias metabólicas do organismo humano que podem ter um papel protetor em relação às alterações causadas pelas repetições instáveis (PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005).

2.3 DOENÇA DE HUNTINGTON

A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa, rara, progressiva e fatal, caracterizada pela falta de coordenação motora de músculos voluntários e involuntários (movimentos coreicos), distúrbios de personalidade e demência progressiva (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993 apud ZUCCATO; VALENZA; CATTANEO, 2010).

A prevalência da DH varia de acordo com a origem étnica (SILVA et al., 2000), nos caucasianos do norte da América e na Europa ocidental são 5-10 afetados a cada 100.000 indivíduos (HORMOZIAN et al., 2004; GIL; REGO, 2008).

Alguns países da Ásia, como o Japão e a China, além da Finlândia na Europa, possuem prevalência da DH abaixo da média descrita em relação a outros locais do mundo. No sul da África foi realizado um estudo com 11 indivíduos e a prevalência foi de 0.01 afetados a cada 100.000. O mesmo tipo de estudo foi conduzido no norte dos Estados Unidos com negros de descendência africana, e a prevalência subiu para 0.97 afetados a cada 100.000 indivíduos. Já em outras regiões, como na Tasmânia e Venezuela, a média é maior em relação àquela

normalmente encontrada (RASKIN et al., 2000). No Brasil, a prevalência ainda é desconhecida.

A DH é uma desordem de causa genética, neurológica e de idade adulta, geralmente se manifesta entre 35-55 anos, o que não impede que comece aos 80 anos ou mais cedo, em jovens e crianças, como no fenômeno de antecipação (Huntington juvenil). Considerando que a antecipação ocorre em 20% dos casos de DH, aproximadamente 10% dos pacientes com Huntington têm início das manifestações clínicas antes dos 20 anos e 5% antes dos 14 anos. Quando a transmissão do alelo expandido é de origem materna raramente aumenta mais de 20 unidades de repetições no alelo dos filhos (ANDREW et al., 1993; NAHHAS et al., 2005).

Os casos esporádicos da DH constituem mais de 8% dos indivíduos afetados. São causados por expansões trinucleotídicas *de novo* e geralmente por alelos intermediários que por serem instáveis podem gerar um indivíduo afetado pela DH (NAHHAS et al., 2005).

A partir do aparecimento dos primeiros sintomas o portador tem sobrevida de 15-20 anos com agravamento do quadro (HO et al., 2001). A variabilidade clínica, na apresentação dos sinais e sintomas da doença, muitas vezes exige uma investigação molecular precisa em nível genético para determinação definitiva do diagnóstico (STEVANIN; FUJIGASAKI; LEBRE, 2003).

2.3.1 Breve histórico

A doença de Huntington foi descrita pela primeira vez em 1860, pelo físico norueguês Johan Christian Lund, que lhe deu o nome de *Chorea Vitus*; entretanto, a repercussão do fato foi praticamente nula.

Em 1872, um médico de Long Island (EUA), Dr. George Huntington, descreveu detalhadamente uma afecção que chamou de coréia hereditária. A história relata que pessoas identificadas como bruxas em épocas passadas, muitas delas eram, na verdade, vítimas dessa enfermidade. O termo coréia, derivado do grego, significa dança, e é uma designação muito apropriada para as alterações motoras presentes nesta síndrome, semelhantes a alguns passos de dança (BARSOTTINI, 2007).

No artigo original (Figura 1), George Huntington descreveu uma série de alterações, caracterizando um quadro sindrômico em que a característica mais marcante e típica é um espasmo clônico afetando os músculos voluntários sem ocorrer perda da sensibilidade ou consciência (HUNTINGTON, 1872).

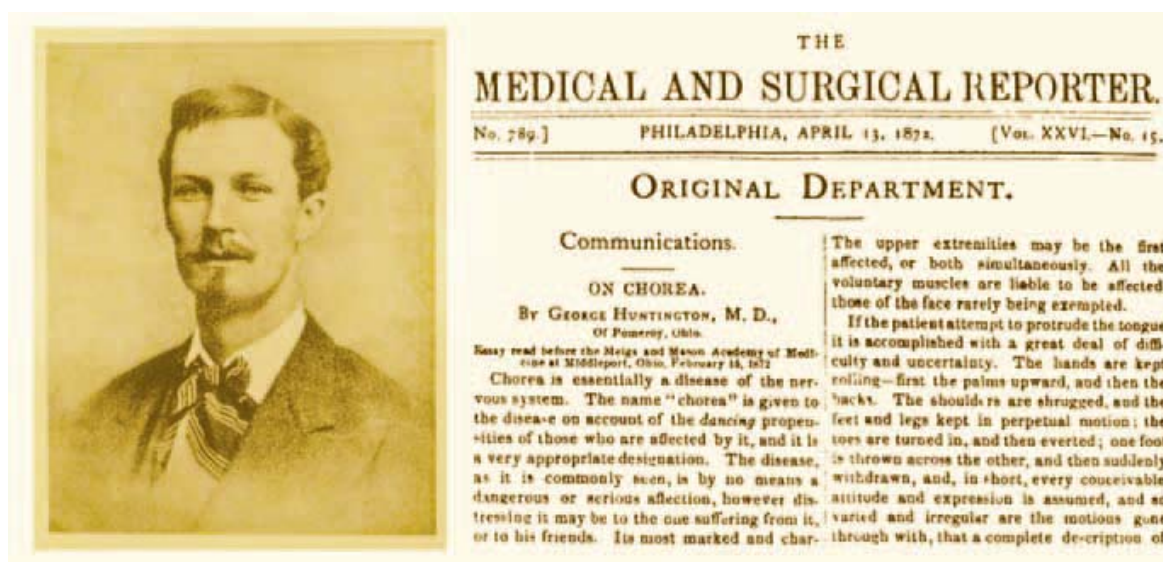


Figura 1: Artigo original do médico George Huntington, quando ele descreveu a Coréia, termo usado antes para se referir a Doença de Huntington (HUNTINGTON, 1872)

Em 1979, foi iniciado um trabalho às margens do lago Maracaibo, na Venezuela, que durou 12 anos e foram coletadas aproximadamente 4.000 amostras de sangue de indivíduos afetados e grupo de risco pela DH, investigação liderada pela médica geneticista Dr. Nancy Wexler. Neste estudo pioneiro foi identificada a maior família afetada pela DH (PENNEY et al., 1990).

Gussela, Wexler e Coneally, em 1983, conseguiram localizar o gene responsável pela DH (*IT15*) através da técnica de polimorfismos de fragmentos de restrição com auxílio de uma sonda denominada G8. O gene *IT15* foi o primeiro gene localizado responsável por causar uma doença genética em cromossomos humanos (LANOIS; PAVIOT, 1897 apud BATES, 2005).

Entretanto, foi em 1993 que o *Huntington Disease Collaborative Research Group* isolou o gene responsável pela DH (GIL; REGO, 2008) e descobriu que a mutação responsável pela doença de Huntington é a expansão da repetição dos

trinucleotídeos CAG localizada na região 5' do gene *IT15* no braço curto do cromossomo 4 (Figura 2).

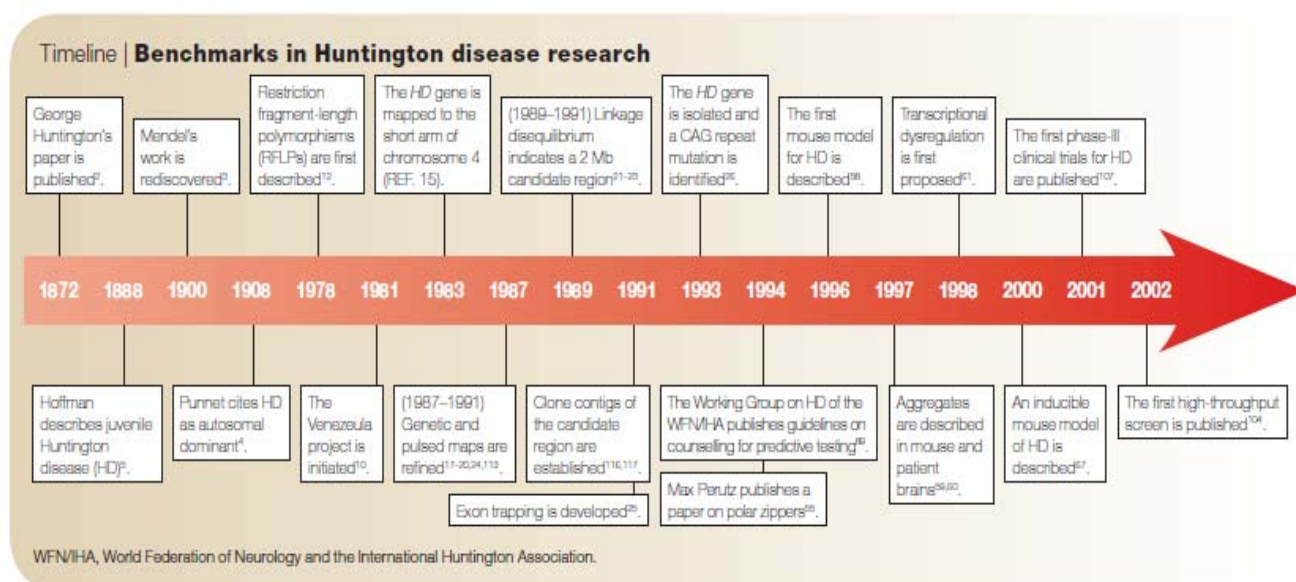


Figura 2: Histórico detalhado da DH (BATES, 2005)

2.3.2 Genética

2.3.2.1 Gene responsável pela DH

A doença de Huntington, como já mencionado anteriormente, ocorre por uma mutação no gene *IT15*, localizado no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3). Esta mutação instável está localizada na seqüência codificadora do gene *IT15* e se apresenta por meio de uma variação no número de repetições de trinucleotídeos CAG no primeiro exon e, quando expandida, codifica uma cadeia de poliglutamina próxima à região amino-terminal da proteína conhecida como huntintina (MARGOLIS; ROSS, 2003).

Muitos estudos realizados em indivíduos com etnias diferentes permitiram a determinação de unidades de repetições CAG consideradas normais e expandidas. A *American College Of Medical Genetics*, *American Society Of Human Genetics* e o *Huntington Disease Genetic Testing Working Group*, em 1998, dividiram a

correlação genótipo/fenótipo em quatro categorias em relação ao tamanho das repetições CAG no exon 1 do gene *IT15* (Figura 3).

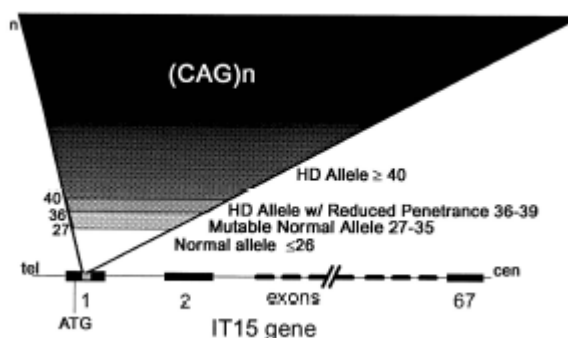


Figura 3: Diagrama do gene *IT15* mostrando a localização das repetições de trinucleotídeos CAG e a classificação dos intervalos de unidades CAG que definem um indivíduo portador de alelos normais, intermediários, com penetrância reduzida ou com penetrância completa (KENNEY; POWELL; JANKOVIC, 2007; THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993, apud ANDRICH, 2008)

Os alelos considerados normais possuem menos de 27 cópias CAG, com fenótipo normal. Os alelos intermediários têm de 27 a 35 repetições CAG, são considerados instáveis, e por isso, há risco de transmissão de um alelo expandido para a prole, apesar disso, os portadores deste tipo de alelo apresentam um fenótipo normal.

Os alelos com 36 a 39 unidades CAG são denominados de pré-mutacionais com penetrância reduzida e podem gerar tanto um fenótipo normal como um fenótipo da DH, apesar do risco ser menor. E os alelos com mais de 39 cópias CAG são os de penetrância completa, e determinam, inevitavelmente, em alguma etapa da vida o fenótipo da Doença de Huntington.

Os alelos com menos de 26 repetições CAG não estão associados ao fenótipo da DH e não demonstram instabilidade gênica. Apesar de existirem dois curiosos relatos de casos de indivíduos com quadro de DH. Um caso atípico foi relatado, em 2008, na Alemanha, de um paciente com quadro de DH causado por um alelo intermediário com apenas 34 unidades CAG. O indivíduo investigado era um homem com 75 anos com movimentos coreicos, distúrbios cognitivos progressivos desde 15 anos, portador de alelos em heterozigose com 17 e 34

unidades de repetições CAG. A análise molecular foi feita a partir de linfócitos sanguíneos e também de células da mucosa bucal em dois laboratórios diferentes, além de ter sido realizado o diagnóstico diferencial de outras doenças como doenças inflamatórias (Lupus eritematoso sistêmico e doenças reumáticas), doenças infecciosas, doença de Wilson, neuroacantocitose, DRPLA, SCA17 e alterações hormonais tireoidianas. Ele não possuía histórico familiar da DH, e seu pai morreu aos 72 anos com carcinoma (ANDRICH et al., 2008).

Outro caso, recentemente foi relatado por Kenney, Powell e Jankovic (2007), de um paciente com sintomas semelhantes à DH e portador de um alelo intermediário com 29 unidades CAG. Foi realizado o diagnóstico de exclusão para neuroacantocitose, alterações tireoidianas, anticorpos anti-cardiolipina, sedimentação eritrocitária e DRPLA. Além disso, o diagnóstico foi realizado com base na autópsia *post mortem* do cérebro e foi constatado atrofia cerebral, discreta gliose e perda neuronal de caudado e putamen. A doença de Wilson e SCA17 não foram excluídas. Porém ambos os estudos não mencionam ter sido realizada a checagem dos pacientes para a doença *Huntington-like*.

O tamanho das repetições trinucleotídicas CAG tem, de fato, um significativo impacto na idade de início da DH (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993, apud ZUCCATO; VALENZA; CATTANEO, 2010). A idade de início é definida como a ocasião quando os primeiros sintomas motores, neurológicos e psiquiátricos (descoordenação de movimentos finos, distúrbio de movimentos, emagrecimento, disartria, etc) são relatados, o que representa uma mudança permanente quando comparada ao estado normal. Conforme estudos existentes nesta área, o tamanho das expansões está relacionado, além da idade de início, com o grau de severidade do quadro clínico (ANDREW et al., 1993; GIL; REGO, 2008). Existem indícios de que a variabilidade da idade de início da DH também possa ser atribuída a fatores ambientais e genéticos conforme Wexler e colaboradores (2004), neste estudo realizado na Venezuela sugeriram que os resíduos da indústria do petróleo que poluem o Lago Maracaibo possam estar interferindo na idade de início e na variabilidade clínica. Além disso, um estudo que investigou genes modificadores da idade de início da doença, em um nível de 10 cM, mostrou forte associação com as regiões genômicas 4p16, 6p21-23 e 6p24-26 (LI et al., 2003).

Outro caso que pode sugerir a existência de outros fatores na variabilidade da idade de início, é o de dois gêmeos portadores de alelos em heterozigose com 22 e 62 cópias CAG que tiveram diferentes idades de início da DH, com 17 e 20 anos. Estes irmãos foram testados por meio de nove marcadores STR e possuem o mesmo DNA genotipado (RASKIN et al., 2000).

A DH possui herança autossômica dominante, cada filho de um afetado tem a probabilidade de 50% de herdar o gene mutado e portanto desenvolver a doença. Contudo, quando ambos os alelos são expandidos e estão em homozigose, embora muito raramente, estes são responsáveis pelo agravamento do quadro clínico quando comparado com portadores heterozigotos para um alelo normal e um expandido para DH. Os estudos nesta área sugerem que alelos expandidos em homozigose não antecipam o início da doença, apenas alteram a gravidade da sintomatologia e seus níveis de progressão (SQUITIERI et al., 2003).

Os alelos com penetrância reduzida (de 36 a 39 repetições) já foram associados, em alguns casos, com o fenótipo da DH, por meio de confirmação de características clínicas e patológicas documentadas.

Os alelos intermediários e expandidos são instáveis durante as meioses e mitoses, principalmente nos processos de formação dos gametas masculinos, cujo número de ciclos de divisão e duplicação do material genético é maior em relação à oogênese. Por isso, existe uma maior probabilidade de erro na replicação do DNA na espermatogênese, o que aumenta a possibilidade de risco de mutações dos alelos quando herdados do pai (WHEELER et al., 2007).

Além disso, outros estudos relatam que as expansões ou contrações possam ocorrer na fase pós-zigótica, depois que o embrião está formado, já que o embrião do sexo masculino possui uma maior tendência de variação em relação ao número de repetições CAG (expansões) e o embrião feminino uma maior tendência de apresentar contrações (WHEELER, et al., 2007).

A transmissão intergeracional dos alelos expandidos, segundo estudos realizados, pode cursar com um aumento de 1 a 4 repetições CAG ou com uma redução de 1 a 2 unidades (GIL; REGO, 2008).

Existem dois modelos de processos mutacionais que tentam explicar a variação do tamanho destas regiões polimórficas durante o processo de replicação do DNA, são eles: a recombinação desigual (*crossing over* desigual) e o mecanismo de *slippage* (deslizamento da DNA polimerase), conforme Figura 4.

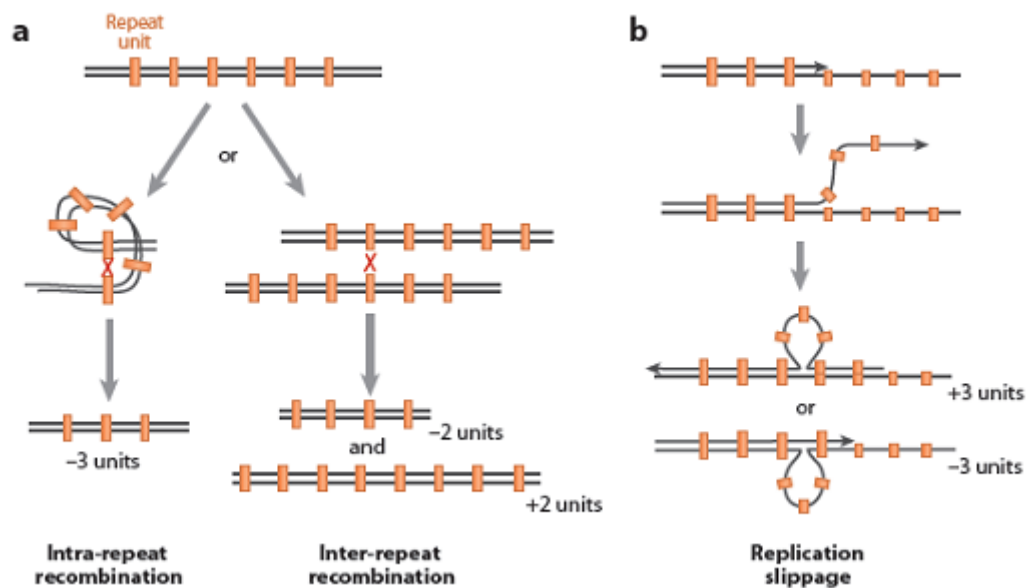


Figura 4: Modelos de mecanismos mutacionais que explicam a variação das unidades de repetição, durante a replicação do DNA. a) recombinação genética desigual e b) deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) (WEBER; WONG, 1993, apud GEMAYEL et al., 2010)

O deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase, durante o processo de replicação, é o principal fator causador da variação no número de repetições no gene *IT15*, localizado no cromossomo 4. Ocorre devido ao alinhamento errado da DNA polimerase para a formação de uma nova cadeia de DNA a partir da fita molde. Nesse processo pode surgir uma alça na fita molde do DNA ou na cadeia nova que está sendo sintetizada, e depois, quando ambas são desnaturadas para produzirem novas fitas de DNA complementares a elas, há reprodução deste erro de pareamento nas fitas que serão formadas a partir delas. Se a alça tiver sido formada na fita molde, ocorre uma contração da região de repetições trinucleotídicas, mas, caso a alça tenha sido formada na fita nova de DNA, tem-se uma expansão do tamanho das unidades de repetições (ELLES; MOUNTFORD, 2004).

No evento de recombinação, no qual a conversão genética e o *crossing over* estão envolvidos, também pode ocorrer variação do número de unidades de repetições trinucleotídicas. Por exemplo, quando ocorre a formação de um grampo durante a sinapse, o que significa que apenas uma parte, geralmente desigual em comprimento, de cada cromossomo será trocada, um cromossomo receberá um fragmento maior devido ao maior número de regiões repetitivas trocadas, e o outro cromossomo receberá um número menor. Porém, a recombinação não é o

mecanismo predominante na geração de variabilidade dos microssatélites (ELLES; MOUNTFORD, 2004; GEMAYEL et al., 2010).

A DH juvenil acomete indivíduos com menos de 20 anos e é causada pelo fenômeno de antecipação. Este fenômeno ocorre devido à presença de expansões maiores que 60 unidades CAG no gene *IT15* e é normalmente de herança paterna.

Devido aos fatores já mencionados, quando ocorre uma grande variação, em relação ao número de repetições CAG, em transmissões intergeracionais, os alelos expandidos normalmente são herdados do pai, em raros casos são herdados da mãe (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). Quando a DH juvenil é transmitida pela mãe, o quadro clínico é menos severo (ANDREW et al., 1993; WHEELER, et al., 2007).

Além das regiões compostas por unidades de repetições CAG no gene *IT15* foram identificadas outras regiões adjacentes com características polimórficas, como por exemplo, a região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CCG, e uma deleção em uma região polimórfica no códon 2642 entre as posições 2642 e 2645. Estas duas regiões mencionadas estão sendo utilizadas para investigar variações de suas frequências alélicas relacionadas a diferentes ancestralidades de uma população em relação às diferentes origens genéticas do gene anormal para DH (HEĆIMOVIĆ et al., 2002; MOROVVATI et al., 2008).

2.3.2.2 Regiões polimórficas de trinucleotídeos de repetição CAG e CCG

O perfil alélico da região polimórfica CAG responsável por causar a DH varia de acordo com a população estudada (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993) (Tabela 2).

Em um estudo sobre a DH realizado no Japão, que analisou as regiões polimórficas CAG e CCG em indivíduos afetados e normais, foi constatado que a primeira região estava relacionada com a idade de início e a variabilidade do quadro clínico da DH; enquanto a segunda região estava relacionada com a ancestralidade genética (TZAGOURNISSAKIS et al., 1995).

Tabela 2: Perfil alélico da região polimórfica CAG de populações diferentes

Origem étnica	Média dos alelos CAG normais	Menor alelo e Maior alelo que não causam a DH	Número de cromossomos DH	Média dos alelos CAG anormais para DH	Menor alelo e Maior alelo DH
Croácia	18,5 ± 3,5	9 - 34	37	45,1 ± 5	39 - 66
Japão	22	8 - 31	15	46	36 - 59
Turquia	18,2 ± 3,1 (mediana 18)	10 - 35	127	47,3 ± 6,8 (mediana 46)	38 - 78
Creta	19	15 - 25	35	-	36 - 42
Índia	16,8 ± 2,08	13 - 29	28	-	41 - 56
Ilha Formosa	17,75 ± 1,95	10 - 29	53	47,36 ± 9,98	38 - 109
Espanha	-	8 - 31	115	-	37 - 86
Brasil (RASKIN <i>et al.</i> , 2000)	18 (mediana 17)	14 - 30	44	46,7 (mediana 45)	39 - 88
Brasil (SILVA <i>et al.</i> , 2000)	22	18 - 26	32	50,6	43 - 73

Fontes: (RASKIN *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2000; PRAMANIKI *et al.*, 2000; HEĆIMOVIĆ *et al.*, 2002; AKBAS; ERGINEL-UNALTUNA, 2003; KARTSAKI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2004; GARCIA-PLANELLAS *et al.*, 2005; MOROVVATI *et al.*, 2008).

Um estudo realizado na ilha de Creta relacionou cada tamanho das unidades CAG com a mediana da idade de início dos indivíduos com DH estudados (TZAGOURNISSAKIS *et al.*, 1995), mostrando que quanto maior o tamanho da expansão CAG mais cedo a DH se manifesta (Tabela 3).

Tabela 3: Mediana e idade de início dos primeiros sintomas da DH na ilha de Creta

Tamanho do alelo CAG	Média da idade de início (em anos) N=886
39	66 (29 - 27)
40	59 (56 - 61)
41	54 (52 - 56)
42	49 (48 - 50)
43	44 (42 - 45)
44	42 (40 - 43)
45	37 (36 - 39)
46	36 (35 - 37)
47	33 (35 - 51)
48	32 (30 - 34)
49	28 (25 - 32)
50	27 (24 - 30)

Fonte: (TZAGOURNISSAKIS et al., 1995).

Os perfis alélicos de outras populações investigadas, em relação à DH, que não foram mencionadas anteriormente estão relatados na Tabela 4 para que se possa visualizar a variabilidade no perfil alélico entre populações distintas.

Tabela 4: Distribuição do número de repetições CAG em indivíduos com DH de acordo com a nacionalidade e grupo étnico

Nacionalidade e Grupo étnico	Número de indivíduos	Cromossomos DH Número de repetições CAG
--	--	média intervalo
Holanda	28	43 37 - 59
Inglaterra	118	44 38 - 63
França	45	44 36 - 100
Alemanha	46	44 40 - 65
Grã-Bratonha	74	44 39 - 121
Irlanda	43	42 39 - 52
Itália	52	44 39 - 54
Noruega	23	46 39 - 71
Rússia	22	41 37 - 47
Escócia	91	43 38 - 71
Suécia	103	43 38 - 88
Canadá	35	45 36 - 75

Fonte: (RASKIN et al., 2000).

A instabilidade somática ou mosaicismo das unidades de repetições CAG podem explicar o surgimento do fenótipo da DH em alelos com menos de 36 unidades CAG, mesmo que as repetições trinucleotídicas, causadoras da DH, já tenham sido descritas por alguns autores como não possuidores de instabilidade somática (TELENIUS et al., 1994, apud ANDRICH et al., 2008).

Diferentes tamanhos dos alelos CAG foram detectados, em um estudo realizado com doze indivíduos afetados pela DH, no qual os maiores níveis de mosaicismo foram identificados nas células do cérebro e do esperma. Por exemplo, em dois indivíduos o alelo expandido CAG variou de 8 a 13 unidades (TELENIUS et al., 1994).

Outro estudo que identificou a instabilidade genética nos espermatozoides das repetições CAG foi realizado na Venezuela com 112 indivíduos por Wheeler e colaboradores (2007). O estudo concluiu que quanto maior as unidades trinucleotídicas CAG, determinadas pelos linfócitos, maior é a instabilidade somática das células do esperma (Figura 5).

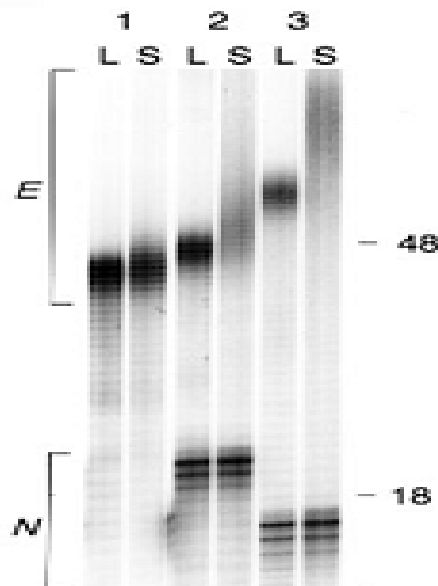


Figura 5: Autoradiograma de um gel mostrando os produtos da PCR de três indivíduos afetados pela DH. Onde estão demonstrados os alelos normais (N) e os expandidos (E) de diferentes amostras biológicas de cada indivíduo testado, como linfócitos (L) e células do esperma (S) (WHEELER, et al., 2007)

Entretanto, em um estudo realizado por Kono e colaboradores (1999) o mosaicismo ou instabilidade genética em relação ao número de unidades de trinucleotídeos CAG em diferentes regiões do cérebro dentre outros tecidos não foi detectada.

Os haplótipos variados, das regiões CCG, regiões adjacentes às CAG, identificados em populações diferentes, confirmam a existência de mutações que ocorreram de forma independente e distinta a partir de um ancestral comum, portador da mutação responsável por causar a DH (GARCIA-PLANELLAS et al., 2005).

Esta variabilidade tem sido investigada por meio da correlação entre a frequência dos alelos CCG em cromossomos normais e dos alelos CCG em cromossomos mutados para DH (SQUITIERI et al., 1994 apud PRAMANIK et al., 2000) em várias populações (Tabela 5). Na população com descendência da Europa Ocidental, que possuem alta prevalência da DH, a maior frequência dos alelos CCG encontrada são com 7 unidades CCG.

Tabela 5: Perfil alélico da região polimórfica CCG de diferentes populações

Origem étnica	Número de cromossomos DH	Maior frequência dos alelos CCG	Alelos CCG encontrados
Croácia	37	7	7 e 10
Japão	15	10	7 e 10
Espanha	79	7	7 e 10
Ilha Formosa	53	7	6 a 11
Índia	28	7	4, 7 e 10

Fontes: (PRAMANIKI et al., 2000; HEĆIMOVIĆ et al., 2002; WANG et al., 2004; GARCIA-PLANELLAS et al., 2005; MOROVVATI et al., 2008).

Vários estudos sugerem outras regiões polimórficas que podem interferir na variabilidade da idade de início da sintomatologia, como a região não codante do receptor de glutamato localizada no gene *GRIK2* (ZENG et al., 2006), como os genes *UCHL1*, (METZGER et al., 2006), os genes da apolipoproteína E2 e E3 (KEHOE et al., 1999) e o regulador transcricional CA150 (ARANGO et al., 2006; ZENG et al., 2006), dentre outros. Devido ao grande número de correlações com estas e outras regiões genéticas já identificadas em relação à variabilidade não só da idade de início, como do quadro clínico da DH, existem inúmeros estudos focados nesta área

visando relacionar as regiões polimórficas com aspectos clínicos e genéticos da DH (METZGER et al., 2006).

2.3.2.3 Fatores inter e intrageracionais dos alelos expandidos

Pesquisas realizadas em relação aos fatores intergeracionais dos alelos expandidos revelam que existe diferença significativa entre a transmissão paterna dos alelos e a transmissão materna (valor de $p < 0,0001$), assim como diferença na proporção entre ocorrência de contrações e de expansões quando os alelos CAG são transmitidos pelo pai ou pela mãe (Tabela 6). A idade dos pais quando o alelo expandido é transmitido não é um fator que influencia na alteração do tamanho dos alelos a prole (KOVTUN et al., 2004; WHEELER et al., 2007).

Tabela 6: Transmissão do alelo expandido CAG na população da Venezuela

	Total	Feminino	Masculino
Número de transmissões	495	311	184
Média das unidades CAG dos pais	44,4	44,7	43,9
Alelos alterados	364 (74%)	214 (69%)	150 (82%)
Contrações	137 (28%)	107 (34,5%)	30 (16%)
Expansões	227 (46%)	107 (34,5%)	120 (65%)
Média da variação das unidades CAG	+ 1,27	-0,04	+3,5
Variação das unidades CAG	-7 a +41	-5 a +10	-7 a +41

Fonte: (WHEELER et al., 2007).

Em 2004, foi descrito um caso no qual o pai, afetado com 54 repetições CAG, transmitiu ao filho uma expansão com 216 repetições, uma das maiores expansões intergeracionais relatadas (SENECA et al., 2004). E logo após, em 2005, foi relatado um caso de expansão intergeracional transmitida pela mãe, cuja expansão era de 70 unidades CAG e foi transmitida à filha uma expansão com 130 repetições, o que geralmente não ocorre (NAHHAS, et al., 2005).

E um estudo realizado no Brasil em 2000 por RASKIN *et al.* teve mais ocorrências de expansões quando a transmissão foi paterna. E as contrações ocorreram mais no alelo transmitido pela mãe. E em dois casos tanto a transmissão materna como a paterna foram estáveis, não houve variação do alelo expandido (Tabela 7).

Tabela 7: Transmissão do alelo expandido CAG na população brasileira

	Transmissão	
	Pai - filho (n=6)	Mãe - filho (n=4)
Contração	0	1
Estável	1	1
Expansão	5	2

Fonte: (RASKIN *et al.*, 2000).

Também foi investigada, na Venezuela, a instabilidade dos alelos CAG expandidos quanto ao sexo da prole, no qual as transmissões maternas e paternas foram detalhadas de acordo com o sexo dos filhos que receberam o alelo mutado (Tabela 8).

Tabela 8: Transmissão do alelo expandido CAG a prole do sexo feminino e masculino na população da Venezuela

	Materna		Paterna	
	filhas	filhos	filhas	filhos
Número de transmissões	147	164	96	88
Média das unidades CAG dos pais	44,8	44,5	44,3	43,6
Alelos alterados	99 (67%)	115 (70%)	79 (82%)	12 (14%)
Contrações	62 (42%)	45 (27%)	18 (19%)	59 (67%)
Expansões	37 (25%)	70 (43%)	61 (64%)	59 (67%)
Média da variação das unidades CAG	-0,4	+0,28	+3	+4
Variação das unidades CAG	-5 a +5	-5 a +10	-6 a +29	-7 a +41

Fonte: (WHEELER *et al.*, 2007).

2.3.3 Huntintina (HTT)

A huntintina, proteína codificada pelo gene *IT15*, é composta por mais de 3100 aminoácidos e possui massa molecular de aproximadamente 349 kDa, dependendo do número de resíduos de glutamina anexados na região NH₂-terminal.

A HTT é expressa em todo o corpo, nas células neuronais e nas não-neuronais, e não possui analogia estrutural com nenhuma outra proteína conhecida (DIFIGLIA et al., 1997; GIL; REGO, 2008). Entretanto, o suposto ganho de função tóxica atinge curiosamente apenas determinadas regiões neuronais, como o estriado e o córtex cerebral (GIL; REGO, 2008).

O estudo da função fisiológica da huntintina no cérebro adulto ajuda a compreender algumas das características da doença de Huntington que ainda aguardam explicação. Apesar de ser uma proteína de expressão ubiquitária, apenas o estriado e as camadas mais profundas do córtex são afetados durante a progressão da doença. A HTT normal é capaz de aumentar a sobrevivência celular (RIGAMONTI et al., 2000) e é responsável por promover a expressão do *brain derived neurotrophic factor (BDNF)*, uma neurotrofina extremamente importante para a sobrevivência dos neurônios do estriado (ZUCCATO et al., 2001).

Nas células dos mamíferos, a HTT está associada com uma variedade de estruturas celulares incluindo o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, componentes do citoesqueleto e a mitocôndria. Além disso, foi encontrada em sinapses neuronais, participando de mecanismos como endo- e exocitose dos terminais sinápticos e em vias metabólicas celulares diversas, nos quais a HTT está fortemente relacionada com várias estruturas vesiculares, endossômicas e microtubulares revestidas principalmente pelas proteínas clatrinadas (ZUCCATO; VALENZA; CATTANEO, 2010).

As principais funções intranucleares da huntintina selvagem (*wild-type*) são: tráfico de proteínas, transporte de vesículas, ancoragem do citoesqueleto, endocitose mediada por clatrinadas, sinalização pós-sináptica, regulação transcricional e funções anti-apoptóticas (GIL; REGO, 2008).

Conforme estudos recentes, foram identificadas 234 proteínas associadas com a HTT. A presença da cauda de poliglutamina expandida pode modificar ou inibir a função normal dessas proteínas que fazem interação com a HTT (GIL; REGO, 2008).

A deleção da HTT em estudos realizados em ratos conferiu letalidade embriológica nos animais, o que sugere seu relevante papel na formação e desenvolvimento do embrião (NASIR et al. 1995).

Como já mencionado, a HTT quando mutada ganha uma cauda de poliglutamina expandida, resultante de inserções de unidades de repetições CAG,

na região NH₂-terminal da molécula protéica além do limite normal no gene *IT15*. Na HTT normal esta cauda é composta por 6-35 glutaminas, porém nos indivíduos afetados pela DH quanto maior esta cauda mais cedo é a idade de início da doença (HAN et al., 2010).

As cadeias poliglutamínicas expandidas levam à fragmentação da proteína, que tende a auto agregar-se no interior da célula nervosa. A agregação de fragmentos protéicos causa a alteração no funcionamento neuronal e possivelmente tem papel no processo de morte neuronal (BARSOTTINI; FERRAZ, 2005).

Portanto, a presença de inclusões neuronais intranucleares (DIFIGLIA et al., 1997), que são agregados da HTT selvagem em neurônios do estriado e córtex cerebral, não são causadoras da neurodegeneração, e sim formas de proteção do próprio organismo contra a toxicidade da proteína mutada. Os agregados protéicos são características encontradas não só na DH, mas também, em outras doenças com expansões poliglutamínicas (SAPP et al., 1999). Até os dias atuais ainda não se sabe por completo porque as inclusões neuronais da HTT induzem a disfunção e morte celular. Sabe-se que, a HTT em condições normais protege as células neuronais do estriado de estímulos apoptóticos variados (GIL; REGO, 2008). Acredita-se que a adição da cauda de poliglutamina (poliQ) na HTT mutada determina um ganho de função tóxica, que afeta tanto células neuronais como não neuronais.

Existem investigações nesta área para esclarecer o porquê da proteína mutada atingir apenas algumas populações de células neuronais, se é por um fator seletivo ou por diferenciação celular. Entretanto, Han e colaboradores (2010) sugere que o efeito tóxico da HTT mutada não seja seletivo, por afetarem células neuronais de linhagens diferentes; e afirma que, ao contrário disso, alguns tipos celulares com características específicas podem se diferenciar, de modo que, possibilitem o aumento da vulnerabilidade pela HTT com a poliQ de toxicidade induzida, e por isso são afetadas.

A distribuição da huntintina, em relação à topografia e a imunorreatividade celular, foi observada em regiões do estriado em humanos, com menor imunorreatividade celular identificada no núcleo caudado e putamen.

2.3.4 Mecanismos de neurodegeneração

Durante o desenvolvimento da DH, a huntingtina mutada induz a disfunção intranuclear progressiva, o que acarreta a degeneração de importantes vias neuronais e perda de células do estriado. O principal traço da DH é a atrofia gradual do núcleo caudado e putamen. A presença de inclusões neuronais intranucleares e o agregado de proteínas em neurites distróficas são características observadas antes da perda de massa cerebral ou atrofia, além de, preceder também, o início dos sintomas. Os indivíduos com Huntington juvenil não apresentam, normalmente, as inclusões neuronais (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998).

Embora não sejam resultados de interferências diretas da HTT mutada, vários mecanismos como a excitotoxicidade, alterações metabólicas, disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, apoptose e autofagia são processos relacionados à neurodegeneração encontrada na DH (GIL; REGO, 2008).

O grupo neuronal mais afetado é composto pelos neurônios espinhais de porte médio, que correspondem a 95% do total dos neurônios que compõem o estriado. Acredita-se que essa população de neurônios quando lesionados provocam o descontrole de movimentos, traço característico na sintomatologia da doença de Huntington (JOEL, 2001).

Outra característica observada é a redução da quantidade de mitocôndrias presentes nas células neuronais afetadas pela DH, além de possuírem função e morfologia alteradas. Uma vez que, a mitocôndria é uma organela responsável pela produção de energia, as atividades e processos vitais sofrem o déficit bioenergético e estresse oxidativo. Esse fato também é observado em outros tecidos e células tais como músculos, linfoblastos e leucócitos (JIN; JOHNSON, 2010).

A HTT mutada serve de substrato para as caspases e calpaínas, proteínas cuja função é mediar a formação de fragmentos tóxicos N-terminais, por isso a atividade dessas enzimas encontra-se aumentada em indivíduos com DH. O seqüestro de pró-caspases nos agregados protéicos promove a ativação deste grupo de proteínas, o que desencadeia uma cascata intracelular de eventos proteolíticos. Diante dos fatores expostos, acredita-se que a perda de células neuronais do estriado ocorre, além de outros fatores, por contribuição de mecanismos apoptóticos (GIL; REGO, 2008).

O aumento de atividades endossômicas e lisossômicas é induzido pela presença da HTT alterada, além do sequestro da proteína quinase *Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*, com subsequente inibição da sua atividade quinase. As proteases lisossômicas, como as catepsinas, promovem o acúmulo dos fragmentos da HTT mutada e inibem a atividade quinase *mTOR* que, normalmente, induz a autofagia (RAVIKUMAR et al., 2004).

Recentemente, alguns estudos demonstraram que o hipotálamo também pode apresentar atrofia significativa em pacientes com DH (KASSUBEK; GAUS; LANDWEHRMEYER, 2004). Em geral, a atrofia cerebral, de forma generalizada, observada em casos severos da doença, faz com que a massa do cérebro sofra uma redução de aproximadamente 40% de seu volume (GUSELLA, 2010).

A perda neuronal observada no cerebelo é mais agravada no caso do Huntington juvenil (RUOCCO; BONILHA; LI, 2008).

O sistema mais utilizado para avaliar os diferentes graus de severidade em relação à degeneração do estriado foi desenvolvido por Vonsattel e Difiglia (1998). Esse sistema foi baseado em cinco casos da doença com diferentes graus de severidade das alterações do estriado *post mortem*. O grau zero é semelhante ao cérebro de um paciente que não tem a doença, em um exame menos detalhado. Entretanto mesmo no grau zero 30-40% dos achados histológicos apresentaram perda neuronal da cabeça do núcleo caudado. No grau um, a atrofia observada de núcleo caudado está presente na porção caudal e corpo. O grau dois está associado a uma maior atrofia do estriado em relação ao grau anterior. No grau três apresenta uma severa e brutal atrofia do estriado. E no quatro, há uma perda neuronal de mais de 95%, acompanhada da atrofia severa do estriado.

O grau de atrofia do estriado está correlacionado com a degeneração, não só dessa região, mas com outras estruturas cerebrais. Estas se encontram inalteradas ou com ligeiros traços de atrofia, enquanto nos graus três e quatro, o córtex cerebral, globo pálido, tálamo, núcleos subtalâmicos, substância negra e branca e o cerebelo estão perceptivelmente afetados (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998).

Existem outras razões pelas quais os movimentos coréicos podem surgir, como por exemplo, uso de medicamentos neurolépticos e vasculites, que não foram excluídos pelo estudo realizado por Kenney, Powell e Jankovic (2007).

Avanços nas técnicas de neuroimagem têm contribuído para um melhor entendimento da DH, têm estabelecido correlações importantes entre mudanças morfológicas do cérebro e o desenvolvimento de déficits cognitivos de atenção, memória e funções executivas, enquanto estudos funcionais demonstraram uma relação entre disfunções estriatais e performances cognitivas (MONTROYA et al., 2006).

2.3.5 Sinais e sintomas clínicos presentes na DH

Os indivíduos que possuem a proteína mutada a expressam em alguma etapa da vida (GIL; REGO, 2008). Os primeiros sintomas da doença são sutis: movimentos coréicos, involuntários descritos como indivíduo desajeitado, com incoordenação motora fina, movimentos incoordenados de membros superiores e inferiores, também conhecida como Coréia de Huntington (GIL; REGO, 2008). A progressão é lenta e o aparecimento de movimentos coréicos ocorre em 90% dos pacientes adultos (WILD; TABRIZI, 2007). Os movimentos involuntários dos músculos distais e proximais se tornam mais severos e o indivíduo perde, gradualmente, a capacidade de locomoção e, eventualmente, de comunicação (PENNEY et al., 1990). A bradicinesia e a rigidez são sintomas comuns em estágios mais avançados da doença de Huntington (SÁNCHEZ-PERNAUTE et al., 2000). O óbito do portador da DH, geralmente, ocorre devido a uma falha cardíaca ou uma pneumonia por aspiração (GIL; REGO, 2008).

A maioria dos pacientes apresenta distrofia muscular e emagrecimento, apesar da alta ingestão calórica (DJOUSSE et al., 2002). Algumas anormalidades endocrinológicas também são encontradas em pacientes com DH, como por exemplo, níveis elevados de corticosteróides (BJORKQVIST et al., 2006) e níveis inferiores ao normal de testosterona (MARKIANOS et al., 2005).

A epilepsia não é uma característica comum na DH adulta, são mais comuns na DRPLA e na SCA17/HDL4 (WILD; TABRIZI, 2007). A capacidade cognitiva é severamente afetada durante a evolução e a alteração dos processos intelectuais do indivíduo é o primeiro sintoma que aponta esse déficit. Essa alteração pode ocorrer décadas antes do aparecimento dos sintomas motores causados pela doença e podem piorar com o tempo até chegar à demência.

Existem também outros distúrbios como o de mudança de personalidade, irritabilidade, apatia, distúrbios sexuais e quadros depressivos que fazem parte dos traços psiquiátricos de alguns portadores (FOLSTEIN et al., 1983).

O Huntington juvenil, normalmente associado a uma expansão de trinucleotídeos CAG muito grande (>50 a 60 unidades), possui manifestações clínicas diferentes do Huntington em adultos e tem a progressão mais rápida. Manifesta-se principalmente por meio de ataxia, bradicinesia, rigidez, regressão psicomotora e distonia, enquanto na doença adulta, as características mais proeminentes são os movimentos involuntários, mudanças de personalidade e demência (NAHHAS et al., 2005). Os ataques epiléticos são características mais comuns na DH juvenil.

Os critérios adotados, em relação ao quadro clínico, para a indicação do diagnóstico molecular para a doença de Huntington são:

- a. histórico familiar da doença,
- b. distúrbios motores progressivos com coréia ou rigidez de causa desconhecida,
- c. distúrbios psiquiátricos com demência progressiva idiopáticos (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998 apud ZUCCATO; VALENZA; CATTANEO et al., 2010).

Os indivíduos que apresentam esses sintomas podem ser submetidos, por indicação médica, a testes genéticos a fim de se identificar a mutação responsável pela DH e confirmar o diagnóstico clínico (VONSATTEL, et al., 1985).

2.3.6 Tratamento atual e perspectivas sobre o tratamento

Apesar de muitos esforços por meio de estudos experimentais ainda não existe tratamento curativo ou preventivo para a doença de Huntington. Os sintomas relacionados a distúrbios comportamentais e depressivos podem ser tratados com antidepressivos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). (BONELLI; HOFMANN, 2007).

Transtornos psicóticos podem ser manejados com antipsicóticos tradicionais, como o haloperidol, porém tem se optado pelos novos antipsicóticos chamados de atípicos, como por exemplo, a risperidona. Os sintomas motores como a coréia são tradicionalmente tratados com bloqueadores dopaminérgicos, como haloperidol, clozapina, olanzapina, risperidona e quetiapina.

O ácido valpróico tem sido utilizado em indivíduos com irritabilidade e agressividade e no controle dos movimentos coreicos, é uma droga com efeitos colaterais menores quando comparados aos antipsicóticos. Atualmente, medicações como agentes antiglutamatérgicos e depletors dopaminérgicos têm sido utilizadas no controle dos sintomas motores com boa resposta (SAVANI; LOGIN, 2007).

Apesar do tratamento da disfunção cognitiva da DH ser insatisfatório, existem alguns estudos que testaram a rivastigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, que têm mostrado resultados preliminares satisfatórios no controle da progressão da disfunção cognitiva (TOMMASO et al., 2007). Porém, sua utilização ainda não é amplamente aceita.

Com a existência atual de estudos clínicos tentando utilizar drogas com teórico efeito neuroprotetor como o riluzole, a minociclina (tetraciclina com efeito inibidor das caspases) e a coenzima Q10 (efeito antioxidante e co-fator envolvido em mecanismos mitocondriais), aguardam-se resultados mais definitivos para indicação formal do uso de tais medicamentos.

Algumas técnicas cirúrgicas, como o transplante de células estriatai fetais em estudos preliminares, revelaram resultados promissores, inclusive com estudos de imagem funcional mostrando recuperação de atividade metabólica nos pacientes. Esses estudos são experimentais têm sido realizados em uma amostra de indivíduos muito pequena.

Abordagens terapêuticas atuais envolvendo células-tronco com capacidade de se transformarem em neurônios ou células gliais ainda são extremamente prematuras, portanto ainda não podem ser aplicadas em indivíduos afetados pela DH (KIM, 2007).

Em 2009, foi realizado um estudo com uma proteína chamada RHES, específica da região do estriado, cuja função é mediar a citotoxicidade da HTT quando mutada. A proteína RHES é capaz de induzir, quando ligada à HTT mutada, mecanismos de citotoxicidade e, devido a isso, diminuem a sobrevivência dos neurônios do estriado em 60% por meio de morte celular. Quando a proteína RHES (*Ras Homolog Enriched In Striatum*) está ligada à HTT normal, não há redução da sobrevivência celular. Portanto, drogas produzidas com o objetivo de bloquear a ligação entre a HTT mutada e a proteína RHES terão alto potencial terapêutico (SUBRAMANIAM et al., 2009).

3 OBJETIVO GERAL

Investigar em nível molecular as unidades trinucleotídicas CAG, em indivíduos brasileiros afetados e grupo de risco da DH, quanto ao seu número de repetições, sua contração ou expansão inter e intrageracional.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, por meio de *softwares*, 2 pares de *primers* utilizados em protocolos de diagnóstico da DH;

Ajustar e validar a técnica padrão de PCR e eletroforese capilar para a realização do diagnóstico molecular para DH;

Investigar repetições trinucleotídicas CCG adjacentes a região de expansão CAG;

Relacionar idade de início de sintomatologia da DH com o número de repetições CAG e CCG;

Relacionar a região polimórfica de trinucleotídeos CCG com a origem genética dos genes anormais para DH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo do tipo descritivo transversal.

Os indivíduos que participaram da pesquisa foram provenientes de atendimentos no ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle e de famílias cadastradas na Associação Brasil Huntington (ANEXO A) residentes no estado do Rio de Janeiro, além de indivíduos residentes na cidade de Ervália no Estado de Minas Gerais. Os indivíduos residentes em Ervália - MG já participavam de outro projeto sobre aspectos farmacológicos em relação à DH e ainda não tinham sido investigados em nível molecular. Os pacientes de Ervália foram atendidos em uma policlínica particular em Ervália - MG.

4.1.1 Critérios de inclusão/exclusão

Os critérios de inclusão foram: apresentar quadro clínico sugestivo da DH, com a indicação de um neurologista, e/ou fazer parte do grupo de risco da Doença de Huntington.

Todos os indivíduos que estavam de acordo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do presente estudo foram incluídos. Os indivíduos com nacionalidade estrangeira e os adotados pelas famílias estudadas foram excluídos.

4.1.2 Instrumentos utilizados para a coleta de dados

Os dados obtidos de indivíduos afetados e não afetados pela DH foram coletados por meio de um questionário (APÊNDICE A) baseado no questionário aplicado no ambulatório de genética do HUGG, o qual investigou os seguintes dados: sexo, idade atual do indivíduo e tempo de doença até 01/01/2011, idade de início das manifestações clínicas, número de indivíduos afetados na mesma família, transmissão materna ou paterna do alelo mutado da DH e a naturalidade.

Os heredogramas construídos de cada família foram organizados com auxílio do programa GenoPro versão 2007.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de material biológico

Foram coletados de 1-3 mL de sangue periférico para a análise molecular em tubos com o anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), com exceção de dois indivíduos que tiveram o material biológico coletado por meio de raspados da mucosa oral. O material biológico de células do raspado e sangue foram armazenados em geladeira a 4 °C até que a extração do DNA fosse realizada.

4.2.2 Extração de DNA

Foi utilizado o protocolo de extração de sangue total do kit *Blood Genomic Prep Spin*, GE Healthcare. As amostras de DNA já extraídos foram armazenadas em freezer a -8 °C.

Os extratos de DNA foram quantificados e tiveram seu grau de pureza analisados por espectrofotometria no espectrofotômetro (*NanoDrop® ND-1000*).

Cada indivíduo teve seu DNA extraído duas vezes a partir da amostra biológica coletada e, a extração foi realizada em dias diferentes por motivo de segurança.

4.2.3 Reações da PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O desenho dos *primers*, os protocolos de amplificação pela técnica de PCR e a análise de fragmentos polimórficos em eletroforese capilar foram criados conforme Barboza e colaboradores (2010) técnica desenvolvida pelo Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, coordenador do NUDIM (Núcleo de Diagnóstico e

Investigação Molecular, sede Hospital Escola Álvaro Alvim - Universidade Estadual do Norte Fluminense) da cidade de Campos dos Goytacazes, RJ.

As regiões genéticas, alvo da investigação deste estudo, localizadas no gene responsável pela DH (*IT15*) foram então delimitadas pelos *primers* denominados HD1-6FAM (senso), HD3 (antissenso) e HD4 (antissenso) (Tabela 9).

Tabela 9: Primers genéticos utilizados no protocolo de PCR do presente estudo

<i>Primers</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	Sentido
HD1-6FAM	6FAM - 5' TGGCGACCCTGGAAAAGCTGAT 3'	22 pb	senso
HD3	5' GCGGTGGCGGCTGTTGCTGCT 3'	21 pb	antissenso
HD4	5' CGGCGGCGGCTGAGGAAGCTG 3'	21 pb	antissenso

Neste trabalho alguns itens do protocolo utilizado no NUDIM foram alterados como relatado abaixo. As modificações da técnica foram realizadas com base nos protocolos citados no livro *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982). Os fatores alterados foram: a quantidade da Taq polimerase, a duração do ciclo de extensão da técnica de PCR, a concentração de DNA e a de MgCl₂ (no protocolo da *GoTaq*[®] *Green Master Mix 2X* o MgCl₂ já vem adicionado à enzima).

Para a escolha da Taq polimerase mais adequada foram testados dois tipos, fabricados por empresas diferentes, a *AmpliTaq*[®] *DNA Polymerase* (número do catálogo: N801-0055) da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA e a *GoTaq*[®] *Green Master Mix 2X* (número do catálogo: M7122) da Promega, Madison, WI. A *GoTaq*[®] *Green Master Mix 2X* foi a escolhida para ser utilizada por propiciar uma amplificação eficiente dos fragmentos alvos (Figura 6).

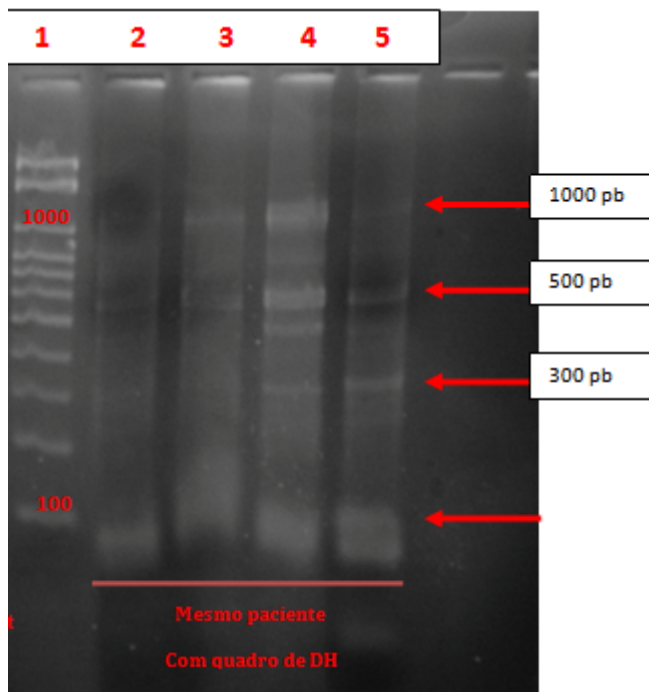


Figura 6: Fotografia de um gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. No *slot* de número um do gel foi aplicada a escala alélica, no *slot* dois, três e cinco foram aplicados os amplicons das reações de PCR com a *AmpliTaq*[®] *DNA Polymerase*, nas quais foram variadas as concentrações de DNA: entre 50, 100 e 200 ng, respectivamente, para 12,5 μ L de volume total. No *slot* quatro foram aplicados amplicons nas mesmas condições da reação do *slot* cinco, exceto a enzima utilizada que foi a *GoTaq*[®] *Green Master Mix*

O tempo do ciclo de extensão da reação de PCR foi aumentado de dez para cinquenta minutos para que os produtos de amplificação com tamanhos maiores pudessem ser estendidos e sintetizados completamente. Com isso, os picos resultantes nos eletroferogramas, observados entre os picos de bandas *stutters* e os picos principais, se apresentaram mais evidentes facilitando a definição e seleção dos picos principais.

A reação de PCR foi testada com concentrações diferentes de DNA (1, 10, 50 e 100 ng / 12,5 μ L de mistura reacional). As misturas reacionais que propiciaram de forma eficiente produtos amplificados (amplicons) continham de 10 a 100 ng de DNA quando identificados por análise de fragmentos por meio de eletroforese no analisador genético modelo ABI 3500 da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Entretanto, quando a reação de PCR tinha 100 ng as alturas dos picos eram maiores, gerando picos mais evidentes (Figuras 7 e 8).

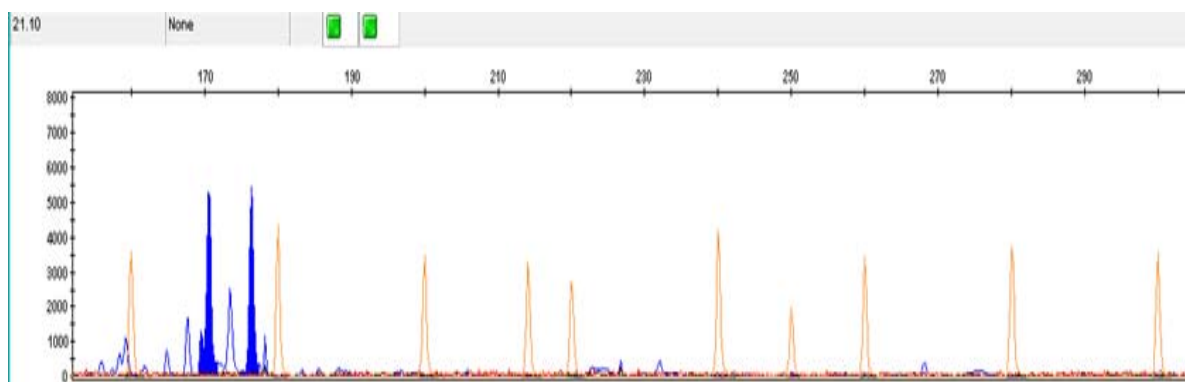


Figura 7: Eletroferograma resultante de uma análise de fragmentos polimórficos das reações de PCR com 10 ng de DNA da amostra de número 001. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais; picos azuis vazios: *stutters* e picos cor laranja: escala alélica padrão (G5 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

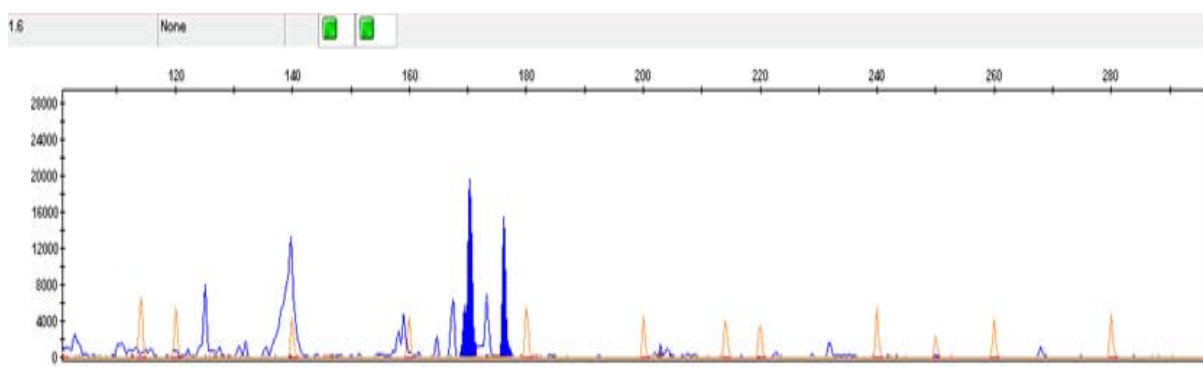


Figura 8: Eletroferograma resultante de uma análise de fragmentos polimórficos das reações de PCR com 100 ng de DNA da amostra de número 001. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais; picos azuis vazios: *stutters* e picos cor laranja: escala alélica padrão (G5 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

As condições da reação de PCR escolhidas como as mais ideais para o processamento da amostra foram: 10 pmoles de cada *primer*, 50 a 100 ng de DNA e 6,25 μL de *GoTaq[®] Green Master Mix* da Promega (1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP) e água DNase *free* q.s.p. para um volume final de 12,5 microlitros.

Foram realizados dois tipos de reações de PCR, uma para cada região polimórfica alvo do gene *IT15* (4p16.3) (Figura 9), sendo que as duas regiões foram delimitadas pelo mesmo *primer* senso, o HD1-6FAM, com fluoróforo acoplado na região 5'-terminal. Os *primers* antissenso denominados HD3 e HD4 delimitavam, respectivamente, as regiões polimórficas de trinucleotídeos CAG e CAG + CCG, sendo a região polimórfica CAG diretamente relacionada com a DH (Figura 10).

Os dois tipos de reação de PCR são úteis para identificar os alelos das duas regiões genéticas polimórficas, a que contém unidades repetidas de trinucleotídeos CAG de número variável, utilizada para o diagnóstico de DH, e a que contém unidades repetidas de trinucleotídeos CCG que é útil na determinação da ancestralidade genética do gene mutado. Além disso, a análise da região polimórfica CCG auxilia de forma indireta na confirmação do tamanho dos alelos da região CAG.

```

CCGCCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGA
GTCCCTCAAGTCCTTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
CAACAGCCGCCA CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCCTC
AGCTTCCTCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC
TCAGCCGCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC
GGCCCGGCTGTGGCTGAGGAGCCGCTGCACCGACCA

```

Figura 9: Representação das duas regiões polimórficas analisadas, localizadas na região inicial do primeiro exon do gene *IT15*. Em azul encontra-se a região polimórfica de interesse deste estudo com repetições de trinucleotídeos CAG e em amarelo encontra-se a região de repetição da trinca CCG

```

CCGCCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAA
GGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAACAG
CCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCC
TCAGCTTCCTCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC
CGCTGCTGCCTCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC
CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC
TGAGGAGCCGCTGCACCGACCA

```

Figura 10: Localização da região de hibridação dos *primers* no primeiro exon do gene *IT15*. Em amarelo a região do *primer* HD1-6FAM com fluoróforo, em azul a do HD3 e em vermelho a do HD4

Portanto, a primeira reação de PCR, com o par de *primers* HD1-6FAM/HD3, propiciou a identificação do tamanho da região com repetições de trinucleotídeos CAG, e a segunda reação, com o par de *primers* HD1-6FAM/HD4 propiciou a

determinação do tamanho das unidades CAG e também das unidades de repetições da região polimórfica CCG.

Os ciclos de temperatura para a PCR utilizados foram:

- a) Desnaturação - 94 °C por 5 minutos
 94 C por 1 minuto
 b) Hibridação - 59,1 °C por 1 minuto
 72 °C por 2 minutos } 35 ciclos
 c) Extensão - 72 °C por 50 minutos

Um estudo realizado por Williams e colaboradores (1999), em relação aos ciclos de amplificação da PCR, analisou a região polimórfica CAG de nove diferentes indivíduos afetados pela DH, variando os números dos ciclos entre 20, 25, 30, 35, 40 e 45. E foi observado que quanto maior o número de ciclos, mais alto fica o pico no eletroferograma (Figura 11).

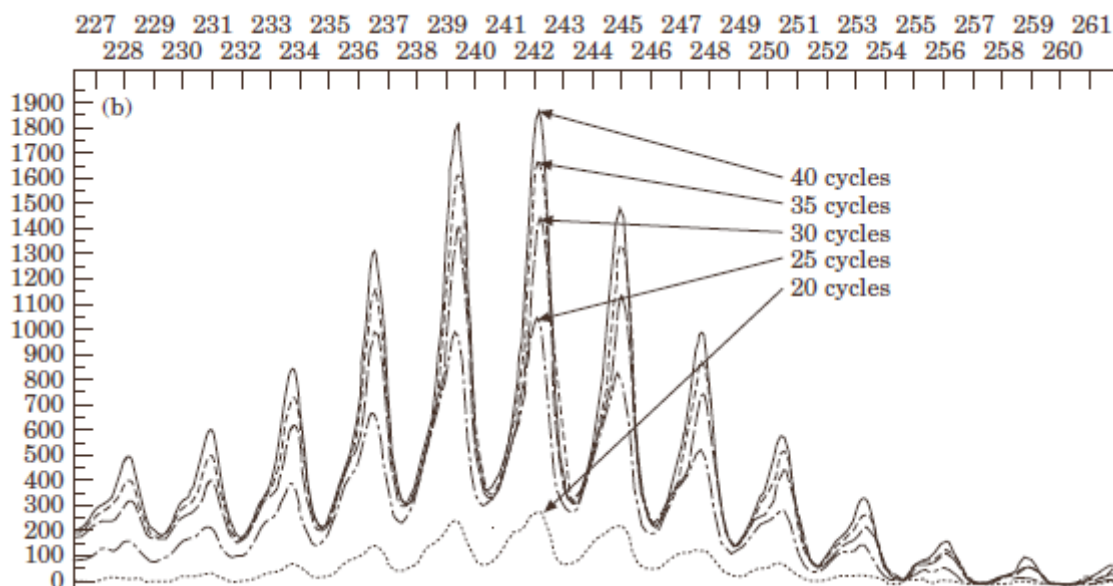


Figura 11: Análise da região polimórfica CAG de um indivíduo afetado pela DH, variando os número dos ciclos de amplificação da PCR entre 20, 25, 30, 35, 40 e 45 (WILLIAMS *et al.* 1999)

Cada amostra de um determinado indivíduo foi analisada três vezes, em dias diferentes por medida de segurança.

4.2.4 Detecção do produto de amplificação

Inicialmente, os produtos de amplificação gerados foram detectados e analisados por eletroforese em gel de agarose 3% seguida de visualização dos fragmentos, corados com brometo de etídio, através da exposição à luz ultravioleta (WARNER; BARRON; BROCK, 1993), para avaliar a presença da amplificação de fragmentos, até que as condições da PCR estivessem completamente ajustadas.

O gel de agarose foi utilizado para detectar a presença de amplicons nas primeiras reações de PCR. Após os ajustes realizados, os amplicons foram submetidos à eletroforese no analisador genético de modelo ABI 3500 da *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA, para a mensuração do tamanho dos fragmentos polimórficos.

A detecção do produto de amplificação foi preparada conforme o NUDIM, para cada uma das amostras foi realizada uma mistura com: 1 µL de amplicons, 8,8 µL de formamida deionizada (Hi-Di Formamida) e 0,2 µL da escala alélica G5 LIZ (*Multi-Capillary DS-33 Matrix Std Kit*) da *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA., com fragmentos de 100 a 600 pb para um volume final de 10 µL.

Após desnaturação (94°C por 5 minutos) e rápido resfriamento em gelo (3 minutos), as amostras foram injetadas no analisador genético com arranjo de oito capilares contendo *Performance Optimized Polymer 3500 series* (POP-7 *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Os dados foram capturados no *Software ABI Data Collection*.

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS

A própria autora aplicou o questionário em entrevista com os pacientes em acompanhamento ao serviço do ambulatório de genética do HUGG (UNIRIO). Os dados do questionário foram revistos manualmente, e a seguir, inseridos numa planilha informatizada tipo Excel®. Foram inseridos na planilha também, dados gerados a partir das investigações moleculares dos indivíduos objetos de estudo, como o tamanho dos fragmentos gerados pela PCR e o número de repetições de trinucleotídeos CAG e CCG de cada um.

O arquivo foi exportado para a leitura no programa SPSS versão 14.0 para a análise estatística.

4.3.1 Análise e seleção dos fragmentos polimórficos gerados pela PCR

A determinação do número de repetições de trinucleotídeos CAG e CCG em cada alelo foi definida por meio da conversão das bandas de amplicons em picos, correspondentes ao tamanho dos fragmentos medidos em pb. Tais bandas foram detectadas pela eletroforese capilar no analisador genético. Os produtos de amplificação para os alelos dos *loci* de cada indivíduo foram analisados no programa *GeneMapper SW V4.1* do analisador genético ABI 3500 da *Applied Biosystems* e os picos foram selecionados manualmente de acordo com alguns critérios:

- O pico principal é normalmente acompanhado de um, dois ou três picos denominados bandas *stutters*;
- A diferença de tamanho, entre os picos de bandas *stutters* e os picos principais observados, é de 3 pb devido ao escorregamento (*slippage*) da Taq polimerase na região com repetições *in tandem* de trinucleotídeos ao replicar a fita de DNA;
- Alguns fragmentos inespecíficos amplificados foram excluídos, com exceção daqueles que apresentaram bandas *stutters* antes do pico principal;
- Quando o eletroferograma apresentava um perfil alélico de cinco ou mais picos com intervalos de 3 em 3 pb, o pico de maior altura foi selecionado;
- As amostras que produziram picos com alturas inferiores a 1000 unidades de fluorescência (UF) (eixo Y dos eletroferogramas) foram reanalisadas utilizando-se outras amostras extraídas do mesmo indivíduo.

O tamanho do alelo amplificado por PCR foi determinado por meio de comparação com a escala presente no eixo X do eletroferograma. Foram usados como padrão de número de pares de base os fragmentos contidos na escala alélica G5 LIZ.

4.3.2 Cálculo das regiões CAG e CCG

Para cada alelo, o tamanho em pb, de acordo com os eletroferogramas, incluía a repetição polimórfica CAG mais uma região residual composta pela região de hibridação dos *primers* e regiões não polimórficas do gene *IT15*. O número de repetições CAG foi determinado por meio da subtração do tamanho total do fragmento em pb, fornecido pelo aparelho, menos a região não variável. O resultado da subtração foi dividido por três, pelo fato da unidade de repetição ser formada por três nucleotídeos. Cada alelo representa o número de repetições CAG ou CCG. O cálculo para a obtenção do número das repetições CAG foi definido como exemplificado na Tabela 10.

Tabela 10: Exemplificação do cálculo realizado para determinar o número de repetições de trinucleotídeos CAG de cada amplicon. Fórmula: $(A)-[(B)+(C)]/3=$ Número de repetições CAG

Tamanho (pb) total do amplicon detectado (A)	Tamanho (pb) da região de hibridação dos <i>primers</i> (B)	Tamanho(pb) da região não polimórfica (C)	Resultado (pb) dividido por 3	Número de repetições CAG
200,61	38	28	134,61/3	44,87

O cálculo para a obtenção do número das repetições CCG foi feito como exemplificado na Tabela 11.

Tabela 11: Demonstração do cálculo realizado para determinar o número de repetições de trinucleotídeos CCG de cada indivíduo. Fórmula: $(E)-[(F)+(G)] /3=$ Número de repetições CCG

Tamanho (pb) total do amplicon detectado (E)	Tamanho (pb) da região polimórfica CAG incluído <i>primer</i> senso (F)	Tamanho (pb) do <i>primer</i> antissenso (G)	Resultado (pb) dividido por 3	Número de CAG
243,56	200,56	23	20/3	6,7

4.3.3 Classificação dos indivíduos investigados em relação ao tamanho dos alelos CAG

A classificação dos indivíduos em afetados ou normais para DH foi baseada nos conceitos determinados pela *American College of Medical Genetics*, *American Society of Human Genetics* e pelo *Huntington Disease Genetic Testing Working Group*.

Indivíduos com até 26 unidades de repetições de trinucleotídeos CAG foram considerados normais para o fenótipo DH, acima de 26 cópias CAG os indivíduos foram considerados portadores de alelos mutáveis (de 27 a 35 unidades) e acima de 35 repetições CAG, afetados, classificados em dois grupos: com penetrância reduzida (36 a 39 repetições) e com penetrância completa (>39 repetições).

4.3.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados inclui análise univariada (médias, percentis, e proporções, com o respectivo desvio padrão). Gráficos e tabelas foram utilizados visando dar maior visibilidade aos resultados. Os dados foram analisados com apoio do pacote estatístico SPSS versão 14.0.

Para o cálculo da taxa de prevalência foi utilizada a população disponibilizada pelo IBGE.

Para análise da correlação dos dados foram empregados os testes de correlação de Pearson. A significância estatística foi medida pelos testes do qui quadrado de Pearson, teste exato de Fisher e Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de p menores que 0,05.

4.4 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

As primeiras 12 amostras coletadas foram reanalisadas, para um controle de qualidade, em outros laboratórios, dentre eles laboratório H. Pardini (Belo Horizonte), laboratório do Hospital Álvaro-Alvim da UENF/NUDIM (Campos dos Goytacazes) e laboratório da USP-Ribeirão Preto (Departamento de Neurociências).

Como exemplos foram apresentados dois eletroferogramas (Figuras 12 e 13) que são resultados de uma mesma amostra analisada com equipamentos diferentes em outros laboratórios.

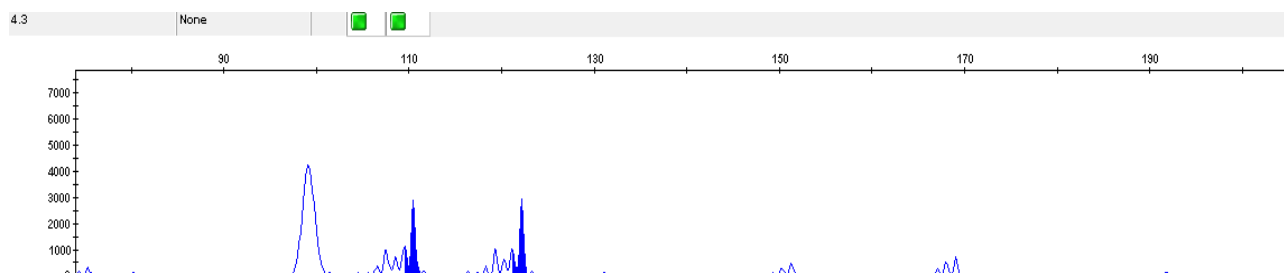


Figura 12: Eletroferograma da amostra de número 004 analisada com os *primers* HD1-6FAM/HD3 na UNIRIO. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais. Primeiro pico vazio: artefato correspondente ao *primer*

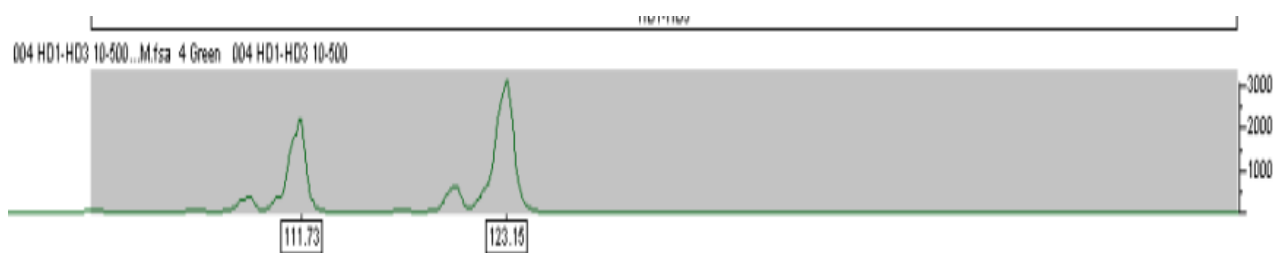


Figura 13: Eletroferograma da amostra de número 004 analisada com os *primers* HD1-6FAM/HD3 no NUDIM

Além disso, para todas as reações de PCR realizadas na UNIRIO foram feitas reações de controle negativo compostas por água ultra pura *DNase Free*, para se verificar a presença de algum tipo de contaminação. Todos esses controles negativos realizados conjuntamente com cada lote de amostras processadas não mostraram qualquer produto de amplificação, com exceção dos ruídos menores que 100 pb representados pelos *primers* (Figura 14).

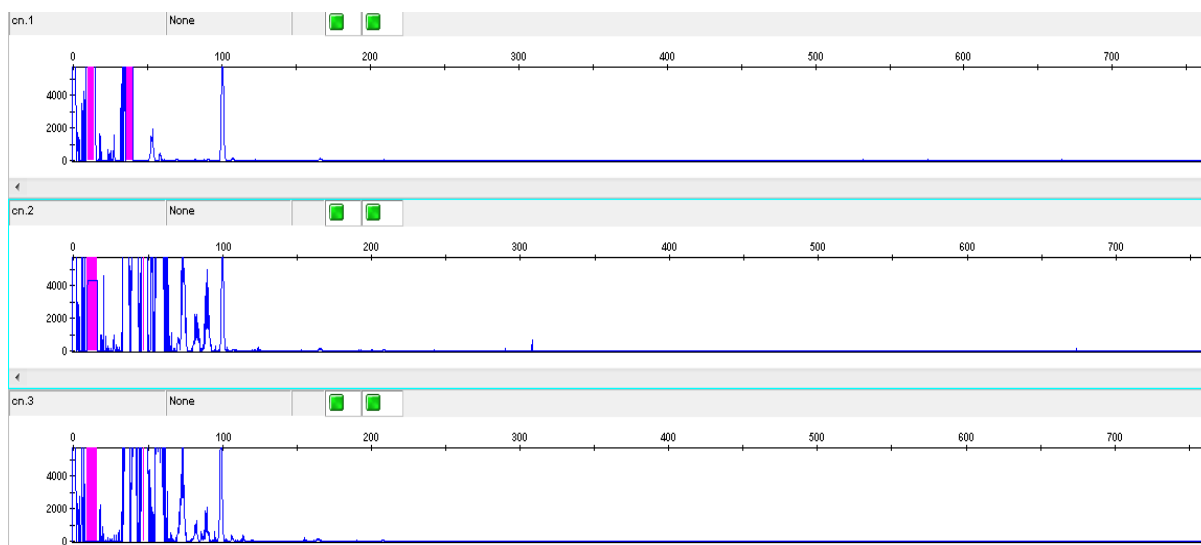


Figura 14: Eletroferogramas das reações de controle negativos sem DNA, cada reação representa um lote de reações de PCR realizadas em cada dia de experimento

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os objetos de estudo foram totalmente esclarecidos sobre a pesquisa realizada e todos assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

A presente investigação teve a participação de uma equipe multidisciplinar composta por biomédicos (inclusive a autora), biólogos e médico-geneticista.

O presente estudo teve como preocupação fundamental, proporcionar uma assistência psicológica aos indivíduos afetados e principalmente aos seus cuidadores e familiares, ligando-os a outra equipe de saúde que pudesse oferecer um suporte psicológico aos objetos de pesquisa.

O projeto já foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG - UNIRIO) conforme ANEXO B. O projeto relacionado aos aspectos farmacológicos para a terapia da DH, cujos indivíduos residentes de Ervália - MG foram analisados no presente estudo, também já possui aprovação pelo comitê de ética em seres humanos (ANEXO C).

O estudo foi elaborado segundo padrões vigentes de ética em pesquisa com seres humanos, conforme a resolução 196/96 da Convenção de Helsinki. Não causa ônus aos pacientes, exceto o desconforto da coleta de sangue periférico e inconveniente de possíveis repetições deste procedimento, assim como a locomoção. Os resultados de análise genética para um único indivíduo têm

repercussão imediata para seus familiares, por isso foi necessária a presença de um profissional da psicologia para apoio ao paciente e aos familiares.

Com o intuito de minimizar os problemas de revelação das informações, a Declaração sobre Aspectos Éticos da Genética Médica, da Organização Mundial da Saúde (OMS), sugere que a família também seja considerada como paciente. No caso de crianças ou indivíduos sem capacidade para consentir, quem melhor representa o interesse do paciente será o responsável por ele, porém, deverão ser realizados esclarecimentos prévios para isso e o menor de idade deverá apresentar o quadro clínico compatível com DH (Huntington juvenil).

A testagem de crianças motivadas apenas pela redução do estresse paterno não foi realizada.

A entrega do resultado está sendo realizada no ambulatório de genética do HUGG por uma equipe multidisciplinar e após a entrega é feito o aconselhamento genético e o acompanhamento com psicólogo. Além de reuniões marcadas com profissionais multidisciplinares, com os afetados, com os indivíduos pertencentes ao grupo de risco da DH e seus cuidadores.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Foram estudados 65 indivíduos que aceitaram participar da pesquisa (APÊNDICE D). Dentre eles, 46 foram provenientes de atendimentos no ambulatório de genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle e de famílias cadastradas na Associação Brasil Huntington residentes no Estado do Rio de Janeiro, além de 29 indivíduos residentes na cidade de Ervália - MG.

Quatro indivíduos foram excluídos da análise estatística, porque, embora as manifestações clínicas fossem compatíveis com a doença, os testes moleculares, assim como o histórico familiar, foram negativos e, portanto, o diagnóstico de DH não se confirmou. O paciente cuja amostra era de número 013 foi excluído por desistir de participar da pesquisa.

O presente estudo segue com 61 (amostras de número 001 a 066) indivíduos com histórico familiar de DH, afetados ou pertencentes ao grupo de risco da doença, que foram testados em nível molecular. Dentre eles, 13 (21,31%) tiveram resultado negativo para a DH e 48 (78,60%) indivíduos apresentaram alelos anormais dentre mutáveis e expandidos relacionados à DH no *locus* 4p16.3.

Um determinado indivíduo portador de dois alelos anormais para DH, um com penetrância completa com 48 cópias CAG e o outro com 27 cópias (alelo intermediário), não foi analisado junto com os demais por destoar dos casos selecionados. Dos 47 indivíduos analisados estatisticamente, portadores de alelos mutáveis e/ou expandidos (27 a >40 cópias CAG), 22 são do sexo masculino e 25 do feminino (Tabela 12).

A transmissão paterna dos alelos expandidos ou intermediários ocorreu em 55,3% dos casos de indivíduos portadores de alelos anormais para DH, e a transmissão materna em 44,7%.

A idade de início das manifestações clínicas variou de 18 a 56 anos, com valor médio de $41,7 \pm 10,1$ e mediana de 43. Em apenas 10, dos 47 pacientes, a doença ainda não tinha se manifestado. Em 55,3% da amostra (n=47) a idade de início foi de até 49 anos de vida. Foi identificado um caso de Huntington juvenil, no qual o indivíduo com 49 repetições CAG manifestou a DH com 18 anos.

A idade dos pacientes variou de 10 a 76 anos até dia 01/01/2011 com valor médio de $46,7 \pm 15,9$. Em 50% dos casos os indivíduos estudados possuíam mais de 48 anos.

Os 37 indivíduos afetados possuíam um tempo de doença que variou de 1 a 28 anos, com valor médio de $10,1 \pm 6,6$. Em 75% dos casos os indivíduos afetados possuíam tempo de doença de 14,5 anos ou mais.

O número de casos de DH relatados na família de portadores de alelos mutáveis e/ou expandidos ($n=47$) variou de 2 a 16 casos, com um valor médio de $8,72 \pm 5,0$. Dentre estes indivíduos todos possuíam histórico familiar da DH. E 50% destes indivíduos tinham oito ou mais casos de DH relatados na família.

Com relação à naturalidade, 48,9% eram do Estado do Rio de Janeiro, 34% de Minas Gerais, 14,9% do Espírito Santo e 2,1% do Estado de São Paulo. Os 16 casos investigados de Minas Gerais, nasceram na cidade de Ervália-MG (17.958 habitantes em 2010), portanto, se a prevalência em caucasianos é de 0,5-0,7/10.000 indivíduos (HORMOZIAN et al., 2004; GIL e REGO, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011), com base nisso e em dados populacionais do IBGE, foi calculada a prevalência mínima para a cidade de Ervália, com valor de 8,9/10.000 indivíduos.

Tabela 12: Descrição das variáveis avaliadas na amostra estudada

Variável	Número	%
Sexo		
Feminino	25	53,2
Masculino	22	46,8
Transmissão do alelo mutado para DH		
Materna	21	44,7
Paterna	26	55,3
Doença manifesta		
não	10	21,3
sim	37	78,7
Idade de início		
Até 22 anos	3	6,4
23-30	2	4,2
31-40	11	23,4
41-49	10	21,3
50-56	11	23,4
sem idade de início	10	21,3

Variável	Número	%
Naturalidade (estado de nascimento)		
RJ	23	48,9
MG	16	34
ES	7	14,9
SP	1	2,1
Idade atual (até 01/01/2011)		
10-16	3	6,4
17-32	6	12,7
33-48	15	32
49-64	18	38,3
65-76	5	10,6
Tempo de doença		
1-8	20	54,1
9-19	12	32,4
20-28	5	13,5
Total de casos de DH na família		
2-4	16	34
5-9	9	32
10-16	16	34

5.1.1 Heredogramas

O presente estudo relatou 574 indivíduos entre afetados e grupo de risco da DH por meio dos heredogramas familiares construídos com auxílio dos participantes da pesquisa entrevistados.

No total, 23 heredogramas (APÊNDICE B) foram construídos incluindo os 61 indivíduos testados em nível molecular para DH. Oito heredogramas tinham pelo menos dois indivíduos testados pelo presente estudo, como por exemplo, o de número 15 (Figura 15).

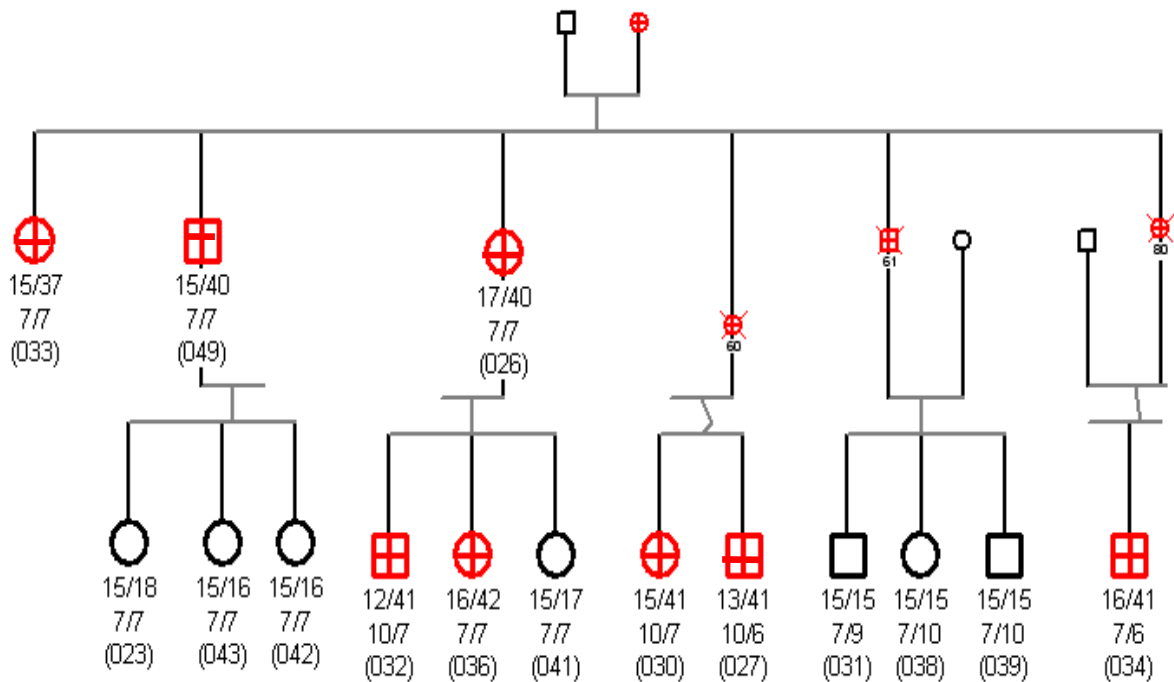


Figura 15: Heredograma de número 15, parcial, mostrando somente os indivíduos testados em nível molecular, pelo presente estudo, com oito indivíduos afetados para DH. Abaixo de cada símbolo no heredograma aparecem os valores das repetições CAG e, logo embaixo destes, os dois alelos da região CCG. Entre parênteses está o número de identificação correspondente a cada objeto de pesquisa. Legenda: ⊕- Afetado do sexo feminino; ⊞- Afetado do sexo masculino

Dos 574 indivíduos relatados, 377 (65,67%) fazem parte do grupo de risco, ou seja, são filhos de afetados pela Doença de Huntington e têm a probabilidade em 50% de serem portadores do gene mutado e de desenvolverem a doença (Gráfico 1).

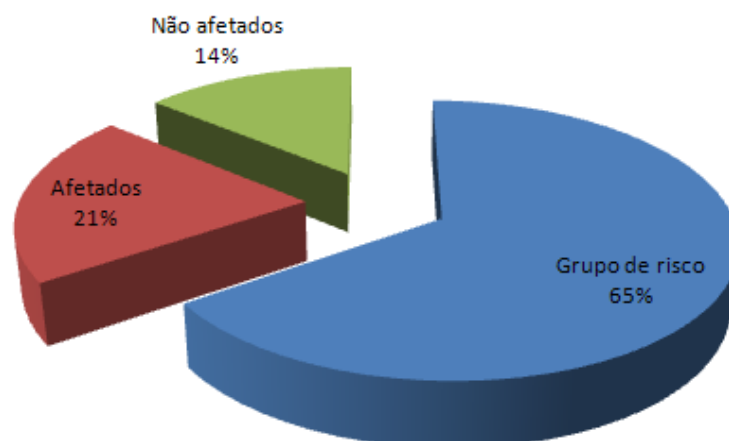


Gráfico 1: Frequência dos indivíduos apresentados nos heredogramas

5.1.2 Expansão ou contração inter e intrageracional dos alelos anormais para DH

Dentre os 23 heredogramas construídos, 15 apresentaram apenas um indivíduo investigado molecularmente pelo presente estudo e, oito, pelo menos dois indivíduos testados. Portanto, apenas estes oito heredogramas propiciaram a investigação em relação à variabilidade do número de repetições CAG nos alelos anormais expandidos intra e intergeracionalmente.

Os heredogramas abaixo (Figuras 21-28) foram parcialmente apresentados, de forma a exibir apenas a parte da família que foi testada pelo presente estudo, os heredogramas completos se encontram no APÊNDICE B. Os indivíduos testados, nestas figuras, aparecem com o símbolo do heredograma maior que os demais não testados. Os indivíduos afetados se encontram em vermelho. Os falecidos estão marcados com um X vermelho em cima do símbolo do heredograma.

No heredograma de número 001 (Figura 16), foram testados 2 irmãos que fazem parte do grupo de risco da DH, cujo pai era doente. Após os testes moleculares, descobriu-se que o filho homem (amostra 020) tinha o alelo expandido para DH e a filha (amostra 001) não. Ambos apresentam sete repetições, em homozigose, na região polimórfica CCG.

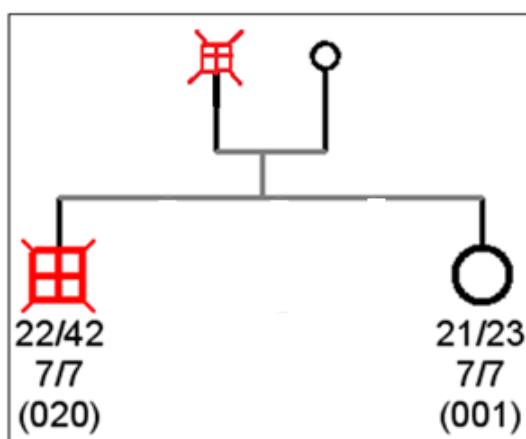


Figura 16: Heredograma 001 apenas com a parte de indivíduos testados (símbolo do heredograma ampliado) para DH

No heredograma 005 (Figura 17) foram testados dois indivíduos, uma mãe afetada (amostra 066) e uma filha pertencente ao grupo de risco (amostra 006). O

alelo da região polimórfica CAG, recebido pela filha da afetada, foi o alelo normal com 15 unidades CAG e 7 unidades CCG.

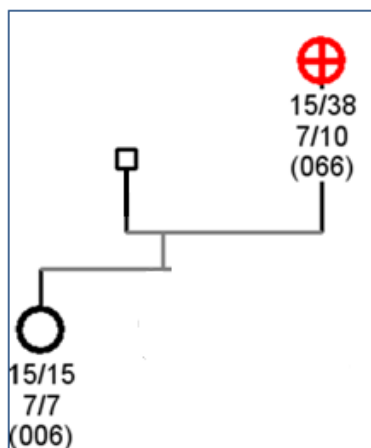


Figura 17: Heredograma 005 com indivíduos testados

O heredograma 008 apresenta quatro indivíduos testados para DH (Figura 18), dentre eles três irmãs (amostras 009, 012 e 052), cuja mãe foi relatada afetada pela DH, e uma filha (017) de uma das três irmãs. Após investigação molecular, foram encontrados alelos expandidos CAG nas três irmãs e na filha (017) não.

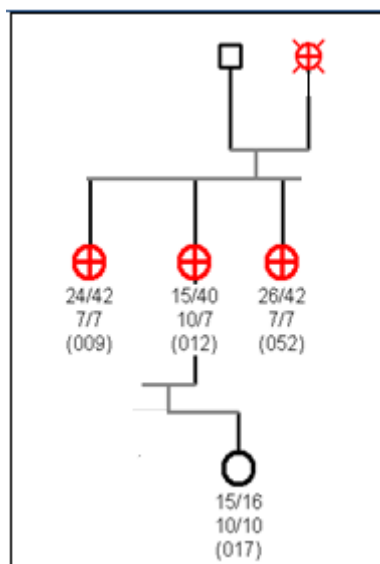


Figura 18: Heredograma 008 com quatro indivíduos testados, três afetados e um não afetado

O heredograma 011 mostra três indivíduos testados (Figura 19), que são três irmãs (amostras 014, 015 e 018), cujo histórico familiar da DH foi relatado. A possível transmissão do alelo expandido ocorreu por parte do pai, já que este faleceu com os sintomas de DH aos 60 anos, e a mãe era negativa para a testagem molecular da doença. Após realização dos testes para DH, descobriu-se que três irmãs herdaram alelos expandidos, duas com 43 cópias CAG e a outra com 41 cópias.

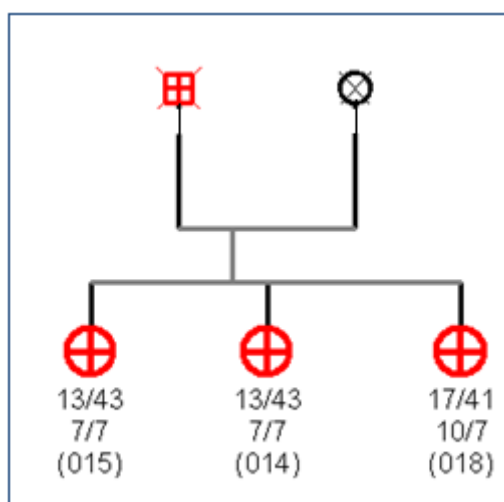


Figura 19: Heredograma 011 com três irmãs afetadas, testadas

No heredograma 015 foram investigados, em nível molecular para DH, 15 indivíduos (Figura 20). Dentre eles, oito são portadores de alelos expandidos (amostras 026, 027, 030, 032, 033, 034, 036 e 049). Os alelos expandidos dos três irmãos afetados (amostras 026, 033 e 049), com herança materna do alelo expandido, variaram em relação as unidades CAG, e a região polimórfica CCG se manteve constante com 7 unidades. O indivíduo de número 049 não transmitiu o alelo expandido a nenhum de seus três filhos testados (amostras 023, 042 e 043). O paciente de número 026 também teve três filhos testados (amostras 032, 036 e 041) e apenas uma das filhas não herdou o alelo expandido (amostra 041), e os outros dois irmãos afetados (amostras 032 e 036) possuem alelos expandidos com números de cópias diferentes. Os indivíduos de número 027 e 030, irmãos, não tiveram a mãe afetada testada molecularmente e possuem, ambos, 41 unidades de repetição CAG. Neste heredograma um indivíduo (amostra 034), cuja mãe foi

relatada como afetada, foi diagnosticado molecularmente como afetado, sendo portador de um alelo com 41 repetições CAG.

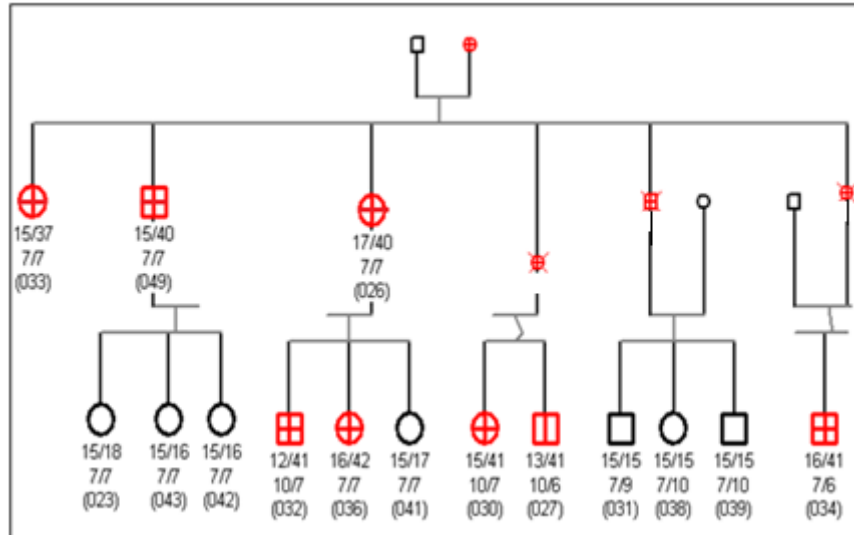


Figura 20: Heredograma 015, com 15 indivíduos, foram testados para DH, e oito tiveram teste positivo para DH

O heredograma 016 mostra cinco indivíduos com histórico de DH relatado que foram testados (Figura 21). Todos os indivíduos são afetados para DH, dentre eles três irmãos (amostras 035, 040 e 044) que herdaram o alelo expandido do pai afetado (amostra 025). Este indivíduo com 39 cópias CAG (amostra 025) transmitiu, para seus três filhos, o alelo anormal com expansões de 40 a 42 cópias variando, portanto, de 1 a 3 unidades. Neste mesmo heredograma, há uma mulher (024) que foi testada e é afetada, porém, seu pai não foi testado para DH.

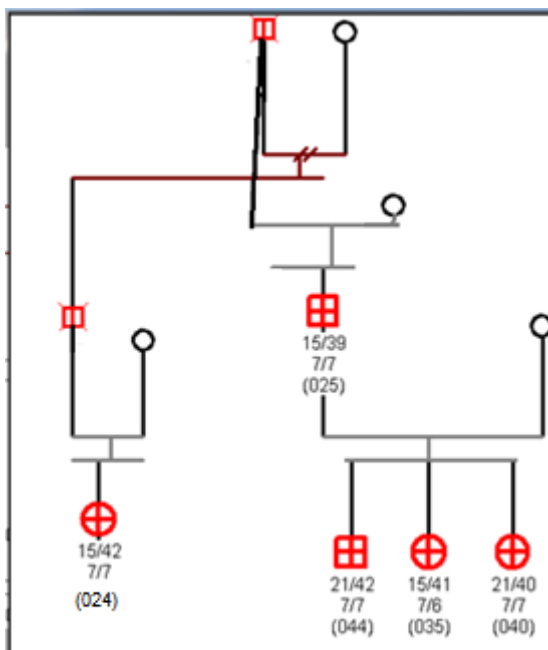


Figura 21: Heredograma 016 com cinco indivíduos testados, todos afetados

No heredograma 017 (Figura 22), sete indivíduos foram testados para DH e quatro deles foram diagnosticados como portadores de alelos expandidos. Um dos afetados, uma mulher cujo número da amostra é 046, transmitiu seu alelo mutado para os dois filhos. Em um dos filhos afetados (amostra 045) o alelo foi expandido 3 unidades CAG e no outro (amostra 047), o alelo contraiu 2 unidades CAG, apesar do alelo permanecer expandido para a doença. O terceiro filho (amostra 048) herdou da mãe o alelo intermediário com 27 unidades de repetição CAG, alelo considerado mutável, porém, não expandido. No mesmo heredograma, outros dois irmãos foram testados, cuja mãe falecida, foi relatada como afetada pela DH, e apenas um deles (amostra 051) é portador de alelo expandido da DH com 49 unidades CAG. Este indivíduo apresentou DH juvenil com início da idade de manifestações clínicas aos 18 anos. Outro indivíduo (amostra 029) foi testado e o alelo herdado do pai, que havia sido relatado como afetado da DH, foi o alelo normal.

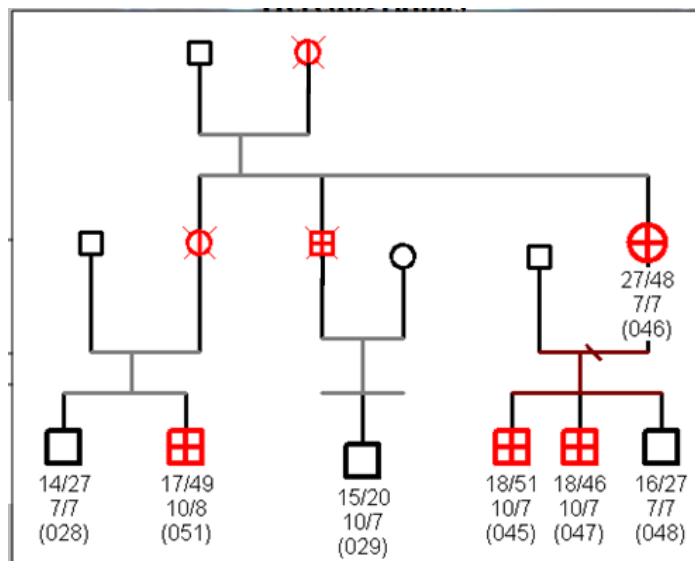


Figura 22: Heredograma 017 com sete indivíduos testados, quatro diagnosticados pelo teste molecular como afetados

O heredograma 019 (Figura 23) teve nove indivíduos testados pelo presente estudo e apenas um deles (amostra 056) não possui alelo expandido para DH. Dos seis irmãos afetados pela DH, quatro (amostras 055, 057, 059 e 060) possuem 39 unidades CAG e os outros dois possuem 40 (amostras 054 e 058), o pai destes indivíduos, relatado como afetado, não foi testado. O indivíduo afetado referente à amostra 061 transmitiu seu alelo mutado para apenas um dos seus filhos (amostra 053), com uma expansão de oito unidades CAG, o outro filho (amostra 056) herdou o alelo normal.

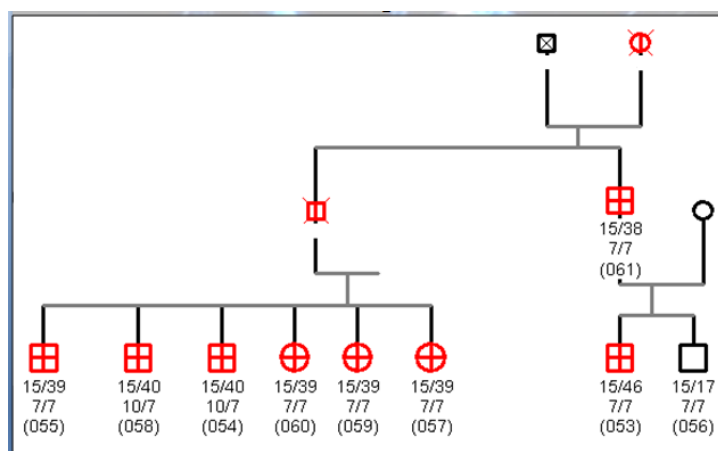


Figura 23: Heredograma 019 com nove indivíduos testados, sendo que oito foram diagnosticados como portadores de alelos expandidos pelo teste molecular

Apesar de terem sido descritas oito famílias com pelo menos dois indivíduos testados, apenas seis delas propiciaram a realização da investigação das relações inter e intrageracionais dos alelos expandidos para DH. Para a investigação intrageracional dos alelos expandidos foram utilizados os heredogramas 008, 011, 015, 016, 017 e 019.

O número de unidades de repetição dos alelos CAG expandidos entre irmãos afetados pela DH, análise intrageracional, variou de 0 a 5 unidades (Gráfico 2).

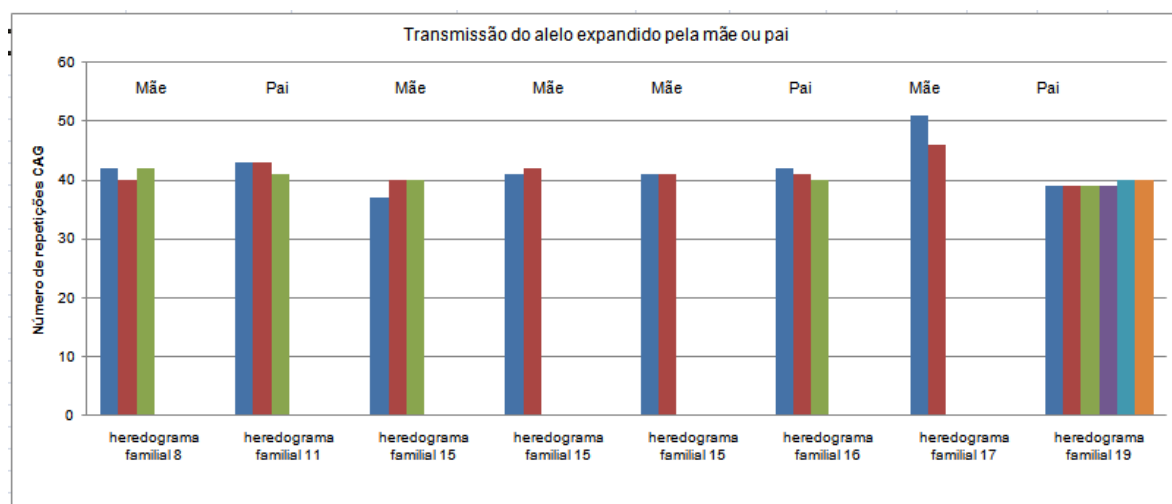


Gráfico 2: Análise intrageracional: variação do número de repetições CAG do alelo expandido entre irmãos, classificados por heredograma e origem materna ou paterna. As barras de cores diferentes identificam os irmãos portadores de alelos expandidos. As cores variadas das barras representam cada irmão da mesma família

E para a investigação intergeracional foram utilizados os heredogramas 015, 016, 017 e 019. Foram duas transmissões paternas e duas maternas do alelo expandido. Na transmissão materna quatro alelos foram alterados em relação às unidades de repetições CAG, e na paterna também. Ocorreram três expansões maternas e quatro paternas, e apenas uma contração materna e nenhuma paterna. O valor médio dos alelos expandidos dos pais foi de 41,25.

A análise intergeracional mostrou que o número de unidades de repetição dos alelos CAG expandidos variou entre pais e filhos afetados de -2 a +8 unidades, com valor médio $2,5 \pm 2,63$ (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13: Transmissão do alelo expandido CAG nos indivíduos do presente estudo

	Total	Materna	Paterna
Número de transmissões	4	2	2
Média dos alelos expandidos dos pais	41,25	44	38,5
Alelos alterados	8	4	4
Contrações	1	1	0
Expansões	7	3	4
Média da variação das unidades CAG	2,5	1	1,75
Variação das unidades CAG	-2 a +8	-2 a +3	+1 a +8

Tabela 14: Análise intergeracional da variação do tamanho dos alelos expandidos transmitidos para os filhos afetados pela DH, em relação a herança materna ou paterna do alelo mutado

	Transmissão materna (Heredograma 015)	Transmissão paterna (Heredograma 016)	Transmissão materna (Heredograma 017)	Transmissão paterna (Heredograma 019)
Pai/mãe	40 unidades CAG	39 unidades CAG	48 unidades CAG	38 unidades CAG
Filho 1	41 unidades CAG	40 unidades CAG	46 unidades CAG	46 unidades CAG
Filho 2	42 unidades CAG	41 unidades CAG	51 unidades CAG	
Filho 3		42 unidades CAG		

A transmissão materna do alelo expandido para os filhos, em três casos, foi maior que para as filhas, que ocorreu em apenas um caso. Já a transmissão paterna do alelo mutado foi igual para as filhas e para os filhos, ocorreu em dois casos de cada categoria. A maior variação das unidades CAG ocorreu na transmissão paterna para os filhos com -3 e +8 unidades, na qual o pai era portador de um alelo com 38 cópias CAG. A única contração ocorreu na transmissão materna para um filho homem, na qual a mãe era portadora de um alelo com 48 unidades CAG (Tabela 15).

Tabela 15: Transmissão do alelo expandido CAG a prole do sexo feminino e masculino na população estudada

	Materna		Paterna	
	filhas	filhos	filhas	filhos
Número de transmissões	1	3	2	2
Tamanho do alelo CAG dos pais	39	40 e 48	39	38
Alelos alterados	1	3	2	2
Contrações	0	1	0	0
Expansões	1	2	2	2
Varição das unidades CAG	2	-2, +1, +3	+1, +2	+3, +8

5.1.3 Distribuição dos alelos da região polimórfica CAG na amostra estudada

De acordo com a classificação dos alelos em três categorias, conforme *The Huntington's Disease Collaborative Research Group* (1993), os alelos intermediários possuem de 27 a 35 unidades CAG, os alelos com penetrância reduzida têm de 36 a 39 e os alelos com penetrância completa possuem repetições trinucleotídicas maiores que 39 unidades CAG. Os alelos normais para DH, no presente estudo, foram considerados aqueles com menos de 27 cópias CAG. Os alelos intermediários foram chamados de mutáveis, e os de penetrância reduzida e completa, de expandidos.

O tamanho de repetições de trinucleotídeos CAG variou de 12 a 58 unidades em todos os cromossomos dos 61 indivíduos estudados (Gráfico 3).

Em relação aos indivíduos com ambos os alelos normais (n=13) para a DH foram encontrados quatro com alelos normais em homozigose, todos eles portadores de ambos os alelos com 15 unidades CAG. Os outros nove portadores de ambos os alelos normais foram heterozigotos. Os alelos destes indivíduos variaram de 15 a 23 cópias CAG, com valor médio de $16,2 \pm 2,1$.

Em relação aos alelos normais, dos indivíduos heterozigotos portadores de alelos mutáveis ou expandidos para DH (n=47), o número de repetições CAG variou de 12 a 26 repetições, com valor médio de $16,3 \pm 3,3$ e mediana de 15. Em 21 indivíduos, dos 47 portadores de alelos anormais para DH (44,7%), o número de repetições de trinucleotídeos foi de 15 unidades CAG. Não foi encontrado nenhum indivíduo portador de alelos expandidos CAG em homozigose.

Os alelos anormais para a DH (27 a >40 cópias CAG) variaram de 27 a 58 unidades de repetições de trinucleotídeos CAG, com valor médio de $41,7 \pm 5,3$. Em 50% dos casos, os indivíduos portadores de alelos mutáveis e/ou expandidos, possuem 41 ou mais cópias CAG.

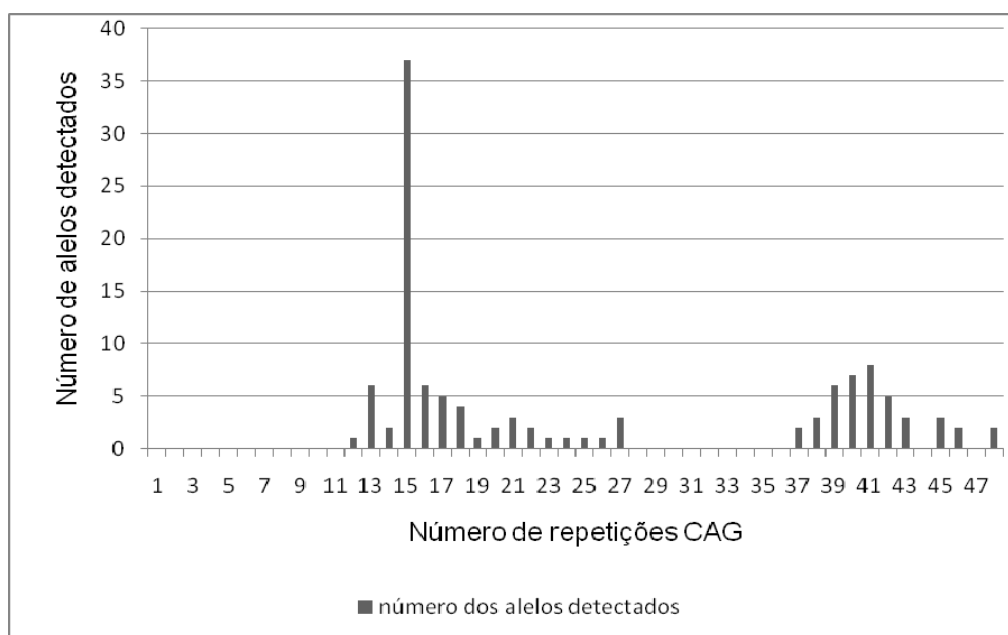


Gráfico 3: Distribuição das repetições CAG em todos os alelos genotipados (n=122). O número de unidades de repetições trinucleotídicas CAG por alelo está representado no eixo x e o número dos alelos detectados para cada repetição no y

Dentre os alelos anormais, dois (4,3%) são alelos intermediários (27 cópias), 11 (23,4%) são de penetrância reduzida (de 36 a 39 cópias) e 34 (72,3%) de penetrância completa (>39 cópias) (Gráfico 4). Nestes dados não está incluído o indivíduo que possui dois alelos anormais para DH em heterozigose. O menor alelo expandido, neste estudo, responsável por causar a DH, foi identificado com 37 cópias CAG e o maior com 58.

Os dois portadores de alelos intermediários não possuem manifestações clínicas, apenas um dentre os 11 portadores de alelos com penetrância reduzida não tem o quadro, e dos 34 indivíduos com alelos de penetrância completa sete não apresentavam ainda quadro clínico, por terem menos idade que aquela de início da doença.

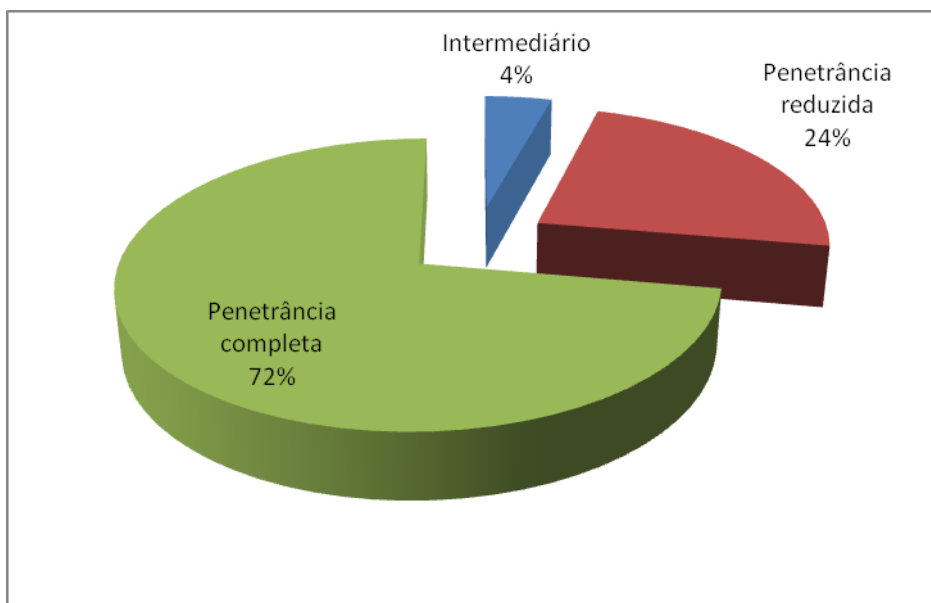


Gráfico 4: Frequência dos alelos intermediários (mutáveis) e dos expandidos com penetrância completa e reduzida na amostra estudada

5.1.4 Distribuição dos alelos da região polimórfica CCG na amostra

Os alelos CCG de todos os cromossomos variaram de 6 a 10 unidades, com valor médio de $7,5 \pm 1,2$. Em 78,7% dos indivíduos estudados os alelos CCG possuíam 7 unidades, o que supõe a ancestralidade genética da Europa Ocidental dos alelos relacionados à DH. Em 39 dos 61 indivíduos estudados (63,9%), os alelos da região polimórfica CCG se encontravam em homozigose com 7 unidades, exceto em um indivíduo cujos alelos em homozigose apresentaram 10 repetições de trinucleotídeos CCG. Os alelos com 10 unidades CAG supõem ancestralidade genética da Ásia (WHEELER et al., 2007).

Os alelos da região polimórfica CCG, de indivíduos portadores de alelos CAG anormais para DH, possuem valores que variam de 6 a 10 unidades com valor médio de $7,1 \pm 0,7$. Em 85,1% destes indivíduos as unidades CCG tinham 7 cópias (Gráfico 5).

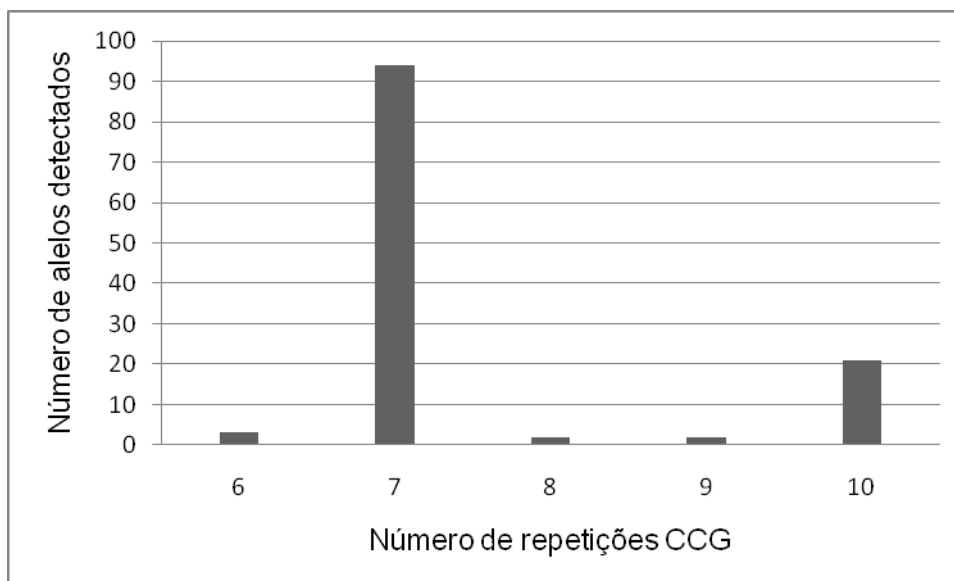


Gráfico 5: Frequência absoluta dos alelos da região polimórfica CCG, no gene *IT15* (n=48)

5.3 REAÇÃO DE PCR

5.3.1 Padronização da PCR quanto aos *primers*

As primeiras reações de PCR deste estudo foram realizadas conforme Warner, Barron e Brock (1993) e Culjkovic e colaboradores (1997). Porém, tal método não propiciou amplificação da região de interesse. Portanto, foi proposto um novo protocolo para amplificação das regiões polimórficas CAG e CCG da região de interesse do gene *IT15*. Uma das modificações foi quanto aos *primers* utilizados. Os *primers*, também conhecidos como *primers*, denominados HD1 (senso), HD2-HEX (antissenso) e HD3-6FAM (antissenso) (Tabela 16), foram analisados por meio de um *software Oligonucleotide Properties Calculator (Olig Calc)* (Figura 14), com relação a alguns aspectos que devem ser levados em consideração ao se desenhar um *primer*. Como por exemplo: temperatura de hibridação, porcentagem das bases nucleotídicas C e G que compõem o *primer*, tamanho do *primer*, especificidade e a probabilidade de ocorrência de ligações cruzadas entre os próprios pares de *primers* ou entre eles mesmos.

Tabela 16: Marcadores genéticos utilizados no primeiro protocolo da PCR utilizado

<i>Primers</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do <i>primer (pb)</i>	Sentido
HD1	5' ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3'	30 pb	senso
HD2-HEX	5' ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3'	30 pb	antissenso
HD3-6FAM	5' GGCGGTGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGC 3'	30 pb	antissenso

O *software Olig Calc* (Figura 24) identificou a formação de alças (*hairpins*) nos *primers* HD1 e HD2-HEX, nas condições de temperatura e ciclos da reação de PCR que foram usados no primeiro protocolo. No HD1 há possibilidade de hibridação entre duas regiões do próprio *primer*, com cinco nucleotídeos complementares representadas em vermelho (Figura 25).

Para o HD2-HEX há possibilidade de hibridação entre duas regiões, do próprio *primer*, com quatro nucleotídeos complementares marcados em vermelho; além da possibilidade de formação de dímeros entre os *primers* em duas regiões complementares, uma com nove e a outra com seis nucleotídeos (Figura 26). O HD3-6FAM não apresentou possibilidade de formação de *hairpins* (Figura 27).

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

CAG CAG CCG CTG TGC CTG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CAG GCA CAG CCG CTG CTG

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule

nM Primer Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na⁺)

Figura 24: Cópia da página do *software Oligonucleotide Properties Calculator*, utilizado para analisar os *primers*

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
 Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

5' ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC 3'

3' Complementarity:
 None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Figura 25: Resultado da avaliação do *primer*HD1 pelo *software Olig Calc*, mostrando as regiões com capacidade de formação de *hairpin*

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
 Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

5' CAGCAGCGGCTGTGCCTG 3'
 5' CAGCAGCGGCTGTGCCTG 3'

3' Complementarity:
 None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

5' CAGCAGCGGCTGTGCCTG 3'
 3' GTCGGTTCGGCGACGAC 5'

5' CAGCAGCGGCTGTGCCTG 3'
 3' GTCGGTTCGGCGACGAC 5'

Figura 26: Resultado da avaliação do *primer* HD2-HEX pelo *software Olig Calc*, mostrando as regiões com capacidade de formação de *hairpins*

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
 Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
 None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Figura 27: Resultado da avaliação do *primer* HD3-6FAM *software Olig Calc*, mostrando a inexistência de regiões com capacidade de formação de *hairpins*

Devido à formação de *hairpins*, conforme avaliação realizada no *Olig Calc*, os *primers* foram substituídos por outros e a reação de foi realizada conforme o protocolo Barboza e colaboradores (2010).

5.3.2 Produtos de amplificação

Foram realizados dois tipos de reações de PCR para propiciar a identificação, tanto da região polimórfica CAG como da CCG. Os amplicons quando submetidos à eletroforese capilar no analisador genético ABI 3500 da *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*, foram convertidos em picos correspondentes ao tamanho em pb dos fragmentos analisados por meio de eletroferogramas, tendo sido usados marcadores de tamanho em pb G5 LIZ (escala alélica padrão).

Neste estudo, foram submetidos à eletroforese para análise genética aproximadamente 200 amostras contendo produtos de reações de PCR, incluindo a análise da região polimórfica CAG e CCG, gerando eletroferogramas referentes a ambas as regiões polimórficas de cada indivíduo (APÊNDICE E).

Os alelos analisados de tamanhos normais (não responsáveis por causar a DH) produziram, nas duas reações de PCR realizadas, na grande maioria, produtos de amplificação consistentes com picos precisos e evidentes, com pouco ou sem resíduos no fundo do eletroferograma. Os picos que representavam alelos normais possuíam um ou, no máximo, dois picos de bandas *stutters* antes do pico principal, intervalados a cada 3 pb (Figura 28).

Nas reações cujo par de *primer* utilizado foi o HD1-FAM/HD3 os fragmentos gerados por PCR mediam de 101 a 146 pb (12 a 26 CAG), em indivíduos com alelos CAG normais para DH. Por outro lado, em indivíduos com alelos anormais para DH os amplicons tinham no mínimo 147 pb (>26 CAG).

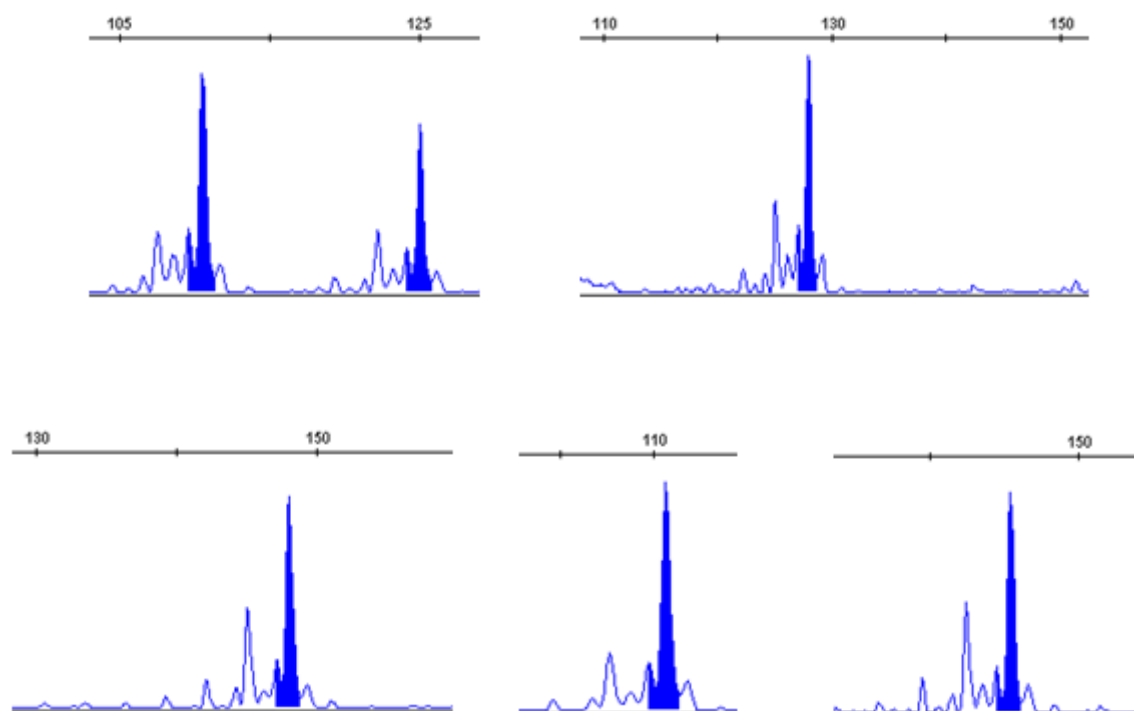


Figura 28: Eletroferogramas dos produtos de amplificação dos alelos de tamanhos normais para o gene *IT15*, de amostras diferentes. Legenda: Picos azuis cheios: picos principais. Picos azuis vazios: picos de bandas *stutters*

Os alelos expandidos observados na amostra de pacientes afetados pela Doença de Huntington também resultaram, na grande maioria, em produtos de amplificação consistentes com picos precisos e evidentes, com pouco ou sem resíduos no fundo do eletroferograma. Estes picos apresentaram dois perfis alélicos, o primeiro perfil constituído por 1 a 3 bandas de *stutters* que antecediam o pico principal com intervalos de 3 pb, e o segundo perfil um grupo de aproximadamente 3 a 10 bandas de *stutters* no qual o pico principal estava misturado aos outros. Entretanto, apenas um pico dominante e evidente era observado em relação aos outros, de acordo com a altura. Este foi selecionado como o pico principal correspondente ao alelo mais representativo encontrado em cada paciente (Figura 29).

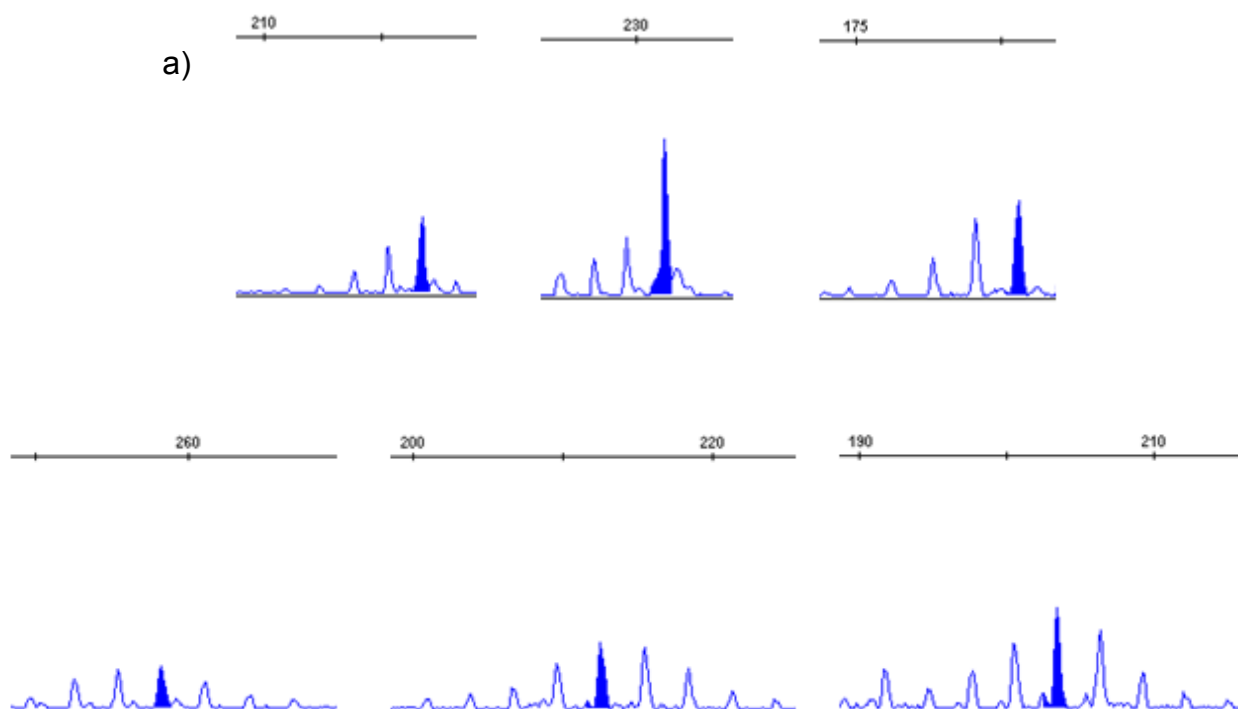


Figura 29: Eletroferograma dos produtos de amplificação dos alelos anormais para o gene *IT15*, de amostras diferentes. Picos azuis cheios: picos principais. Picos azuis vazios: picos de bandas *stutters*. a) perfil alélico com 1 a 3 bandas de *stutters* que acompanham o pico principal; b) perfil alélico com grupo de 3 a 10 bandas de *stutters*

Nas reações cujo par de *primer* utilizado foi HD1-FAM/HD4 os fragmentos mediram de 147 a 240 pb (de 6 a 10 cópias CCG), incluindo a região CAG e CCG. Com a subtração da região CAG, os fragmentos variaram de 62 a 76,1 pb.

Todas as reações de PCR realizadas apresentaram picos inespecíficos, não acompanhados de bandas *stutters*, com 100 pb e com altura de aproximadamente 4.000 unidades de fluorescência (UF), provavelmente causados pela formação de estruturas secundárias entre os *primers*, como dímeros.

A reação de PCR cujo par de *primers* utilizado foi o HD1-FAM/HD3 apresentou um pico inespecífico com aproximadamente 234 pb em todas as reações. Este pico tinha, normalmente, altura entre 1.000 a 2.000 UF (Figura 30).

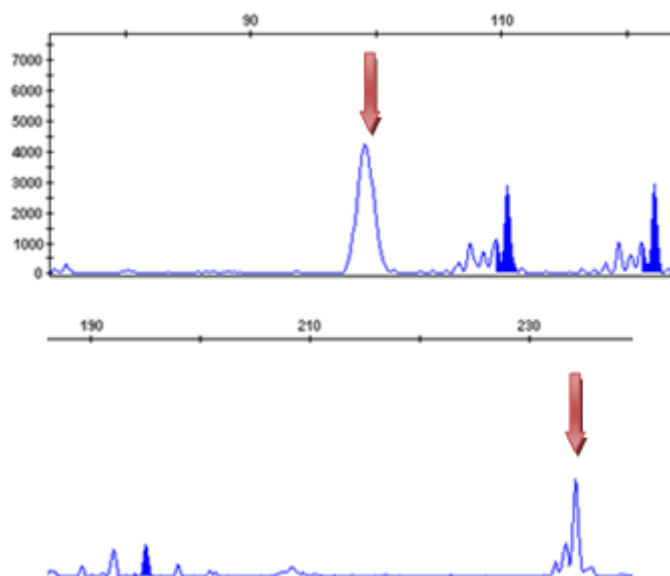


Figura 30: Eletroferogramas de amplicons produzidos por PCR, com os *primers* HD1-FAM e HD3 de amostras diferentes, com picos inespecíficos de 100 e 234 pb, indicados por setas vermelhas. Os picos azuis cheios são picos principais e os picos azuis vazios são bandas *stutters*. Os valores de fluorescência estão lançados no eixo y

A outra reação de PCR cujo par de *primers* utilizado foi o HD1-FAM/HD4 também deu origem a picos inespecíficos nos eletroferogramas em todas as reações analisadas, com tamanhos de 159,74; 170,4 e 232,5 pb. Os picos inespecíficos de 159,74 pb e de 170,4 pb variavam de 6.000 a 8.000 UF. E o pico de aproximadamente 232,5 pb variou de 4.000 a 6.000 UF (Figura 31).

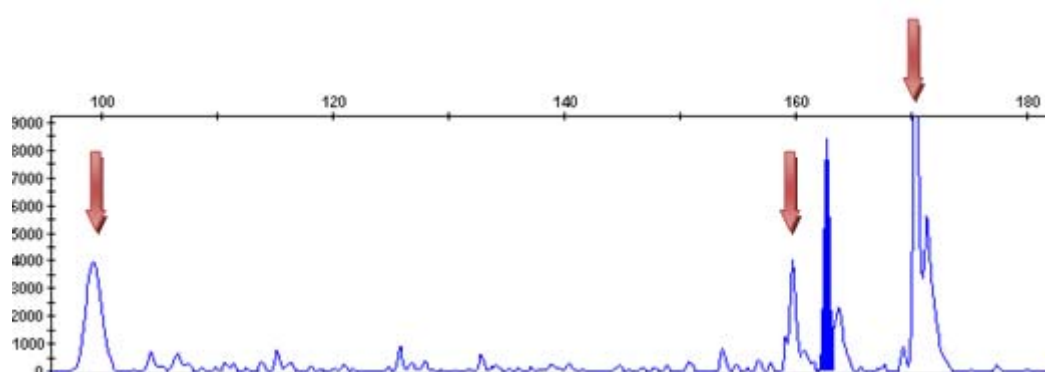


Figura 31: Eletroferograma dos amplicons da reação de PCR, com os *primers* HD1-FAM e HD4. Pico azul cheio: pico principal que representa o fragmento com 162,65 pb. Pico azul vazio vizinho ao principal: pico de banda *stutter*. Demais picos azuis vazios: picos inespecíficos de 100; 159, 74 e 170,4 pb indicados pelas setas vermelhas

Os picos principais que tinham aproximadamente o mesmo tamanho em pb dos picos inespecíficos foram analisados com cautela devido à possibilidade de sobreposição de dois picos. A sobreposição foi observada e identificada tendo como referência a altura dos picos. Quando um pico principal tem a altura maior que 10 a 20% dos picos de bandas *stutters* não há sobreposição, porém, se a altura de um pico principal é maior que 20% dos picos *stutters* relacionados a ele, é forte indicativo de ocorrência de sobreposição de dois picos (inespecífico e picos principais) (OVERSON, 2009).

5.3.3 Determinação dos tamanhos dos alelos

Os tamanhos (em pb) dos fragmentos amplificados de cada amostra variam entre si por pequeno número de pares de bases. Por exemplo, o alelo 15, com 15 unidades CAG, variou o tamanho de seus fragmentos correspondentes de 109,8 a 110,8 pb, em 37 indivíduos estudados portadores do alelo 15. Porém esta diferença não foi significativa ao ponto de alterar o tamanho do alelo para mais ou menos uma unidade alélica.

A média, a frequência absoluta, a mediana, o menor e maior valor encontrado, o desvio padrão e a variância referentes aos tamanhos (em pb) dos 122 alelos da região polimórfica CAG genotipados estão apresentados na Tabela 17.

As medidas de variância encontradas para os tamanhos dos fragmentos de cada alelo (de 12 a 58 repetições CAG, com exceção do alelo 22) variaram de 0,001 a 0,3 pb. O alelo 22 teve a maior variância, de 3,2 pb, sendo o resultado do cálculo do número de repetições considerado 22 por aproximação (o menor valor do tamanho dos fragmentos correspondentes ao alelo 22 foi 21,64 e o maior 22,49).

Tabela 17: Estudo estatístico do tamanho dos fragmentos (em pb) correspondentes aos alelos CAG genotipados

Alelos	Número de alelos detectados	Média	Mediana	Menor valor detectado	Maior valor detectado	Desvio Padrão	Variância
12	1			101,3	101,3		
13	6	104,5	104,5	104,4	104,6	0,1	0,0049
14	2	107,5	107,5	107,4	107,6	0,1	0,0162
15	36	110,5	110,5	109,8	110,7	0,2	0,0379
16	6	113,4	113,4	113,4	113,6	0,1	0,0098
17	6	116,3	116,3	116,3	116,4	0,0	0,0025
18	4	119,3	119,3	119,3	119,4	0,1	0,0030
19	1			122,1	122,1		
20	2	125,0	125,0	124,9	125,1	0,1	0,0072
21	3	128,2	128,1	127,9	128,7	0,5	0,2040
22	2	132,2	132,2	130,9	133,5	1,8	3,2258
23	1			134,5	134,5		
24	1			139,3	139,3		
25	1			142,2	142,2		
26	1			145,4	145,4		
27	3	148,2	148,1	148,1	148,4	0,2	0,0240
37	2	177,6	177,6	177,5	177,6	0,1	0,0041
38	3	180,5	180,5	180,4	180,5	0,1	0,0048
39	6	183,2	183,2	183,0	183,4	0,1	0,0222
40	7	186,2	186,1	185,9	186,5	0,2	0,0311
41	8	189,0	189,0	188,9	189,0	0,1	0,0026
42	5	192,3	192,2	192,0	193,3	0,6	0,3224
43	3	194,9	194,9	194,9	194,9	0,0	0,0012
45	3	201,0	200,9	200,6	201,5	0,5	0,2044
46	2	203,7	203,7	203,6	203,9	0,2	0,0481
48	2	209,3	209,3	209,3	209,4	0,1	0,0145
49	2	212,7	212,7	212,5	212,9	0,2	0,0613
51	1			218,4	218,4		
53	1			223,9	223,9		
58	1			241,1	241,1		

Assim como os alelos com repetições CAG, os com CCG também foram analisados estatisticamente quanto à média, à frequência absoluta, à mediana, ao menor e ao maior valor em pb dos fragmentos, ao desvio padrão e à variância referentes aos tamanhos dos 122 fragmentos da região polimórfica CCG, dos 61 indivíduos investigados (Tabela 18).

As medidas de variância do tamanho dos fragmentos de cada alelo (de 6 a 10 repetições CCG, com exceção do alelo nove) variaram de 0,06 a 0,29 pb. O alelo nove teve a maior variância, de 1,4 pb.

Tabela 18: Estudo estatístico do tamanho dos fragmentos (em pb) correspondentes aos alelos CCG genotipados

Alelos	Número de alelos detectados	Média	Mediana	Menor valor detectado	Maior valor detectado	Desvio Padrão	Variância
6	3	62,4	62,6	62,0	62,8	0,4	0,16
7	94	65,2	65,2	64,6	66,5	0,3	0,07
8	3	67,4	67,3	67,2	67,7	0,3	0,06
9	2	72,2	72,2	71,4	73,0	1,2	1,41
10	20	74,4	74,2	74,0	76,1	0,5	0,29

5.4 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

As 12 amostras primeiramente coletadas neste estudo foram reanalisadas em outros laboratórios como no NUDIM-UENF, Laboratório de Neurologia Experimental e Aplicada da USP-Ribeirão Preto e no Laboratório H. Pardini de Belo Horizonte-MG, para a validação dos resultados. Já que havíamos realizado modificações no protocolo de referência. Dentre as amostras que foram analisadas novamente, havia indivíduos com alelos CAG normais e expandidos para DH (Tabela 19).

Tabela 19: Descrição dos resultados de determinação do número de repetições CAG dos dois alelos de cada indivíduo determinados pelo presente estudo (UNIRIO) e realizados em outros laboratórios (n=12 amostras reanalisadas). Alelo 1 corresponde ao menor alelo da região polimórfica CAG, e o alelo 2, o maior, de cada indivíduo testado em nível molecular

Nº de identificação dos indivíduos com testes reavaliados para DH	UNIRIO:		Outros laboratórios:		Laboratório
	Tamanho alelo 1 da região CAG	Tamanho alelo 2 da região CAG	Tamanho alelo 1 da região CAG	Tamanho alelo 2 da região CAG	
1	21	23	21 N	23	NUDIM
2	16	43	17 P	44	H. PARDINI
4	15	19	15 N	19	NUDIM
5	17	18	18 U	19	USP

Nº de identificação dos indivíduos com testes reavaliados para DH	UNIRIO: Tamanho alelo 1 da região CAG	UNIRIO: Tamanho alelo 2 da região CAG	Outros laboratórios: Tamanho alelo 1 da região CAG	Outros laboratórios: Tamanho alelo 2 da região CAG	Laboratório
6	15	15	15 N	15	NUDIM
7	13	45	13 N	45	NUDIM
8	15	39	15 N	39	NUDIM
9	24	42	24 N	42	NUDIM
10	13	45	14 U	46	USP
11	19	49	19 N	48	NUDIM
12	15	40	15 N	40	NUDIM
36	15	41	16 U	42	USP

5.5. CASOS DE DH SELECIONADOS

Um indivíduo do sexo feminino (amostra de número 046), com idade atual de 44 anos, recebeu o alelo expandido para DH da mãe e teve início do quadro clínico aos 28 anos. Em relação ao quadro clínico, está acamada, não fala e se alimenta de comida pastosa. Com relação ao genótipo, possui um alelo de penetrância completa (48 cópias CAG) e o outro é um alelo intermediário (27 cópias CAG) para DH. Possui alelos CCG em homozigose, ambos com 7 unidades de repetição.

Outro indivíduo afetado, do sexo feminino, portador de alelo expandido com 48 cópias CAG (amostra de número 021), possui pais com aproximadamente 70 anos de idade sem manifestações clínicas da DH, sendo que a geração anterior ao pai possui histórico de uma doença com quadro semelhante à DH. Entretanto, os pais ainda não fizeram o teste molecular para a DH.

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS

5.6.1 Casuística

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos dos indivíduos portadores de alelos anormais para DH ($p= 0,154$).

A correlação entre doença manifesta e transmissão paterna ou materna do alelo anormal não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,306$).

5.6.2 Correlação entre o tamanho da região polimórfica CAG e idade de início das manifestações clínicas

A análise estatística realizada entre as variáveis idade de início da doença e número de repetições CAG anormais para DH, sugeriu existir uma forte correlação negativa (*Pearson* (r)= -0,84) com um valor de $p < 0,001$ (Gráfico 6).

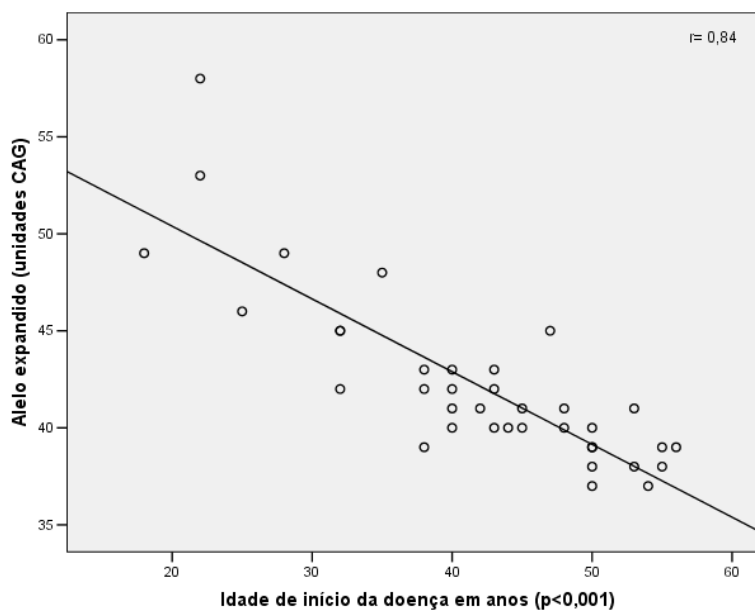


Gráfico 6: Correlação negativa entre número de unidades CAG dos alelos anormais (expandidos e mutáveis) para DH e idade de início das manifestações clínicas

As idades de início da doença e os tamanhos dos alelos expandidos foram selecionados da amostra de indivíduos portadores de alelos anormais para DH ($n=47$), no qual apenas 10 não tinham manifestações clínicas (Tabela 20).

Tabela 20: Descrição entre o tamanho dos alelos CAG de indivíduos portadores de alelos anormais para DH e a idade de início das manifestações clínicas

Número de identificação dos indivíduos com alelos anormais para DH	Alelo anormal para DH (unidades CAG)	Idade de início da doença
2	43	40
7	45	47
8	39	38
9	42	38
10	45	32
11	49	28
12	40	43
14	43	38
15	43	43
16	41	53
18	41	42
19	58	22
20	42	32
21	48	35
24	42	43
25	39	56
26	40	44
27	41	40
28	27	Não iniciou
30	41	Não iniciou
32	41	Não iniciou
33	37	50
34	41	48
35	41	Não iniciou
36	41	45
40	40	Não iniciou
44	42	Não iniciou
45	51	Não iniciou
46	27 e 48	48
47	46	Não iniciou
48	27	Não iniciou
49	40	50
50	38	55
51	49	18
52	42	40
53	46	25
54	40	45
55	39	Não iniciou
57	39	55
58	40	40
59	39	50
60	39	50
61	38	53
62	37	54
63	53	22
64	40	48
65	45	32
66	38	50

5.6.3 Correlação entre o tamanho da região polimórfica CCG e a idade de início das manifestações clínicas

O estudo estatístico realizado relacionando a idade de início da doença e número de repetições CCG mostrou não existir entre as variáveis correlação significativa ($r= 0,06$) com um valor de $p<0,001$ (Gráfico 7).

Os alelos CCG correlacionados foram selecionados dos mesmos cromossomos ($n=47$) que possuíam unidades CAG anormais, expandidas e mutáveis.

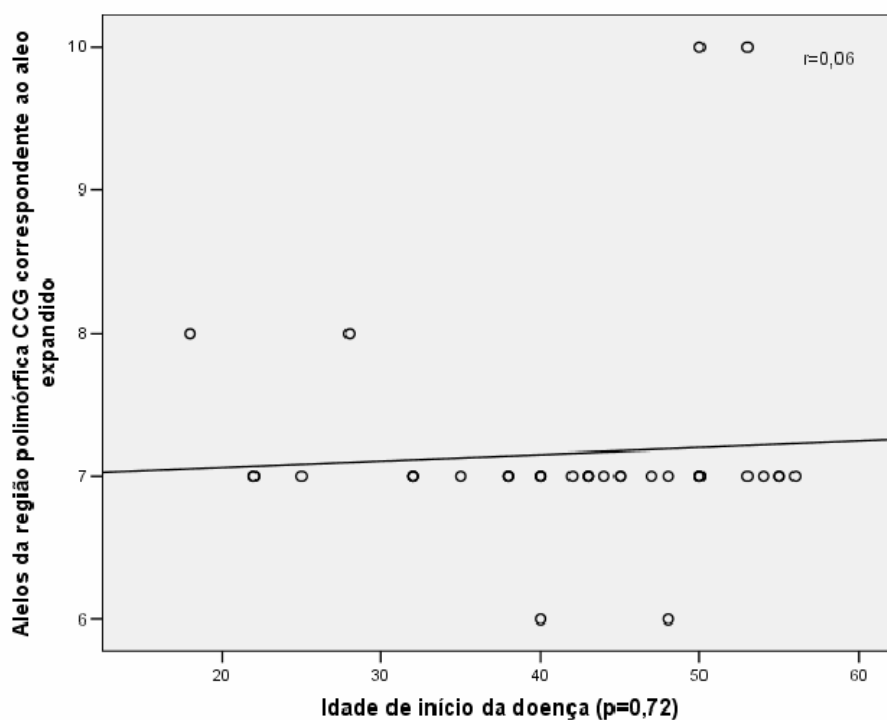


Gráfico 7: Correlação entre número de repetições CCG dos alelos anormais (expandidos e mutáveis) para DH e idade de início das manifestações clínicas

5.6.4 Comparação dos resultados validados por outros laboratórios

A comparação entre os resultados do tamanho de fragmentos CAG obtidos nos três laboratórios já citados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($r= 0,99$) com valor de $p<0,001$, sugerindo que 99% dos resultados obtidos por outros laboratórios foram iguais aos obtidos na UNIRIO, tanto para os alelos normais como para os expandidos.

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS UTILIZADOS

O diagnóstico molecular das doenças causadas por expansões de trinucleotídeos de repetição é controverso por questões éticas e por faltar um tratamento definitivo e específico para essas doenças, como por exemplo, a DH.

Entretanto, a possibilidade de diagnóstico oferece ao clínico e ao paciente e seus familiares o esclarecimento do possível prognóstico contribuindo também para o aconselhamento genético e planejamento familiar.

Além disso, o diagnóstico molecular também oferece uma perspectiva para que possíveis estratégias terapêuticas possam ser adotadas no futuro, à medida que estudos moleculares entre outros forem desvendando os processos celulares de degeneração e os tratamentos para os mesmos.

6.1.1 Extração de DNA

A técnica de extração de DNA por fenol-clorofórmio, descrita por Sambrook, Fritsch e Maniats (1989) modificada, é um método de escolha da maioria dos estudos relacionados às doenças causadas por expansões trinucleotídicas. Pois esta técnica proporciona um produto puro e de boa qualidade, garantindo a amplificação de regiões repetitivas como é o caso das expansões CAG da Doença de Huntington (JOHN et al., 1990). Porém utilizamos no presente estudo um kit de extração de DNA (kit *Blood Genomic Prep Spin*) da empresa GE Healthcare por facilidade metodológica que também resultou em substratos de DNA com excelente qualidade para análise genética. Este kit tem como princípio a purificação do DNA genômico baseada no método que emprega colunas com membrana de sílica para separação e purificação eficiente do DNA.

6.1.2 Reações da PCR

As primeiras reações de PCR deste estudo para investigação molecular de DH foram realizadas conforme Warner, Barron e Brock (1993) e Culjkovic e colaboradores (1997). Porém, tal abordagem não propiciou a amplificação da região alvo deste estudo em todas as amostras. Os *primers* utilizados, denominados HD1 (senso), HD2-HEX (antissenso) e HD3-FAM (antissenso), foram analisados, neste estudo, por meio do *software Olig Calc* que identificou a formação de alças (*hairpins*) nos *primers* HD1 e HD2-HEX.

Tais resultados podem indicar o motivo pelo qual esses *primers* não favoreciam a formação de produtos de amplificação em todas as reações de PCR realizadas com os protocolos propostos por Warner, Barron e Brock (1993) e Culjkovic e colaboradores (1997). Pois a formação de *hairpins* propicia inúmeras possibilidades de formação de estruturas secundárias, relativamente pequenas, de 6 a 10 pb, como alças tipo cabeça de alfinete. Estas seqüências repetidas invertidas que possuem menor energia livre são as de menor estabilidade e com maior probabilidade de formação de estruturas secundárias o que impede o sucesso da reação da polimerase em cadeia (CAMPOS, 2005). Portanto, o protocolo foi substituído e realizado conforme o laboratório do NUDIM-UENF.

A construção dos *primers* para a delimitação das regiões de repetições trinucleotídicas CAG e CCG na região 4p16.3 não é simples, uma vez que são regiões ricas em nucleotídeos C e G. Conseqüentemente, os *primers* são construídos com grandes quantidades destas duas bases. O DNA com fita dupla nessas regiões se renaturam imediatamente após a etapa de desnaturação, dificultando a hibridação do *primer* na região complementar do DNA, além de prejudicar sua extensão (CULJKOVIC et al. 1997).

As pesquisas que investigam expansões trinucleotídicas no gene *IT15*, responsável por causar a DH, utilizam *primers* extensos e ricos em nucleotídeos C e G. Kalman e colaboradores (2007) publicaram um artigo que comparava pelo menos cinco diferentes *primers* utilizados em laboratórios diferentes, e a maioria deles possuía aproximadamente 20 a 30 pb e eram compostos por mais de 50% de bases de nucleotídeos C e G. Porém quanto maior o número Guanina e Citosina, maior deve ser a temperatura de hibridação, e mais difícil se torna a reação de PCR.

Neste estudo, os *primers* tinham de 21 a 22 pb e eram compostos por mais de 50% de C e G, e a temperatura de hibridação da PCR foi de 59,1°C, ligeiramente inferior quando comparada às temperaturas de hibridação utilizadas por Warner, Barron e Brock (1993) e Culjkovic e colaboradores (1997). Estes autores usavam *primers* de 30 a 33 pb com mais de 50% de nucleotídeos C e G e a temperatura de hibridação variava de 60 a 65°C. O *primer* de sentido senso (HD1-6FAM) que foi utilizado no presente estudo é acoplado com fluoróforo 6-FAM para que os amplicons produzidos na PCR sejam detectados na análise por eletroforese capilar.

6.1.2.1 Produtos de amplificação

Os produtos de amplificação são os fragmentos genéticos, medidos em pb, gerados a partir da técnica de PCR. As regiões alvo para PCR são delimitadas por *primers*, *primers* complementares à região alvo do estudo. O segmento do DNA genômico objeto deste estudo é um sítio de difícil amplificação por PCR, por estar localizado em uma região rica em nucleotídeos C e G (CULJKOVIC et al. 1997).

As regiões ricas em C e G necessitam de uma maior temperatura de desnaturação do DNA, pois estão ligadas com suas bases complementares por três pontes de hidrogênio cada, ao contrário das bases adenina e timina, que se pareiam por meio de duas pontes de hidrogênio.

Nas reações cujo par de *primer* utilizado foi HD1-FAM/HD3 os fragmentos gerados por PCR (amplicons) podem medir de 101 a 146 pb (12 a 26 CAG), em indivíduos com alelos CAG normais para DH. Por outro lado, em indivíduos com alelos anormais para DH estes amplicons possuem tamanho mínimo de 147 pb (>26 CAG). No presente estudo não foi identificado nenhum alelo com mais de 58 unidades CAG cujo amplicon mede 241 pb. Portanto ainda não se sabe qual o maior tamanho de fragmento que este protocolo utilizado é capaz de detectar. Os alelos com número de repetições maiores que 100 cópias CAG são mais difíceis de serem amplificados (KALMAN et al., 2007).

Nas reações cujo par de *primer* utilizado foi HD1-FAM/HD4 os fragmentos mediram de 147 a 240 pb, mas podem chegar a valores maiores uma vez que esta reação analisa em conjunto a região polimórfica CAG mais a CCG.

Vale ressaltar que para a obtenção dos tamanhos de fragmentos referentes apenas às regiões CCG, deve-se subtrair a região CAG do valor total do tamanho da região CCG. Estes valores variaram de 62 a 76,1 pb quando as unidades CCG possuíam entre 6 a 10.

Os amplicons com presença de fragmentos *stutters* quando analisados por eletroforese capilar geram vários picos nos eletroferogramas, dentre eles é selecionado como pico principal o mais proeminente. E quando os fragmentos polimórficos são analisados por eletroforese em gel, a banda escolhida como principal é a maior encontrada (KALMAN et al., 2007).

Os picos *stutters* são artefatos que podem aparecer nos eletroferogramas como grupos de picos, espaçados entre si por no máximo 4 pb, resultado do escorregamento (*slippage*) da Taq polimerase durante o processo de amplificação do DNA, principalmente em regiões polimórficas de repetições de nucleotídeos *in tandem*. As bandas *stutters* são menores que os picos principais, e normalmente se encontram a esquerda deles (OVERSON, 2009).

Sugere-se que a degradação do DNA, por ações químicas e/ou por interferências de microorganismos devido a condições não adequadas de armazenamento, possa interferir na qualidade dos picos e, conseqüentemente, nos resultados dos testes genéticos.

Devido a isso, as primeiras amostras processadas, que demoraram um tempo maior para serem analisadas, mostraram resultados com qualidade inferior (ruídos nos eletroferogramas) em relação às outras processadas de imediato.

Observou-se que quanto menor o intervalo de tempo entre a coleta da amostra biológica e o processamento da mesma, maior é a qualidade dos picos e menor a existência de resíduos no fundo do eletroferograma e o aparecimento de picos inespecíficos.

6.1.3 Eletroforese capilar

A técnica de eletroforese em um analisador genético, como o ABI 3500 utilizado, quando comparada às técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida, estima melhor os resultados em relação ao tamanho dos alelos CAG genotipados (WILLIAMS et al., 1999). Le, Fung e Trent (1997), ao compararem a eletroforese em

gel de poliacrilamida e a eletroforese capilar em investigações para genes mutados para a DH obtiveram resultados mais reprodutíveis e precisos com a eletroforese capilar. O número de repetições CAG é determinado com menos duas unidades quando a amostra é analisada por eletroforese capilar, em comparação com o gel de poliacrilamida. Isso vale para fragmentos de 15 a 54 unidades CAG, o que é explicado devido às ligações cruzadas existentes no polímero do gel de poliacrilamida que, de certa forma, faz com que os fragmentos corram menos na eletroforese e sejam identificados com peso molecular ligeiramente maior do que realmente têm. Ao contrário, o polímero usado na eletroforese capilar é linear e facilita a migração dos fragmentos através da trama.

Além da eletroforese capilar, que usa *primers* acoplados a fluoróforos na PCR, para que os amplicons sejam detectados pela fluorescência, alguns laboratórios ainda usam *primers* acoplados a radioisótopos e fazem a determinação dos tamanhos dos amplicons por eletroforese em gel de poliacrilamida (KALMAN et al., 2007).

6.1.3.1 Definição do tamanho dos alelos

Foi desenvolvido um material de referência para testes genéticos para a DH, conforme Kalman e colaboradores (2007), no qual dez laboratórios diferentes analisaram a mesma amostra, e foi concluído que uma variedade de tamanho dos fragmentos amplificados podem relatar o mesmo alelo. Este estudo também identificou diferentes tamanhos de amplicons para cada alelo correspondente conforme citado em resultados no item 5.1.3.

6.2 CASUÍSTICA

A doença de Huntington possui prevalências variadas em diferentes partes do mundo. A emigração europeia e a miscigenação genética entre populações com diferentes origens étnicas podem ter sido responsáveis pela variedade destas prevalências. A população brasileira, com alta miscigenação genética entre descendentes europeus e africanos, pode ser uma amostra interessante para

aprender-se mais sobre a história, incidência e a propagação da DH (SILVA et al., 2000).

Estudos brasileiros já publicados (RASKIN et al., 2000; SILVA et al., 2000), assim como a presente dissertação, possuem papéis importantes para o conhecimento da incidência, dos métodos diagnósticos e prognósticos de pacientes brasileiros com DH.

No presente estudo foi calculada, pela primeira vez, a prevalência mínima da cidade de Ervália, com valor de 8,9/10.000 indivíduos. Este valor é de 8,9 a 17,8 vezes maior que os dados da população caucasiana conforme a *WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION)*. Esta cidade (zona rural) têm alta prevalência da DH por ter sido um local de refúgio para indivíduos portadores e famílias da DH residentes de cidades vizinhas, que migraram para esta região e começaram a constituir famílias entre eles.

A variabilidade clínica, na apresentação dos sinais e sintomas da doença, muitas vezes exige uma investigação genética precisa em nível molecular para determinação do diagnóstico definitivo, uma vez que as manifestações clínicas da DH podem ser semelhantes às de outras doenças com melhor prognóstico.

Em uma pesquisa realizada com uma grande coorte de indivíduos franceses, que possuíam o quadro clínico semelhante a DH, foram encontrados, em um n amostral de 252 pacientes, dois com Huntington-like tipo 2 (HDL2) e dois indivíduos com SCA17 ou HDL4 (STEVANIN; FUJIGASAKI; LEBRE, 2003).

Outra pesquisa realizada no norte da América, foram encontrados seis (1,1%) casos, em um grupo amostral de 538 indivíduos com quadro semelhante à DH. Porém, estes indivíduos não foram testados para outras doenças. Enquanto que em um grupo de 44 japoneses não havia nenhum caso de HDL2 (MARGOLIS; HOLMES; ROSENBLATT, 2004).

Neste estudo apenas dois indivíduos tinham o diagnóstico molecular negativo para a doença, dentre os sessenta e cinco investigados, apesar de possuírem o quadro clínico semelhante a DH, mas com histórico familiar de outra doença com distúrbio de movimentos. Estes pacientes foram excluídos da análise estatística desta dissertação por destoarem dos outros indivíduos selecionados para o estudo, uma vez que não tinham aspectos relacionados à DH. Além disso, no presente estudo estes indivíduos não foram testados, em nível molecular, para

outras doenças genéticas semelhantes à DH por não haver na rotina do laboratório métodos padronizados para este procedimento.

Dentre os indivíduos investigados para DH foram observados alguns casos que exigem uma atenção maior por não serem muito comuns em relação aos outros casos estudados neste trabalho (descrito em resultados item 5.5).

O primeiro indivíduo, do sexo feminino, portador de um alelo de penetrância completa (48 cópias CAG) e de outro intermediário (27 cópias CAG) para DH, apresentou o quadro mais cedo quando comparado a outro indivíduo afetado que possui um alelo normal (14 cópias CAG) e um alelo de penetrância completa (48 cópias CAG). O quadro pode ter sido agravado pela presença de dois alelos anormais para DH em um único indivíduo genotipado.

Outro indivíduo afetado não possui pais afetados até o momento (com aproximadamente 70 anos de idade), sendo que a geração anterior ao pai possui histórico de uma doença com quadro semelhante à DH. Entretanto, os pais ainda não fizeram o teste molecular para a DH. Se confirmados negativos, uma hipótese é a de que o pai possa ser portador de um alelo intermediário, ou de penetrância reduzida, e transmitiu o alelo expandido para a filha, que apresenta a mutação no gene *IT15* confirmada em nível molecular.

Em relação aos dados analisados, não houve diferença estatística significativa entre os indivíduos com DH do sexo masculino e feminino ($p=0,154$), assim como na pesquisa do Silva e colaboradores (2000). Isso se explica pelo fato da doença de Huntington não ser uma doença que acomete especificamente um sexo, ambos os sexos são afetados em igual proporção por ser uma doença autossômica dominante (KAPLAN; SADOCK, 1993).

Porém, conforme Kovtun e colaboradores (2004) o sexo do embrião influencia na probabilidade de ocorrência de contrações no tamanho das expansões CAG, e esta alteração ocorre na fase pós zigótica. Observações similares foram feitas por Wheeler e colaboradores (2007) em pesquisa realizada com indivíduos afetados pela DH, no qual 42% dos alelos de transmissão materna para as filhas sofreram contração no tamanho do alelo CAG, enquanto que nos filhos a contração foi em apenas 27% dos casos. O sexo acaba sendo um fator que pode determinar esta diferença devido a maior instabilidade genética, pós zigótica, encontrada nos espermatozoides portadores de cromossomos Y em relação ao X (KOVTUN et al., 2004).

O índice de heterozigose do alelo normal na população brasileira segundo Silva e colaboradores (2000) foi de 88%, e o do presente estudo foi um pouco menor com 69,23%. Estes índices variam de acordo com a região, na Turquia, por exemplo, o índice de heterozigosidade é de 60% (AKBAS; ERGINEL-UNALTUNA, 2003).

6.2.1 Investigação inter e intrageracional dos alelos anormais para DH

A instabilidade somática, que pode levar ao mosaicismo das unidades de repetições CAG, pode explicar o surgimento do fenótipo da DH em portadores de alelos com menos de 36 unidades CAG (TELENIUS et al., 1994, apud ANDRICH et al., 2008).

Pesquisas realizadas por outros autores, em relação aos fatores intergeracionais dos alelos expandidos, m que revela e existe diferença significativa entre a transmissão paterna dos alelos e a transmissão materna (valor de $p < 0,0001$), assim como diferença na proporção entre ocorrência de contrações e de expansões quando os alelos CAG são transmitidos pelo pai ou pela mãe (KOVTON et al., 2004; WHEELER et al., 2007).

Um estudo realizado no Brasil em 2000 por Raskin e colaboradores mostrou maior ocorrência de expansões quando a transmissão foi paterna. E, em dois casos, tanto a transmissão materna como a paterna foram estáveis, não houve variação do alelo expandido.

O presente estudo com indivíduos brasileiros teve mais ocorrências de expansões quando a transmissão foi paterna. Os eventos de contrações ocorreram mais no alelo transmitido pela mãe. O valor médio da variação das unidades CAG foi de 2,5, maior que na população da Venezuela (WHEELER et al., 2007). O tamanho dos alelos CAG transmitidos pelos pais teve valor médio de 41,25, e foi maior na transmissão materna, conforme na Venezuela. No presente estudo não houve alelos expandidos com transmissão estável em relação à variação das unidades de CAG.

No presente estudo não houve diferença estatística significativa no tamanho dos alelos expandidos da DH quando transmitidos pelo pai ou pela mãe ($p = 0,306$) assim como o estudo realizado no Brasil em 2000 por Silva e colaboradores.

Talvez estas diferenças entre os resultados das análises intergeracionais de populações diferentes tenham sido devido à pequena amostra de indivíduos investigados no presente estudo (quatro pais com seus respectivos filhos testados). Portanto, sugere-se que a amostra para tal investigação seja maior em estudos posteriores.

Também foi investigada, na Venezuela, a instabilidade dos alelos CAG expandidos quanto ao sexo da prole, no qual as transmissões maternas e paternas foram detalhadas de acordo com o sexo dos filhos que receberam o alelo mutado.

No presente estudo, a transmissão materna do alelo expandido para os filhos foi maior que para as filhas, em concordância ao estudo realizado por Wheeler e colaboradores (2007). Já a transmissão paterna do alelo mutado foi igual para as filhas e para os filhos. A maior variação das unidades CAG ocorreu na transmissão paterna para os filhos com -3 e +8 unidades, o que coincide com o estudo da Venezuela. A única contração ocorreu na transmissão materna para um filho homem, que conforme Wheeler e colaboradores (2007) foi a categoria que teve maior número de ocorrência das mutações.

Os dados acima se apresentam semelhantes aos dados dos estudos desenvolvidos na Venezuela. Enfatiza-se, mais uma vez, que se faz necessário um estudo com uma amostra maior de indivíduos para propiciar uma investigação mais fidedigna das transmissões intergeracionais dos alelos expandidos a prole.

Em relação ao Huntington juvenil, com aparecimento da doença antes dos 20 anos, geralmente representam 10% da amostra de afetados pela DH (ANDREW et al., 1993; NAHHAS et al., 2005). No presente estudo apenas um indivíduo desenvolveu a doença juvenil, com 49 unidades CAG. Portanto, a frequência de indivíduos com a doença juvenil do presente estudo é menor que 10%, frequência relatada por Andrew e colaboradores (1993) e Nahhas e colaboradores (2005). Vale ressaltar que alguns indivíduos investigados neste estudo não souberam relatar com precisão em que momento (idade de início) perceberam o surgimento das alterações motoras. Uma vez que a presente dissertação é um estudo descritivo prospectivo, os indivíduos não foram acompanhados desde o início da doença, sendo a informação em relação à idade de início relatada pelo afetado, com auxílio de seus cuidadores e familiares.

Porém, se for considerado que os indivíduos com DH juvenil são portadores de alelos com aproximadamente 60 unidades CAG, no presente estudo há quatro

candidatos a apresentarem a doença juvenil. Se isso fosse confirmado, haveria 8,51% de indivíduos com Huntington juvenil no presente estudo, aproximando da frequência relatada por Andrew e colaboradores (1993) e Nahhas e colaboradores (2005).

Em alguns estudos a DH juvenil não apresentou diferença significativa entre a transmissão materna ou paterna (NAHHAS et al., 2005). Assim como outro estudo, realizado na ilha de Creta, com três indivíduos afetados relatou não encontrar diferença significativa entre transmissão materna e paterna do alelo expandido nos casos juvenis (KARTSAKI et al., 2006).

Em alguns casos, o alelo expandido responsável por causar a DH precocemente é um traço genético particular de cada família, em relação ao tamanho das expansões CAG que são transmitidas de uma geração à outra. Portanto, um caso de DH juvenil não é obrigatoriamente causado pela expansão *de novo* transmitida pelo seu pai ou mãe afetada, uma vez que, o alelo expandido responsável por causar a DH juvenil pode ter passado de forma estável através das gerações. Como por exemplo, a família investigada por este estudo representada pelo heredograma de número 017, na qual os indivíduos da família tiveram início da DH por volta de 20 a 30 anos de idade.

6.2.2 Região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CAG

Os alelos da região polimórfica CAG serviram de base para classificar cada indivíduo como afetado, ou portador de alelo mutável ou ainda como não afetado, de acordo com o número das unidades de repetição CAG de cada alelo. O perfil alélico da região polimórfica CAG responsável por causar a DH varia de acordo com a origem étnica de cada população.

O tamanho dos alelos CAG no gene *IT15*, está relacionado com a idade de início da doença (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE GROUP, 1993 apud ANDRESEN et al., 2007).

Os alelos intermediários encontrados no presente estudo dentre os indivíduos portadores de alelos anormais para DH (n= 47) representaram 4,3%, e todos eles tinham 27 cópias CAG. A porcentagem relatada por Raskin e colaboradores (2000) foi de 4% de portadores de alelos intermediários em uma

amostra de brasileiros afetados por DH, com descendência caucasiana. Esta frequência de 4% é maior que a normalmente encontrada na população caucasiana europeia normal para DH, que é de 0,93% (GOLDBERG; MCMURRAY; ZEISLER, 1995). Raskin e colaboradores (2000) também relataram a frequência de alelos intermediários em um grupo de indivíduos com descendência africana com a frequência de 4,7%, também maior que a relatada nas populações africanas normais para DH (WRIGHT; STILL; ABRAMSON, 1981).

Conforme vários relatos de casos sobre a DH é difícil definir o menor tamanho de repetições expandidas CAG responsável pela doença. Alguns autores consideram os alelos com expansões de 27 a 35 unidades CAG como alelos normais e não mutáveis (RASKIN et al., 2000; SILVA et al., 2000; MOROVVATI et al., 2008). Tais fatos geram a existência de uma confusão de informações em relação aos alelos responsáveis por causar a DH.

Dentre os estudos sobre a DH que realizaram também o diagnóstico diferencial para outras doenças semelhantes, o menor número de unidades CAG associado com o fenótipo DH foi relatado com 37 repetições, em um descendente europeu. A ausência da manifestação da doença ainda não foi documentada em nenhum indivíduo cujo alelo anormal tenha mais de 39 repetições CAG. E o maior número de unidades CAG já relatado foi o com 216 cópias (SENECA et al. 2004).

Em um estudo realizado na Croácia por Hećimović e colaboradores (2002), os alelos dos cromossomos normais variaram de 15 a 20 cópias CAG, sendo os mais predominantes com 17 cópias. E os alelos intermediários naquela região variaram de 30 a 34 unidades CAG. Os alelos mutados mais frequentes apresentaram 42, 43 e 44 cópias CAG, e em 85,8% da amostra as repetições CAG tinham menos de 50 unidades, sendo que o menor alelo encontrado responsável por causar a doença possuía 39 unidades.

No Japão, em 15 indivíduos afetados pela DH, os alelos variaram de 36 a 59 unidades CAG, com valor médio de 46 unidades e em alelos normais as repetições variaram de 8 a 31 cópias, com valor médio de 22 (MOROVVATI et al., 2008).

Estudos realizados na Turquia (AKBAS; ERGINEL-UNALTUNA, 2003) acharam o menor alelo responsável por causar a DH com 38 cópias CAG e o maior com 78, entre os 127 indivíduos estudados.

Outra pesquisa realizada na ilha de Creta, na qual 33 indivíduos foram estudados, o menor alelo causador da DH apresentava 36 cópias CAG e o maior 42 (KARTSAKI et al., 2006).

Na Índia, o menor alelo identificado por determinar a DH foi o de 41 repetições de trinucleotídeos CAG e o maior o de 56 unidades (PRAMANIKI et al., 2000).

Na Ilha de Formosa (Taiwan) um estudo realizado demonstrou que os alelos normais variaram de 10 a 29 repetições trinucleotídicas CAG, com valor médio de $17,75 \pm 1,95$, dentre os 53 indivíduos estudados. E os alelos expandidos variaram de 38 a 109, com valor médio de $47,36 \pm 9,98$ (WANG et al., 2004).

Na Espanha, os alelos mutados variaram de 37 a 86 unidades CAG (GARCIA-PLANELLAS et al., 2005).

Um estudo realizado no Brasil, em 2000 por Raskin e colaboradores, no qual foram investigadas somente as regiões polimórficas CAG de indivíduos com DH, os alelos normais variaram de 14 a 30 unidades com valor médio de 18 (mediana 17). E os alelos expandidos para DH variaram de 39 a 88 cópias, com valor médio de 46,7.

No Brasil, no mesmo ano, foi realizado outro estudo por Silva e colaboradores (2000) no qual os alelos normais para DH variaram de 18 a 26 unidades, com valor médio de 22 unidades. E os alelos expandidos variaram de 43 a 73 cópias, com valor médio de 50,3. Enquanto no presente estudo, os alelos normais dos indivíduos afetados variaram de 12 a 26 unidades de repetições CAG, com valor médio de $16,3 \pm 3,3$ e mediana de 15. Os alelos anormais para DH variaram de 27 a 58 cópias CAG, com valor médio de $41,7 \pm 5,3$ e mediana 41. Os alelos normais e anormais para DH tiveram tamanhos menores quando comparados aos estudos de Raskin e colaboradores (2000) e de Silva e colaboradores (2000).

Apesar de ambos os estudos terem sido realizados no Brasil, nota-se que os perfis alélicos encontrados são diferentes. Este fato pode ter ocorrido devido à investigação de indivíduos que não eram da mesma região, por exemplo, Silva e colaboradores (2000) investigou indivíduos de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná e o presente estudo investigou indivíduos do Estado do Rio de Janeiro e de Minas Gérias, especificamente a cidade de Ervália-MG. Talvez as diferenças regionais possam estar interferindo nesta variação alélica devido à imigração regional de indivíduos com origens étnicas diferentes. Além disso, fatores ambientais conforme Wexler e colaboradores (2004) podem interferir na variabilidade das manifestações

clínicas da DH. Conforme Silva e colaboradores (2000) existe uma correlação negativa ($r= 0,6$) significativa entre as unidades CAG e a idade de início ($p= 0,0001$).

A presente dissertação também mostra uma forte correlação negativa entre essas duas variáveis ($r= -0,84$) com um valor de $p<0,001$.

Na população da Turquia também existe uma correlação negativa ($r= 0,67$, valor de $p<0,001$) significativa entre as unidades CAG e a idade de início (AKBAS; ERGINEL-UNALTUNA, 2003). Assim como estudos realizados na Índia (PRAMANIK et al., 2000), na Ilha Formosa (Taiwan) (WANG et al., 2003), na Espanha (GARCIA-PLANELLAS et al., 2005), na Croácia (KARTSAKI et al., 2006) e em Creta (TZAGOURNISSAKIS et al., 1995) mostraram o mesmo padrão de correlação.

6.2.3 Região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CCG

As regiões CCG são regiões polimórficas indicadoras das diferentes ancestralidades genéticas do gene mutado da DH (MUGLIA et al., 1996). Pela primeira vez, de acordo com artigos já publicados, foram investigadas as regiões polimórficas CCG em indivíduos brasileiros.

A variabilidade do perfil alélico e de aspectos fenotípicos da DH em populações distintas já foi correlacionada com a frequência dos diferentes alelos CCG encontrados, o que evidenciou diferentes origens da mutação responsável pela DH (MOROVVATI et al., 2008).

Entretanto, em populações cuja prevalência da DH é menor em relação à Europa Ocidental, como por exemplo, no Japão, na China, e em populações de negros africanos, o alelo mais frequente da região polimórfica CCG possui 10 unidades (SQUITIERI et al., 1994 apud PRAMANIK et al., 2000).

Assim como a variedade do perfil alélico da região CAG, também existe uma diversidade no perfil alélico da região CCG. Cada população, com sua origem étnica diferente possui uma predominância de alelos CCG de tamanhos diferentes, normalmente variam de 6 a 12 unidades (SQUITIERI et al., 1994).

Em relação à região polimórfica CCG foi identificado pela primeira vez, em 2000, na Índia, um caso com apenas 4 unidades de repetições CCG em um indivíduo afetado pela DH (PRAMANIK et al., 2000). Na Croácia, o alelo CCG mais frequente possuía 7 unidades e em 26,7% da amostra estudada foram encontrados

alelos com 10 cópias. Regiões polimórficas com seis, oito e nove unidades não foram encontradas neste estudo da Croácia (HEĆIMOVIĆ et al., 2002).

No Japão o alelo mais frequente entre os indivíduos afetados foi o com 10 unidades CCG, e os alelos com 7 unidades foram encontrados com menor frequência (MOROVVATI et al., 2008).

Na ilha Formosa (Taiwan), em um estudo que investigou as regiões polimórficas CCG em 53 indivíduos, foram achados alelos que variaram de 6 a 11, com maior frequência o alelo com 7 repetições. Este estudo sugeriu que a região CCG não é um fator determinante para a idade de início da DH (WANG, et al., 2004).

Na Espanha, os alelos CCG identificados em 79 indivíduos afetados tinham 7 e 10 unidades, sendo que o alelo com 7 cópias, possuía maior frequência (GARCIA-PLANELLAS et al., 2005).

No Brasil, no presente estudo, as unidades de repetições de trinucleotídeos CCG variaram de 6 a 10, cujos alelos predominantes possuíam 7 cópias.

Acredita-se que a mutação encontrada no gene da DH tenha o efeito fundador na Europa Ocidental (HAYDEN, 1981 apud GARCIA-PLANELLAS et al., 2005), e este gene mutado tenha se espalhado para outras regiões por meio de emigrações. Na Europa Ocidental, há predominância de alelos CCG com 7 unidades. Portanto, de acordo com esta hipótese, sugere-se que estes genes passaram por novos eventos mutacionais independentes e resultaram na variação das unidades de repetições CAG e CCG (SQUITIERI et al., 1994 apud MOROVVATI et al., 2008).

Há controvérsias em relação à existência de correlação entre a região polimórfica CCG e a idade de início da DH. Conforme Panegyres e colaboradores (2006) a região polimórfica CCG não interfere na idade de início da DH, no desenvolvimento de disfunções neurológicas ou no tamanho das repetições CAG.

Entretanto, Chattopadhyay (2003) relata que a variação da região CCG é responsável em 3,1% dos casos de afetados pela variabilidade da idade de início da doença. Entretanto, um estudo realizado por Wang e colaboradores (2004) demonstrou não existir correlação entre a variação das unidades CCG e a idade de início.

Assim como estudos realizados na França com 77 indivíduos (VUILLAUME et al., 1998 apud ANDRESEN et al., 2007), na Itália com 126 investigados

(NOVELLETTO et al., 1994 apud ANDRESEN et al., 2007) e na Rússia com 57 indivíduos estudados (KUTUEV et al., 2004 apud ANDRESEN et al., 2007) não foi detectado uma correlação entre a região polimórfica CCG e a idade de início da doença.

O presente estudo não identificou correlação entre a região polimórfica CCG e a idade de início dos indivíduos afetados pela DH ($r= 0,06$). Porém, a investigação desta região foi de relevância para este estudo pois indicou pela primeira vez a origem genética do gene da DH em indivíduos brasileiros, não havendo qualquer publicação até o momento sobre o assunto.

6.3. VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Devido ao menor tamanho dos alelos normais em relação aos alelos expandidos, a enzima Taq polimerase apresenta um resultado de amplificação mais eficiente para substratos de tamanho menor, gerando então um aumento na concentração do produto de amplificação referentes aos alelos normais. Esta amplificação preferencial de alelos normais em relação aos alelos expandidos pode acarretar em resultados falsos negativos. Conhecendo este fato, foi imprescindível a comparação dos resultados das genotipagens dos alelos CAG (normais e expandidos) realizadas por este estudo com o resultado da análise dos mesmos alelos genotipados por outros laboratórios.

Das 12 amostras que tiveram seus resultados validados em outros laboratórios, apenas quatro tiveram leves diferenças que estatisticamente não eram significantes (variação de apenas uma unidade CAG) em alelos normais e expandidos. Esta diferença na unidade das repetições CAG não comprometeu a classificação dos alelos quanto a normais e anormais para DH.

Os resultados que tiveram esta variação, em comparação com os resultados encontrados no laboratório da UNIRIO, foram três do Laboratório de Neurologia Experimental e Aplicada da USP-Ribeirão Preto e um do laboratório H. Pardini - BH. Todos os resultados do laboratório do NUDIM-UENF foram exatamente iguais.

As pequenas diferenças discutidas acima podem ser explicadas devido ao diferente comportamento da DNA polimerase usada na reação de PCR em relação às condições utilizadas por cada protocolo desenvolvido em cada laboratório. Pois

esta enzima faz *slippage* ao replicar o DNA, e este escorregamento da DNA polimerase pode produzir fragmentos com discretas variações nos tamanhos em pares de bases dos amplicons (ELLES; MOUNTFORD, 2004).

Outra explicação para as discretas diferenças pode ser a presença de mutações na região de hibridação dos *primers* ou adjacentes a eles.

Além disso, se houver uma mutação na região de hibridação de um *primer*, ele pode não se hibridar com a região alvo do alelo e o resultado pode ser um falso negativo para o alelo em questão, simulando a presença de dois alelos em homozigose se a região alvo for amplificada normalmente no cromossomo homólogo.

É necessário que os estudos realizados sobre a doença de Huntington sejam feitos com cautela, para isso, devem fazer parte destes estudos diagnósticos diferenciais para casos fora da normalidade, teste de paternidade, principalmente para casos *de novo* e confirmação do diagnóstico molecular.

A existência de informações variadas sobre os tamanhos dos alelos e sobre os aspectos intergeracionais responsáveis por causar a DH podem comprometer um melhor entendimento da doença e seus mecanismos causadores.

6.4 ALELOS EM HOMOZIGOSE E SNP (*SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM*)

Os *primers* que determinam o tamanho das unidades de repetições CCG não são utilizados rotineiramente pela maior parte dos laboratórios que realizam o diagnóstico de Huntington no exterior, somente em caso de confirmação de alelos em homozigose. Entretanto, em alguns laboratórios a investigação tanto das unidades CAG como das CCG são realizadas independentemente quando os alelos estão em heterozigose ou homozigose (KALMAN et al., 2007).

No presente estudo um par de *primer* (HD1-6FAM/HD3) utilizado delimitava somente a região CAG, e outro par (HD1-6FAM/HD4) delimitava a região CAG + CCG. As duas reações de PCR foram feitas independentemente. Não foi feita uma reação de PCR que amplificasse apenas a região CCG. Portanto, os alelos em homozigose deverão ser reanalisados por um terceiro tipo de PCR com *primers* que delimitem apenas a região CCG.

A região do gene *IT15* é uma região composta por várias regiões polimórficas, como os *SNP*. Por exemplo no final das unidades de repetições CAG existe um grupo de trinucleotídeos CAA que se houver uma mutação pontual no segundo nucleotídeo, mudando A por G, aparece um trinucleotídeo CAG. Já foram identificadas duas famílias que tiveram esta mutação pontual. Este tipo de mutação, além de dificultar a hibridação dos *primers* neste local, gera uma instabilidade genética nesta região do gene podendo gerar um alelo intermediário (27 a 35 CAG) (SEMAKA et al., 2006).

6.5. ASPECTOS ÉTICOS

Por ser ainda uma doença sem cura, o diagnóstico molecular da DH pode causar sérias conseqüências psicológicas e sociais para os indivíduos afetados e grupo de risco, como por exemplo, o alto índice de suicídios destes pacientes.

A frequência de eventos catastróficos, como suicídio, tentativas de suicídio e hospitalizações psiquiátricas depois de receberem um resultado preditivo de teste diagnóstico da DH é de 1% (RASKIN et al., 2000).

Um estudo brasileiro achou um caso de Huntington juvenil, no qual um menino teve idade de início das manifestações clínicas aos nove anos e possuía 88 unidades CAG. Por isso, a testagem de crianças menores de 18 anos não pode ser totalmente proibida.

De acordo com as diretrizes internacionais, somente crianças com sintomas devem participar da pesquisa, apenas como confirmação diagnóstica. Os resultados dos testes preditivos de menores de 18 anos não foram entregues, pois as amostras foram coletadas apenas por desejo do indivíduo responsável pelo menor em participar da pesquisa.

De um modo geral, um dos princípios mais valorizados em bioética é o da autonomia, ou respeito ao indivíduo. Esse princípio deve ser respeitado sempre que possível nos casos de diagnóstico preditivo. O respeito à autonomia deve ser estendido, desde o ponto de vista moral, a menores, quando eles apresentam condições de compreender todos os aspectos dos testes e devem manifestar sua opinião com relação à sua realização.

Embora existam repercussões negativas em relação ao conhecimento do resultado pelos pacientes da DH, os benefícios individuais e coletivos se sobrepõem, seja através da diminuição da ansiedade ou da adequação do projeto de vida dos pacientes, seja para um avanço científico em caráter investigativo da doença tornando possível a criação de novas alternativas terapêuticas de controle.

O diagnóstico molecular destas doenças de expansão de trinucleotídeos é muitas vezes bastante controverso por questões éticas e por faltar um tratamento definitivo e específico. Entretanto, a possibilidade de diagnóstico oferece ao clínico e ao paciente e seus familiares o esclarecimento do possível prognóstico contribuindo também para o aconselhamento genético e planejamento familiar. Além disso, o diagnóstico molecular também oferece uma perspectiva para que possíveis estratégias terapêuticas possam ser adotadas em um futuro, à medida que estudos moleculares entre outros forem desvendando os processos celulares de degeneração e os tratamentos para as mesmas (SCHÖLS, et al., 2004).

Segundo Kessler (1994) existe uma auto-seleção para realização do teste para Doença de Huntington. Aqueles indivíduos que se acham menos capazes de lidar com o resultado positivo, ou incapazes de lidar com a ansiedade gerada pelo teste, devem optar por não realizá-lo.

É esperado que nos próximos anos sejam desenvolvidas estratégias preventivas e neuroprotetoras eficazes. Mas, atualmente, deve-se ter uma maior atenção em desenvolver abordagens racionais para minimizar os sintomas dos indivíduos portadores da DH e melhorar a qualidade de vida dos pacientes e seus cuidadores, começando por um esclarecimento melhor sobre a doença de Huntington e conscientização da população em geral, principalmente dos profissionais de saúde que lidam com esses casos.

Atualmente, deve-se ter uma maior atenção em desenvolver abordagens racionais para minimizar os sintomas dos indivíduos portadores da DH e melhorar a qualidade de vida dos pacientes e seus cuidadores, enquanto a cura não é descoberta.

7 CONCLUSÃO

O perfil alélico encontrado para a região polimórfica com repetições de trinucleotídeos CAG de indivíduos brasileiros portadores de alelos anormais para a DH mostrou uma variação de 27 a 58 unidades CAG;

Dos 48 indivíduos, portadores de alelos anormais para DH, dois possuem alelos intermediários (27 a 35 CAG) sem fenótipo da DH e 46 possuem alelos expandidos, dentre eles, 11 portadores de alelos com penetrância reduzida (36 a 39 CAG) e 35 com penetrância completa (maior que 39 CAG);

A média da idade de início dos pacientes foi de 41,7 anos;

A investigação intrageracional dos alelos CAG expandidos não mostrou diferença significativa entre os irmãos;

Na análise intergeracional, o número de expansões dos alelos expandidos foi maior na transmissão paterna, na qual não teve nenhum caso de contrações;

O perfil alélico da região polimórfica, com repetições de trinucleotídeos CCG, de indivíduos brasileiros, portadores de alelos anormais para a DH, variou de 6 a 10 unidades CCG;

Quanto maior o número de unidades de repetições CAG, menor a idade de início das manifestações clínicas da DH;

A região polimórfica CCG não interfere na idade de início da DH;

Na maior parte dos indivíduos afetados brasileiros, participantes desta pesquisa, a origem do gene mutado foi supostamente na Europa Ocidental devido à presença de 7 unidades CCG, o que é típico daquela região.

REFERÊNCIAS

AKBAS, F.; ERGINEL-UNALTUNA, N. DNA Testing for Huntington Disease in the Turkish Population. *European Neurology*, [S.l.], v. 50, p. 20-24, 2003.

ALBANO, L.M.J. *Genética Clínica e Molecular das Doenças neurológicas com mutações dinâmicas*. São Paulo: Manole, 2000, 185p.

AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, HUNTINGTON DISEASE GENETIC TESTING WORKING GROUP. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. *Am J Hum Genet*, [S.l.], v. 62, p. 1243-1247, 1998.

ANDRESEN, J.M.; GAYAN, J.; CHERNY, S.S.; BROCKLEBANK, D.; ALKORTA-ARANBURU, G.; ADDIS, E.A.; THE US-VENEZUELA COLLABORATIVE RESEARCH GROUP; CARDON, L.R.; HOUSMAN, D.E.; WEXLER, N.S. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *Journal of Medical Genetics*, [S.l.], v. 44, p. 44-50, 2007.

ANDREW, S.E.; GOLDBERG, Y.P.; KREMER, B.; TELENUS, H.; THEILMANN, J.; ADAN, S.; SQUITIERI, F.; LIN, B.; KALCHMAN, M.A.; GRAHAM, R.K.; HAYDEN, M.R. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics*, [S.l.], v. 4, aug 1993.

ANDRICH, J.; ARNING, L.; WIECZOREK, S.; KRAUS, P.H.; GOLD, R.; SAFT, C. Huntington's Disease as Caused by 34 CAG Repeats. *Movement Disorders*, [S.l.], v. 23, n. 6, p. 879-881, 2008.

ARANGO, M.; HOLBERT, S.; ZALA, D.; BROUILLET, E.; PEARSON, J.; RÉGULIER, E.; THAKUR, A.K.; AEBISCHER, P.; WETZEL, R.; DÉGLON, N.; NÉRI, C. CA150 Expression Delays Striatal Cell Death in Overexpression and Knock-In Conditions for Mutant Huntingtin Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, [S.l.], v. 26, p. 4649-4659, 2006.

ASHLEY, Jr.C.T.; WARREN, S.T. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu. Rev. Genetics*, [S.l.], v. 29, p. 703-728, 1995.

BARBOZA, N.H.; SILVA, A.F.A.; MACHADO, F.B.; MEDINA-ACOSTA, E. Instabilidade meiótica da expansão patogênica (CAG)_{n=38} no gene HTT em caso familiar de doença de Huntington. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos*, 2010.

BARSOTTINI, O.G.P.; FERRAZ, H.B. Síndromes coréicas. In: BORGES, D.R.; ROTHSCCHILD, H.A. (Org.). *Atualização terapêutica*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1083-1086.

BARSOTTINI, O.G.P. Doença de Huntington. O que é preciso saber? *Revista Einstein*. Educação Continuada em Saúde. UNIFESP, São Paulo, v. 5, p. 83-87, 2007.

BATES, G.P. The molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nature Publishing Group*, [S.I.], v. 6, p. 766-773, 2005.

BJORKQVIST, M.; PETERSEN, A.; BACOS, K.; ISAACS, J.; NORLEN, P.; GIL, J.; POPOVIC, N.; SUNDLER, F.; BATES, G.P.; TABRIZI, S.J.; BRUNDIN, P.; MULDER, H. Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, [S.I.], v. 15, p. 1713-1721, 2006.

BONELLI, R.M.; HOFMANN, P.A. Systematic review of the treatment studies in Huntington disease since 1990. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, [S.I.], v. 8, p. 141-153, 2007.

CAMPOS, P.A. Prevalência do vírus do papiloma humano - HPV em amostras de neoplasias epiteliais de revestimento da cavidade bucal: detecção pela reação em cadeia da polimerase e pelo real time PCR. 2005, Tese (Doutorado em Patologia). Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

CHATTOPADHYAY, B.; GHOSH, S.; GANGOPADHYAY, P.K.; DAS, S.K.; ROY, T.; SINHA, K.K.; JHA, D.K.; MUKHERJEE, S.C.; CHAKRABORTY, A.; SINGHAL, B.S.; BHATTACHARYA, A.K.; BHATTACHARYYA, N.P. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett*, [S.I.], v. 345, p. 93-96, 2003.

CENDES, I.L. Expansão de Poliglutaminas e doenças neurodegenerativas. *Ciência e Cultura*., [S.I.], v. 56, 2004.

CULJKOVIC, B.; RUZDIJIĆ, S.; RAKIĆ, L.; ROMAC, S. Improved polymerase chain reaction conditions for quick diagnostics of Huntington disease. *Brain Research Protocols*, [S.I.], v. 2, p. 44-46, 1997.

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*, [S.l.], p. 277, 1997.

DJOUSSE, L.; KNOWLTON, B.; CUPPLES, L.A.; MARDER, K.; SHOULSON, I.; MYERS, R.H. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology*, [S.l.], v. 59, p. 1325-1330, 2002.

ELLES, R.; MOUNTFORD, R. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*. Nova Jersey: Humana Press, 2004, 400 p.

FERNANDES, L. R.; SILVA, J.M. Estudo das expansões de poliglutaminas e doenças neurodegenerativas. In: 2ª jornada científica da UNEMAT, Barra do Bugres - Mato Grosso, 2009. Disponível em: http://www2.unemat.br/prppg/jornada2009/resumos_conic/Expandido_00202.pdf. Acesso em: 15 de jul 2010.

FOLSTEIN, S.; ABBOTT, M.H.; CHASE, G.A.; JENSEN, B.A.; FOLSTEIN, M.F. The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. *Psychol. Med.*, [S.l.], v. 13, p. 537-542, 1983.

GARCIA-PLANELLIS, J.; BURGUERA, J.A.; SOLIS, P.; MILLAN, J.M.; GINESTAR, D.; PALAU, F.; ESPINOS, C. Ancient Origin of the CAG Expansion Causing Huntington Disease in a Spanish Population. *Human Mutation*, [S.l.], v. 25, p. 453-459, 2005.

GEMAYEL, R.; VINCES, M.D.; LEGENDRE, M.; VERSTREPEN, K.J. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *The Annual Review of Genetics*, [S.l.], v. 44, p. 445-477, 2010.

GENOPRO. Disponível em: <<http://www.genopro.com>>. Acesso em: 20 jun 2010.

GIL, J.M.; REGO, A.C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, [S.l.], p. 2803-2820, 23 mai. 2008.

GOLDBERG, Y.P.; MCMURRAY, C.T.; ZEISLER, J. Increase instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum Mol Genet*, [S.l.], v. 4, p. 1911-1918, 1995.

GUSELLA, J.F.; WEXLER, N.S.; CONEALLY, P.M. A polymorphic DNA marker genetically linked to huntington's disease. *Nature*, [S.l.], v. 306, p. 234-7, 1983.

GUSELLA, J.F. *Huntington Disease*. In: Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, 2001. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acesso em: 12 de out. 2010.

HAN, I.; YOU, Y.; KORDOWER, J.H.; BRADY, S.T.; MORFINI, G.A. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type specific features. *Journal neurochem.*, [S.l.], v. 113, p. 1073-91, 2010.

HAYDEN, M.R. *Huntington's Disease*. In: STEFAN-M; PULST (ed). Neurogenetics, Oxford University Press, Nova Iorque, 2000, p. 265-275.

HEĆIMOVIĆ, S.; KLEPAC, N.; VLAŠIĆ, J.; VOJTA, A.; JANKO, D.; ŠKARPA-PRPIĆ, I.; CANKI-KLAIN, N.; MARKOVIĆ, D.; BOŽIKOV, J.; RELJA, M.; PAVELIĆ, K. Genetic Background of Huntington Disease in Croatia: Molecular Analysis of CAG, CCG, and $\Delta 2642$ (E2642del) Polymorphisms. *Human Mutation*, 2002. Disponível em: <[HTTP://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.9055/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.9055/pdf)>. Acesso em: 20 de jul 2010.

HO, L.W.; CARMICHAEL, J.; SWART, J.; WYTTENBACH, A.; RANKIN, J.; RUBINSZTEIN, D.C. The molecular biology of Huntington's disease. *Psychological Medicine*, [S.l.], p. 3-14, 2001.

HORMOZIAN, F.; HOUSHMAND, M.; SANATI, M.H.; GHIASVAND, R.; BANOIE, M.M. Molecular analysis of the (CAG) n repeat causing huntington's disease in 34 Iranian families. *Indian Journal of Human Genetics*, [S.l.], v. 10, 2004.

HUNTINGTON, G. On chorea. *Medical and Surgical Reporter*, [S.l.], p. 26, v. 317-21, 1872).

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em: 10 jan 2011.

JIN, Y.N.; JOHNSON, G.V.W. The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, [S.l.], v. 42, p. 199-205, 2010.

JOEL, D. Open interconnected model of basal ganglia-thalamocortical circuitry and its relevance to the clinical syndrome of Huntington's disease, *Mov. Disord.*, [S.I.], v. 16, p. 407-423, 2001.

JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res*, [S.I.], v. 19, p. 408, 1990.

KAIMEN-MACIEL, D.R.; MEDEIROS, M.; CLÍMACO, V.; KELIAN, G.R.; SILVA, L.S.T.; SOUZA, M.M.; RASKIN, S. Atrofia muscular bulbo espinhal recessiva ligada ao cromossomo x (doença de kennedy). *Arq. Neuropsiquiatr.*, [S.I.], v. 56, p. 639-645, 1998.

KALMAN, L.; JOHNSON, M.A.; BECK, J.; BERRY-KRAVIS, E.; BULLER, A.; CASEY, B.; FELDMAN, G.L.; HANDSFIELD, J.; JAKUPCIAK, J.P.; MARAGH, S.; MATTESON, K.; MURALIDHARAN, K.; RICHIE, K.L.; ROHLFS, E.M.; SCHAEFER, F.; SELLERS, T.; SPECTOR, E.; RICHARDS, C.S. Development of genomic reference materials for Huntington disease genetic testing. *Genet Med*, [S.I.], v. 9, p. 719-23, 2007.

KAPLAN, I.K.; SADOCK, B.J. *Compêndio de Psiquiatria*, 6 Ed., p. 857-858, 1993.

KARTSAKI, E.; SPANAKI, C.; TZAGOURNISSAKIS, M.; PETSAKOU, A.; MOSCHONAS, N.; MACDONALD, M.; PLAITAKIS, A. Late-onset and typical Huntington disease families from Crete have distinct genetic origins. *International Journal of Molecular Medicine*, [S.I.], v. 17, p. 335-346, 2006.

KASSUBEK, J.; GAUS, W.; LANDWEHRMEYER, G.B. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, [S.I.], v. 62, p. 523-524, 2004.

KEHOE, P.; WAVRANT, D.E.; VRIEZE, F.; CROOK, R.; WU, W.S.; HOLMANS, P.; FENTON, I.; SPURLOCK, G.; NORTON, N.; WILLIAMS, H.; WILLIAMS, N.; LOVESTONE, S.; PEREZ-TUR, J.; HUTTON, M.; CHARTIER-HARLIN, M.C.; SHEARS, S.; ROEHL, K.; BOOTH, J.; VOORST W.V.; RAMIC, D.; WILLIAMS, J.; GOATE, A.; HARDY, J.; OWEN, M.J. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, [S.I.], v. 8, p. 237-45, 1999.

KENNEY, C.; POWELL, S.; JANKOVIC, J. Autopsy-proven Huntington's disease with 29 trinucleotide repeats. *Movement Disorders*, [S.I.], v. 22, p. 127-30, 2007.

KESSLER, S. Predictive Testing for Huntington disease: a Psychologist's view. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, [S.I.], v. 54, p. 161-166, 1994.

KIM, S.U. Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases. *Brain Development*, [S.I.], v. 29, p. 193-201, 2007.

KONO, Y.; AGAWA, Y.; WATANABE, Y.; OHAMA, E.; NANBA, E.; NAKASHIMA, K. Analysis of the CAG repeat number in a patient with Huntington's disease. *Intern Med*, [S.I.], v. 38, p. 407-411, 1999.

KOVTUN, I.V.; WELCH, G.; GUTHRIE, H.D.; HAFNER, K.L.; MCMURRAY, C.T. CAG repeat lengths in X-and Ybearing sperm indicate that gender bias during transmission of Huntington's disease gene is determined in the embryo. *J. Biol. Chem*, [S.I.], v. 279, p. 9389-9391, 2004.

LA SPADA, A.R.; ROLING, D.B.; HARDING, A.E.; WANER, C.L.; SPIEGEL, R. Meiotic Stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Genet*, [S.I.], v. 2, p. 301-304, 1992.

LE, H.; FUNG, D.; TRENT, R. J. Applications of capillary electrophoresis in DNA mutation analysis of genetic disorders. *Journal of Clinical Pathology- Clinical Molecular Pathology Edition*, [S.I.], v. 50, p. 261-265, 1997.

LI, H.; WYMAN, T.; YU, Z.; LI, S.; LI, X. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum. Mol. Genet*, [S.I.], v. 12, p. 2021-2203, 2003.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 2 Ed., p. 8.21-8.24, 1982.

MARGOLIS, R.L.; ROSS, C.A. Diagnosis of Huntington Disease, *Clinical Chemistry*, [S.I.], v. 49, p. 1726-1732, 2003.

MARGOLIS, R.L.; HOLMES, S.E.; ROSENBLATT, A. Huntington's disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *Ann Neurol*, [S.I.], v. 56, p. 670-674, 2004.

MARKIANOS, M.; PANAS, M.; KALFAKIS, N.; VASSILOPOULOS, D. Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: relations to severity of illness and dementia. *Ann. Neurol.*, [S.l.], v. 57, p. 520-525, 2005.

METZGER, S.; BAUER, P.; TOMIUK, J.; LACCONE, F.; DIDONATO, S.; GELLERA, C.; MARIOTTI, C.; LANGE, H.W.; WEIRICH-SCHWAIGER, H.; WENNING, G.K.; SEPPI, K.; MELEGH, B.; HAVASI, V.; BALIKÓ, L.; WIECZOREK, S.; ZAREMBA, J.; HOFFMAN-ZACHARSKA, D.; SULEK, A.; BASAK, A.N.; SOYDAN, E.; ZIDOVSKA, J.; KEBRDLOVA, V.; PANDOLFO, M.; RIBAĪ, P.; KADASI, L.; KVASNICOVA, M.; WEBER, B.H.; KREUZ, F.; DOSE, M.; STUHRMANN, M.; RIESS, O. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Human Genetics*, [S.l.], v. 120, p. 285-92, 2006.

MUGLIA, M.; LEONE, O.; ANNESI, G.; GABRIELE, A.L.; IMBROGNO, E.; GRANDINETTI, C.; CONFORTI, F.L.; NASO, F.; BRANCATI, C. Nonisotopic method for accurate detection of (CAG)_n repeats causing Huntington disease. *Clinical Chemistry*, [S.l.], v. 42, p. 1601-1603, 1996.

MONTOYA, A.; PRICE, B.H.; MENEAR, M.; LEPAGE, M. Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *J. Psychiatry Neurosci.*, [S.l.], v. 31, p. 21-29, 2006.

MOROVVATI, S.; NAKAGAWA, M.B.; OSAME, M.B.; KARAMI, A. Analysis of CCG Repeats in Huntingtin Gene among HD Patients and Normal Populations in Japan. *Archives of Medical Research*, [S.l.], v. 39, p. 131-133, 2008.

NAHHAS, F.A.; GARBERN, J.; KRAJEWSKI, K.M.; ROA, B.B.; FELDMAN, G.L. Juvenile onset huntington disease resulting from a very large maternal expansion. *American Journal of Medical Genetics*, [S.l.], v. 137A, p. 328-331, 2005.

NASIR, J.; FLORESCO, S.B.; O'KUSHY, J.R.; DIEWERT, V.M.; RICHMAN, J.M.; ZEISLER, J.; BOROWSKI, A.; MARTH, J.D.; PHILLIPS, A.G.; AND HAYDEN, M.R. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, [S.l.], v. 81, p.

OLIGONUCLEOTIDE PROPERTIES CALCULATOR. Disponível em: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Acesso em 18 jun 2010.

OVERSON, T.L. System and method for the deconvolution of mixed dna profiles using a proportionately shared allele approach. *United States Army Medical Research And Materiel Command Mcmrzaj*, Fort Detrick, MD, US, p. 2-4, 2009. Disponível em: < <http://www.freshpatents.com/-dt20091029ptan20090270264.php>>. Acesso em 20 de dez de 2010.

ORR, H.T.; ZOGHBI, H.Y. Trinucleotide Repeat Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, [S.l.], v. 30, p. 575-621, 2007.

PANEGYRES, P.K.; BEILBY, J.; BULSARA, M.; TOUFEXIS, K.; WONG, C. A Study of Potential Interactive Genetic factors in Huntington's Disease. *Eur Neurol*, [S.l.], v. 55, p. 189-192, 2006.

PENNEY, J. B. Jr.; YOUNG, A. B.; SHOULSON, I.; STAROSTA-RUBENSTEIN, S.; SNODGRASS, S. R.; SANCHEZ-RAMOS, J.; RAMOS-ARROYO, M.; GOMEZ, F.; PENCHASZADEH, G.; ALVIR, J.; ESTEVES, J.; DEQUIROZ, I.; MARSOL, N.; MORENO, H.; CONNEALLY, P. M.; BONILLA, E.; WEXLER, N.S. Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Movement Disorders*, [S.l.], v. 5, p. 93-99, 1990.

PEARSON, C.E.; EDAMURA, K.N.; CLEARY, J.D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Review Genetics*, [S.l.], v. 6, p. 729-742, 2005.

PENNEY, J.B.Jr.; YOUNG, A.B.; SHOULSON, I.; STAROSTA-RUBENSTEIN, S.; SNODGRASS, S.R.; SANCHEZ-RAMOS, J.; RAMOS-ARROYO, B.; GOMEZ, F.; PENCHASZADEH, G.; ALVIR, J.; ESTEVES, J.; DEQUIROZ, I.; MARSOL, N.; MORENO, H.; CONNEALLY, P.N.; BONILLA, E.; WEXLER, N.S. Huntington's Disease in Venezuela: 7 Years of Follow-up on Symptomatic and Asymptomatic Individuals. *Movement Disorders*, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 93-99, 1990.

PRAMANIK, S.; BASU, P.; GANGOPADHAYA, P.K.; SINHA, K.K.; JHA, D.K.; SINHA, S.; DAS, S.K.; MAITY, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; ROYCHOUDHURI, S.; MAJUMDER, P.P.; BHATTACHARYYA, N.P. Analysis of CAG and CCG repeats in *Huntingtin* gene among HD patients and normal populations of India. *European Journal of Human Genetics*, [S.l.], v. 8, p. 678-682, 2000.

RASKIN, S.; ALLAN, N.; TEIVE, H. A. G.; CARDOSO, F.; HADDAD, M.S.; LEVI, G.; BOY, R. Jr J.L.; SOTOMAIOR, V.S.; JANZEN-DÜCK, M.; JARDIM, L.B.; FELLANDER, F.R.; ANDRADE, L.A.F. Huntington disease: Dna analysis in brazilian population. *Arq. Neuropsiquiatr.*, [S.l.], v. 58, p. 977-985, 2000.

RAVIKUMAR, B.; VACHER, C.; BERGER, Z.; DAVIES, J.E.; LUO, S.; OROZ, L.G.; SCARAVILLI, F.; EASTON, D.F.; DUDEN, R.; O'KANE, C.J.; RUBINSZTEIN, D.C. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, [S.l.], v. 36, p. 585-595, 2004.

RIGAMONTI, D.; BAUER, J.H.; DE-FRAJA, C.; CONTI, L.; SIIIONE, S.; SCIORATI, C.; CLEMENTI, E.; HACKAM, A.; HAYDEN, M.R.; LI, Y.; COOPER, J.K.; ROSS, C.A.; GOVONI, S.; VINCENZ, C.; CATTANEO, E. Wild-Type Huntingtin Protects from Apoptosis Upstream of Caspase-3. *The Journal of Neuroscience*, [S.l.], v. 20, p. 3705-3713, 2000.

RUOCCO, H.H.; BONILHA, L.; LI, L.M. Longitudinal analysis of regional grey matter of the expanded CAG repeat loss in Huntington disease: effects of the length. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, [S.l.], v. 79, p. 130-135, 2008.

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning. 2a Ed. USA: *Cold Spring Harbor Laboratory*, v. 2, p. 9.16-9.19, 1989.

SÁNCHEZ-PERNAUTE, R.; KUNIG, G.; DEL BARRIO ALBA, A.; DE YE' BENES, J.G.; VONTOBEL, P.; LEENDERS, K.L. Bradykinesia in early Huntington's disease. *Neurology*, [S.l.], v. 54, p. 119-125, 2000.

SAPP, E.; PENNEY, J.; YOUNG, A.; ARONIN, N.; VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, [S.l.], v. 58, p. 165-173, 1999.

SAVANI, A.A.; LOGIN, I.S. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology*, [S.l.], v. 68, p. 797, 2007.

SCHNEIDER, S.A.; WALKER, R. H.; BHATIA, K.P. The Huntington's disease-like syndromes: what to consider in patients with a negative Huntington's disease gene test. *Nature Clinical Practice Neurology.*, [S.l.], v. 3, p. 517-525, 2007.

SCHÖLS, L.; BAUER, P.; SCHMIDT, T.; SCHULTE, T.; RIESS, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, [S.l.], v. 3, p. 291-304, 2004.

SEMAKA, A.; CREIGHTON, S.; WARBY, S.; HAYDEN, M.R. Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet.*, [S.I.], v. 70, p. 283-294, 2006.

SENECA, S.; FAGNART, D.; KEYMOLEN, K.; LISSENS, W.; HASAERTS, D.; DEBULPAEP, S.; DESPRECHINS, B.; LIEBAERS, I.; DE MEIRLEIR, L. Early onset Huntington disease: A neuronal degeneration syndrome. *Eur J Pediatr.*, [S.I.], v. 163, p. 717-721, 2004.

SILVA, T.C.L.; SERRA, H.G.; BERTUZZO, C.S.; LOPES-CENDES, I. Molecular diagnosis of huntington disease in brazilian patients *Arq. Neuropsiquiatr.*, [S.I.], v. 58, p. 11-17, 2000.

SQUITIERI, F.; ANDREW, S.E.; GOLDBERG, Y.P.; KREMER, B.; SPENCE, N.; ZEISLER, J.; NICHOL, K.; THEILMANN, J.; GREENBERG, J.; GOTO, J. DNA Haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet.*, [S.I.], v. 12, p. 2103-2114, 1994.

SQUITIERI, F.; GELLERA, C.; CANNELLA, M.; MARIOTTI, C.; CISLAGHI, G.; RUBINSZTEIN, D.C.; ALMQVIST, E.W.; TURNER, D.; BACHOUD-LEÂVI, A-C.; SIMPSON, S.A.; DELATYCKI, M.; MAGLIONE, V.; HAYDEN, M.R.; DI DONATO, S. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain*, [S.I.], v. 126, p. 946-955, 2003.

STEVANIN, G.; FUJIGASAKI, H.; LEBRE, A-S. Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain*, [S.I.], v. 126, p. 1599-1603, 2003.

SUBRAMANIAM, S.; SIXT, K.M.; BARROW, R.; SNYDER, S.H. RHES, a Striatal Specific Protein, Mediates Mutant-Huntingtin Cytotoxicity. *Science*, [S.I.], v. 324, p. 1327-1330, 2009.

TELENIUS, H.; KREMER, B.; GOLDBERG, Y.P.; THEILMANN, J.; ANDREW, S.E.; ZEISLER, J.; ADAM, S.; GREENBERG, C.; IVES, E.J.; CLARKE, L.A. Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat Genet.*, [S.I.], v. 6, p. 409-414 1994.

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*, [S.I.], v. 72, p. 971-983, 1993.

TOMMASO, M.; DIFRUSCOLO, O.; SCIRUICCHIO, V.; SPECCHIO, N.; LIVREA, P. Two years follow-up of rivastigmine treatment in Huntington disease. *Clinical Neuropharmacology*, [S.I.], v. 30, p. 43-6, 2007.

TZAGOURNISSAKIS, M.; FESDJIAN, C.O.; SHASHIDHARAN, P.; PLAITAKIS, A. Stability of the Huntington disease (CAG)_n repeat in a late-onset form occurring on the Island of Creta. *Hum Mol Genet*, [S.I.], v. 4, p. 2239-2243, 1995.

VONSATTEL, J.P.; MYERS, R.H.; STEVENS, T.J.; FERRANTE, R.J.; BIRD, E.D.; RICHARDSON, E.P. Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Experimental Neurology*, [S.I.], v. 44, p. 559-577, 1985.

VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, [S.I.], v. 57, p. 369-384, 1998.

ZENG, W.; GILLIS, T.; HAKKY, M.; DJOUSSÉ, L.; MYERS, R.H.; MARCY, MACDONALD; GUSELLA, J.F. Genetic analysis of the *GRIK2* modifier effect in Huntington's disease. *BMC Neuroscience*, [S.I.], v. 7, p. 62, 2006.

ZUCCATO, C.; CIAMMOLA, A.; RIGAMONTI, D.; LEAVITT, B.R.; GOFFREDO, D.; CONTI, L.; MACDONALD, M.E.; FRIEDLANDER, R.M.; SILANI, V.; HAYDEN, M.R.; TIMMUSK, T.; SIPIONE, S.; CATTANEO, E. Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science*, [S.I.], v. 293, n. 5529, p. 493-498, 2001.

ZUCCATO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiology Review*, [S.I.], v. 90, p. 905-981, 2010.

WANG, C.K.; WUB, E Y.R.; HWUC, W.L.; CHENB, C.M.; ROB, L.S.; CHENB, S.T.; GWINN-HARDYG, K.; YANGC, C.C.; WUC, R.M.; CHENC, T.F.; WANGD, H.C.; CHAOF, M.C.; CHIUC, M.J.; LUC, C.J.; LEE-CHENA, G.J. DNA Haplotype Analysis of CAG Repeat in Taiwanese Huntington's Disease Patients *Eur. Neurol.*, [S.I.], v. 52, p. 96-100, 2004.

WARNER, J.P.; BARRON, L.H.; 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. *Molecular and Cellular Probes*, [S.I.], v. 7, p. 235-239, 1993.

WEXLER, N.S.; LORIMER, J.; PORTER, J.; GOMEZ, F.; MOSKOWITZ, C.; SHACKELL, E.; MARDER, K.; PENCHASZADEH, G.; ROBERTS, S.A.; GAYÁN, J.; BROCKLEBANK, D.; CHERNY, S.S.; CARDON, L.R.; GRAY, J.; DLOUHY, S.R.; WIKTORSKI, S.; HODES, M.E.; CONNEALLY, P.M.; PENNEY, J.B.; GUSELLA, J.; CHA, J.H.; IRIZARRY, M.; ROSAS, D.; HERSCH, S.; HOLLINGSWORTH, Z.; MACDONALD, M.; YOUNG, A.B.; ANDRESEN, J.M.; HOUSMAN, D.E.; YOUNG, M.M.; BONILLA, E.; STILLINGS, T.; NEGRETTE, A.; SNODGRASS, S.R.; MARTINEZ-JAURRIETA, M.D.; RAMOS-ARROYO, M.A.; BICKHAM, J.; RAMOS, J.S.; MARSHALL, F.; SHOULSON, I.; REY, G.J.; FEIGIN, A.; ARNHEIM, N.; ACEVEDO-CRUZ, A.; ACOSTA, L.; ALVIR, J.; FISCHBECK, K.; THOMPSON, L.M.; YOUNG, A.; DURE, L.; O'BRIEN, C.J.; PAULSEN, J.; BRICKMAN, A.; KRCH, D.; PEERY, S.; HOGARTH, P.; HIGGINS, D.S.Jr.; LANDWEHRMEYER, B. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA*, [S.I.], n. 10, vol. 101, 2004.

WHEELER, V.C.; PERSICHETTI, F.; MCNEIL, S. M.; MYSORE, J.S.; MYSORE, S.S.; MACDONALD, M.E.; MYERS, R.H.; GUSELLA, J.F.; WEXLER, N.S. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington's disease, *J. Med. Genet.*, [S.I.], v. 44, p. 695-701, 2007.

WILD, E.J.; TABRIZI, S.J. Huntington's disease phenocopy syndromes. *Current Opinion in Neurology*, [S.I.], v. 20, p. 681-687, 2007.
WILLIAMS, L. C.; HEGDE, M. R.; HERRERA, G.; STAPLETON, P.M.; LOVE, D.R. Comparative semi-automated analysis of (CAG) repeats in the Huntington disease gene: use of internal Standards. *Molecular and Cellular Probes*, [S.I.], v. 13, p. 283-289, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#HD>>. Acesso em: 02 jan 2011.

WRIGHT, H.H.; STILL, C.N.; ABRAMSON, R.K. Huntington's disease in black kindreds in South Carolina. *Arch Neurol*, v. 38, p. 412-414, 1981.

APÊNDICE A - Questionário de coleta de dados para os indivíduos que participaram do estudo

Checklist dos sujeitos da pesquisa sobre Doença de Huntington

Protocolo: _____

Nome: _____ Prontuário: _____

Filiação: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Data de nascimento: _____

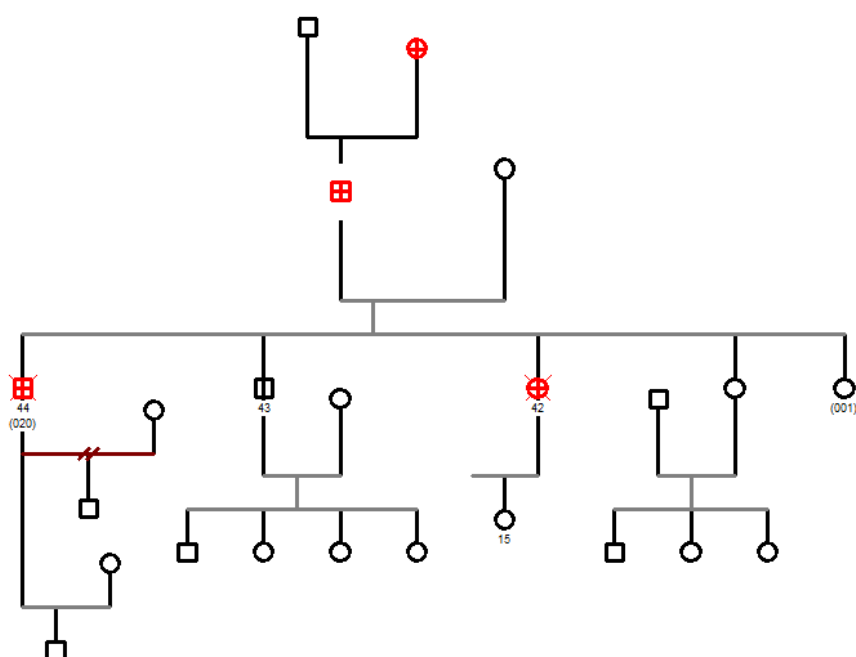
Naturalidade: _____

- Heredograma

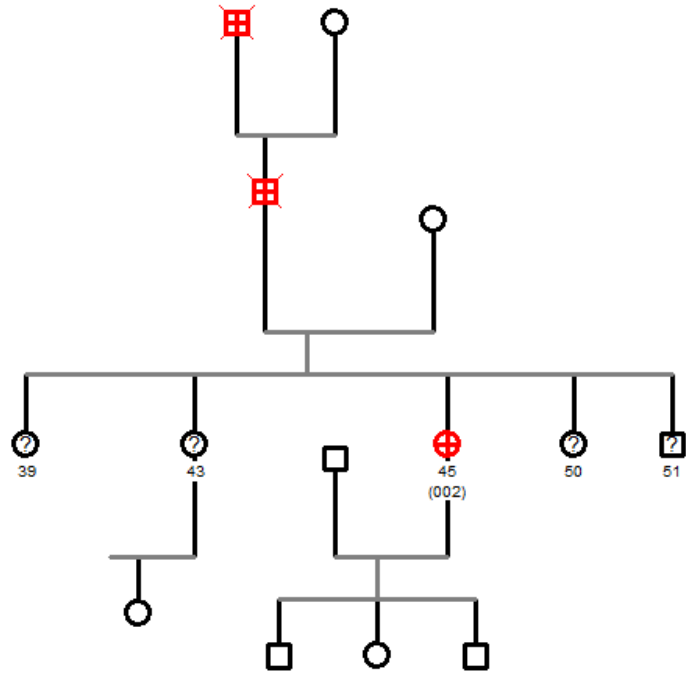
APÊNDICE B - Heredogramas dos objetos de estudo

Legenda dos heredogramas: Símbolo em forma de quadrado: indivíduo do sexo masculino; símbolo em forma de círculo: indivíduo do sexo feminino; símbolo em vermelho com dois traços em cruz: indivíduo afetado; símbolo com um traço na vertical: indivíduo relatado afetado; ponto de interrogação: indivíduo que não se sabe se é afetado ou não; número abaixo do símbolo: idade; número abaixo do símbolo entre parênteses: número da amostra que corresponde a cada objeto de estudo.

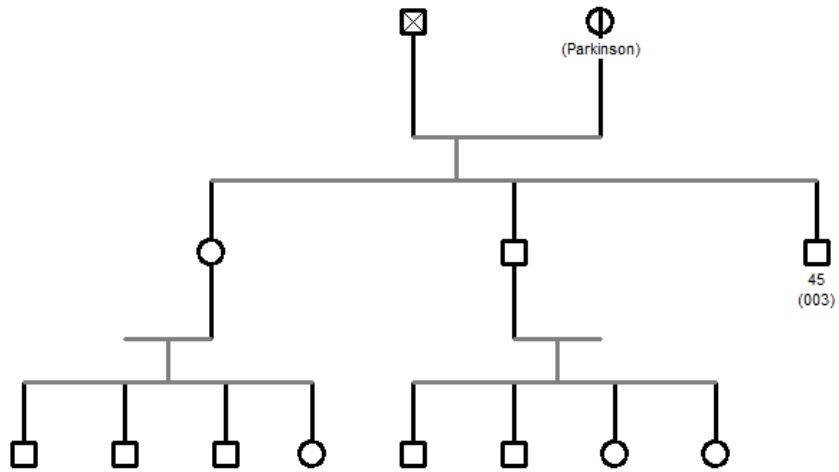
Heredograma Familiar 001: Pacientes 001 e 020



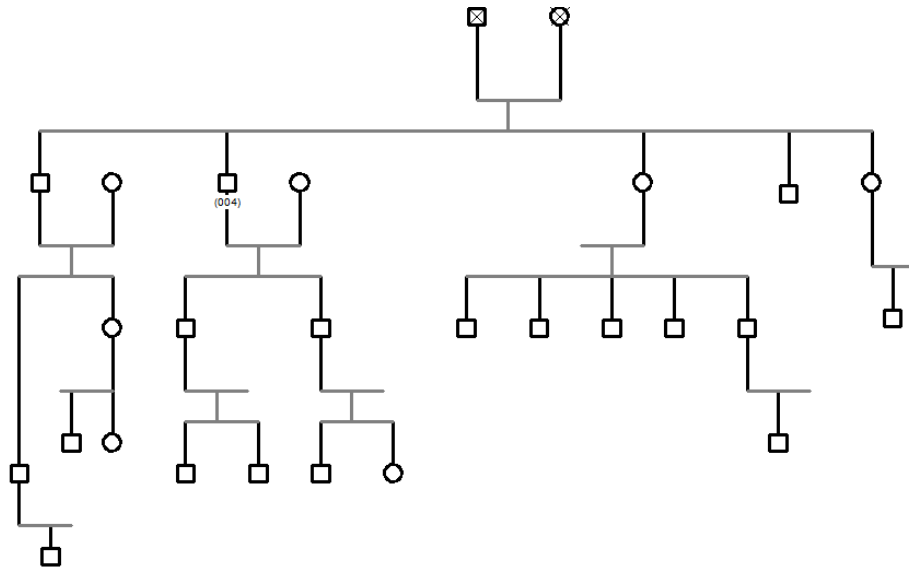
Heredograma Familiar 002: Paciente 002



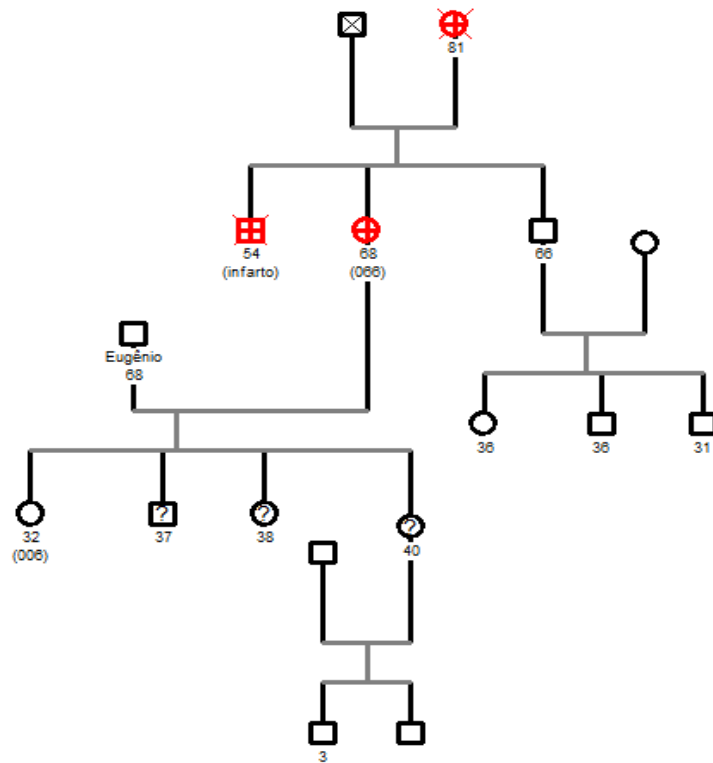
Heredograma Familiar 003: Paciente 003



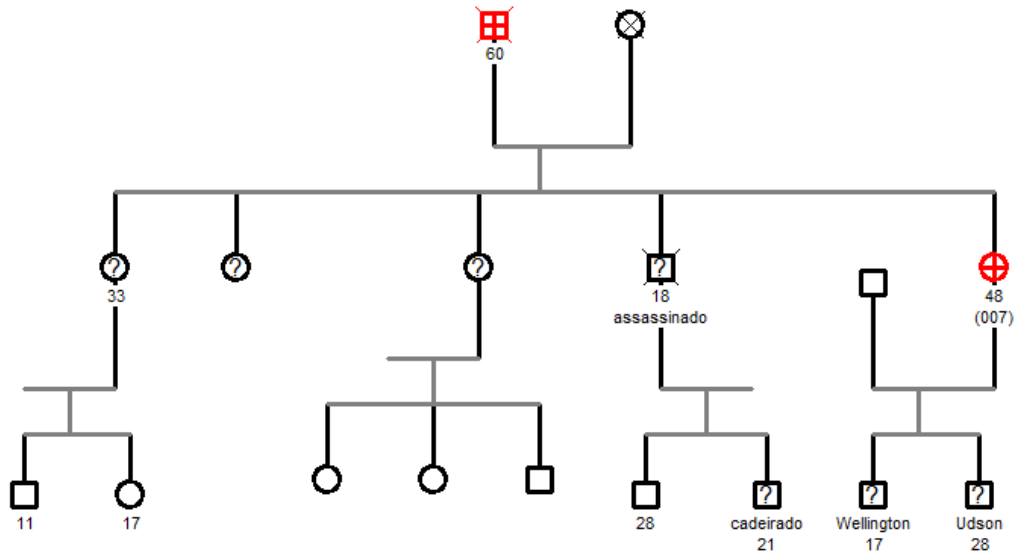
Heredograma Familiar 004: Paciente 004



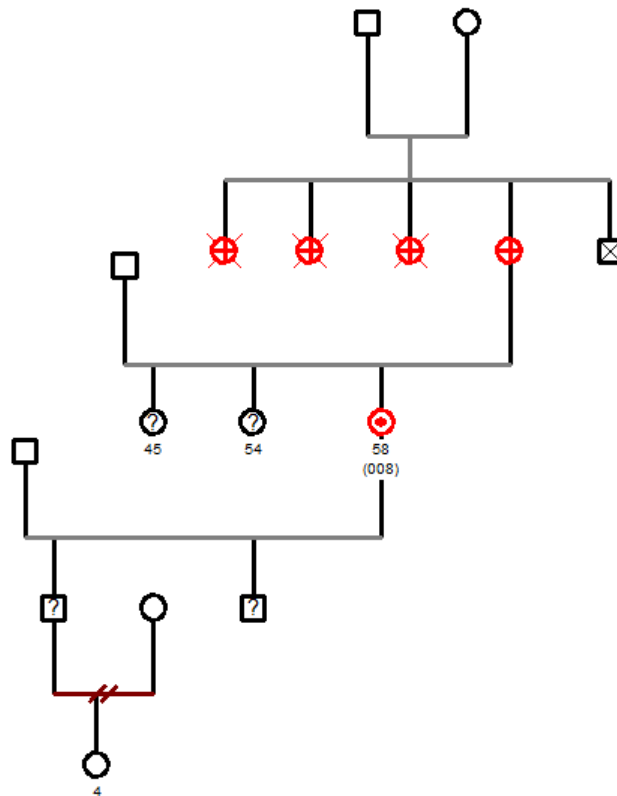
Heredograma Familiar 005: Pacientes 006 e 066



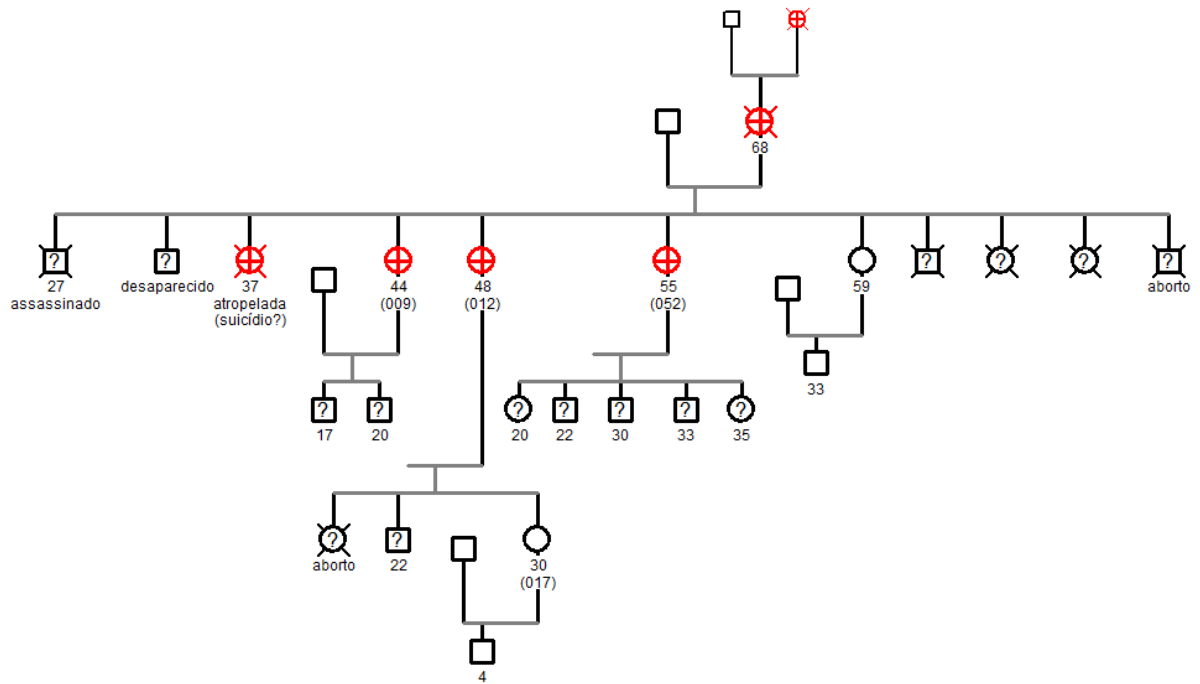
Heredograma Familiar 006: Paciente 007



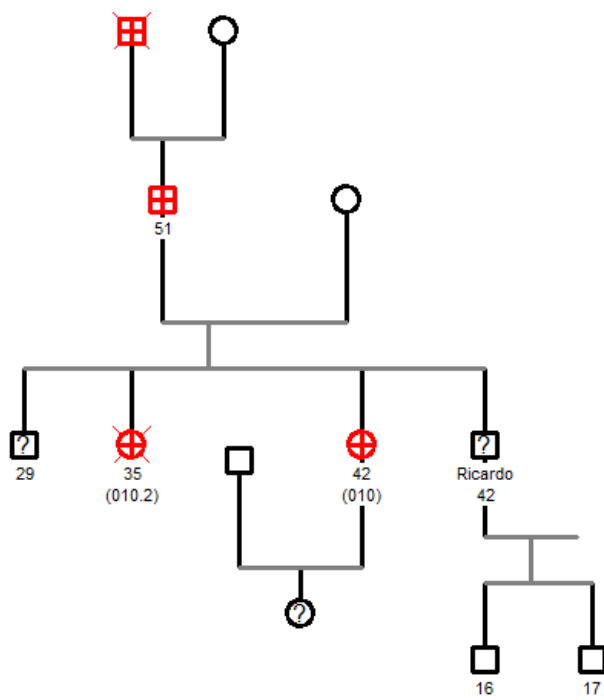
Heredograma Familiar 007: Paciente 008



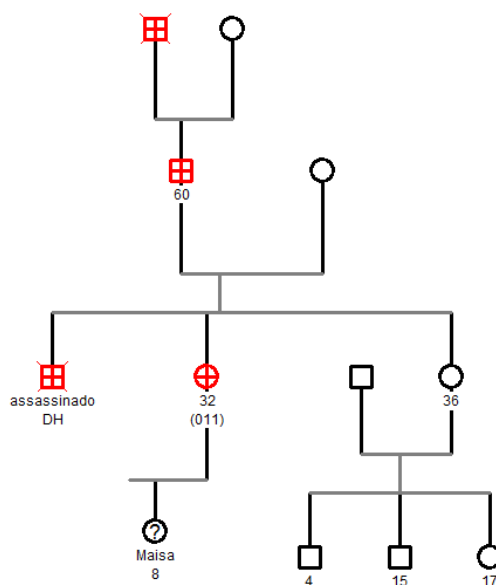
Heredograma Familiar 008: Pacientes 009, 012, 017 e 052



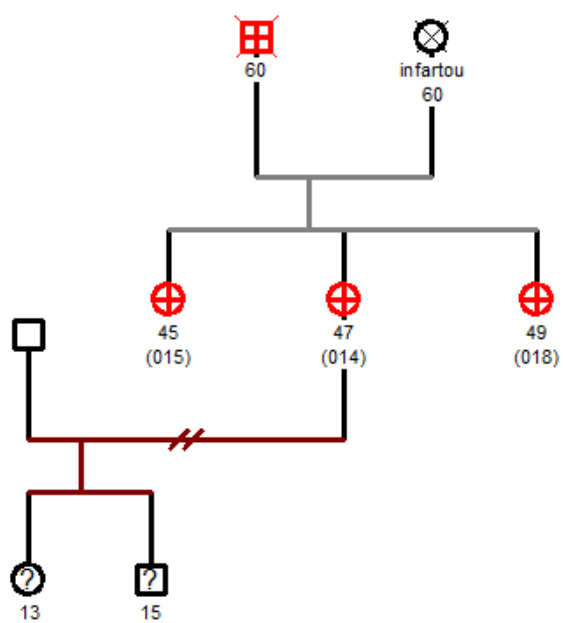
Heredograma Familiar 009: Paciente 010



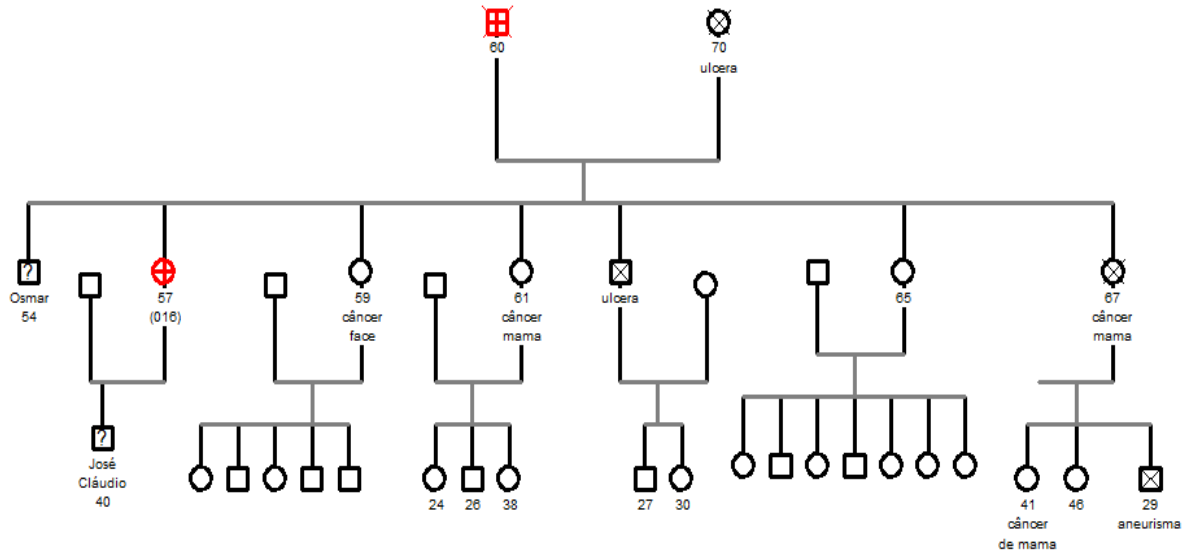
Heredograma Familiar 010: Paciente 011



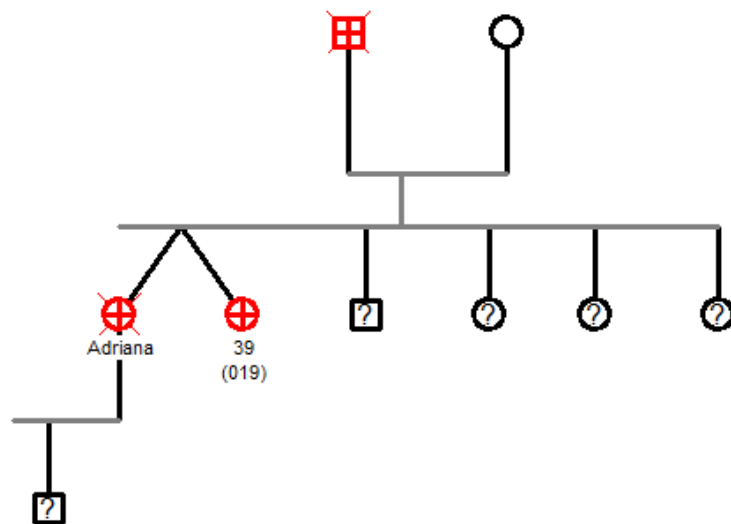
Heredograma Familiar 011: Pacientes 014, 015, 018



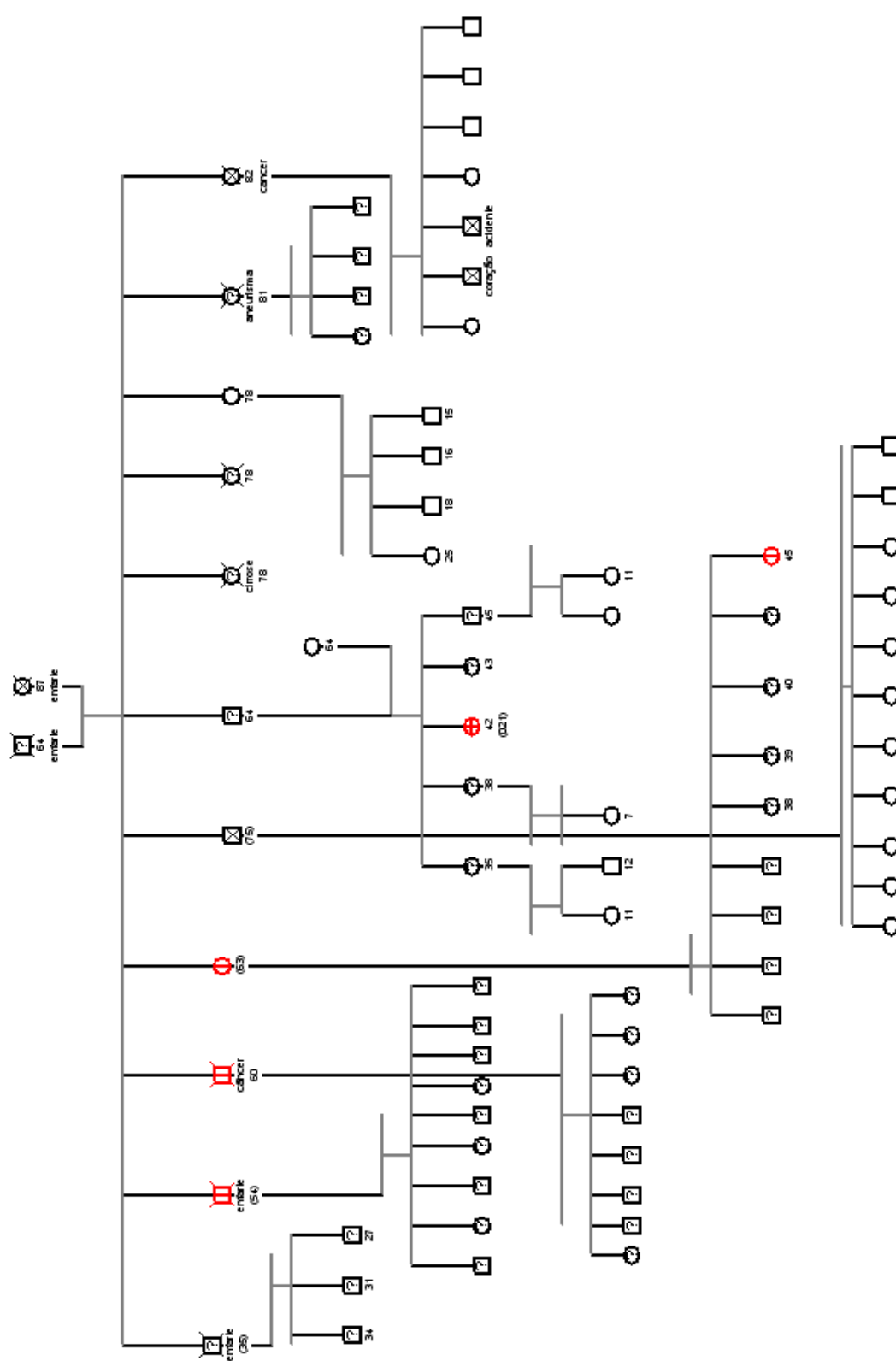
Heredograma Familiar 012: Paciente 016



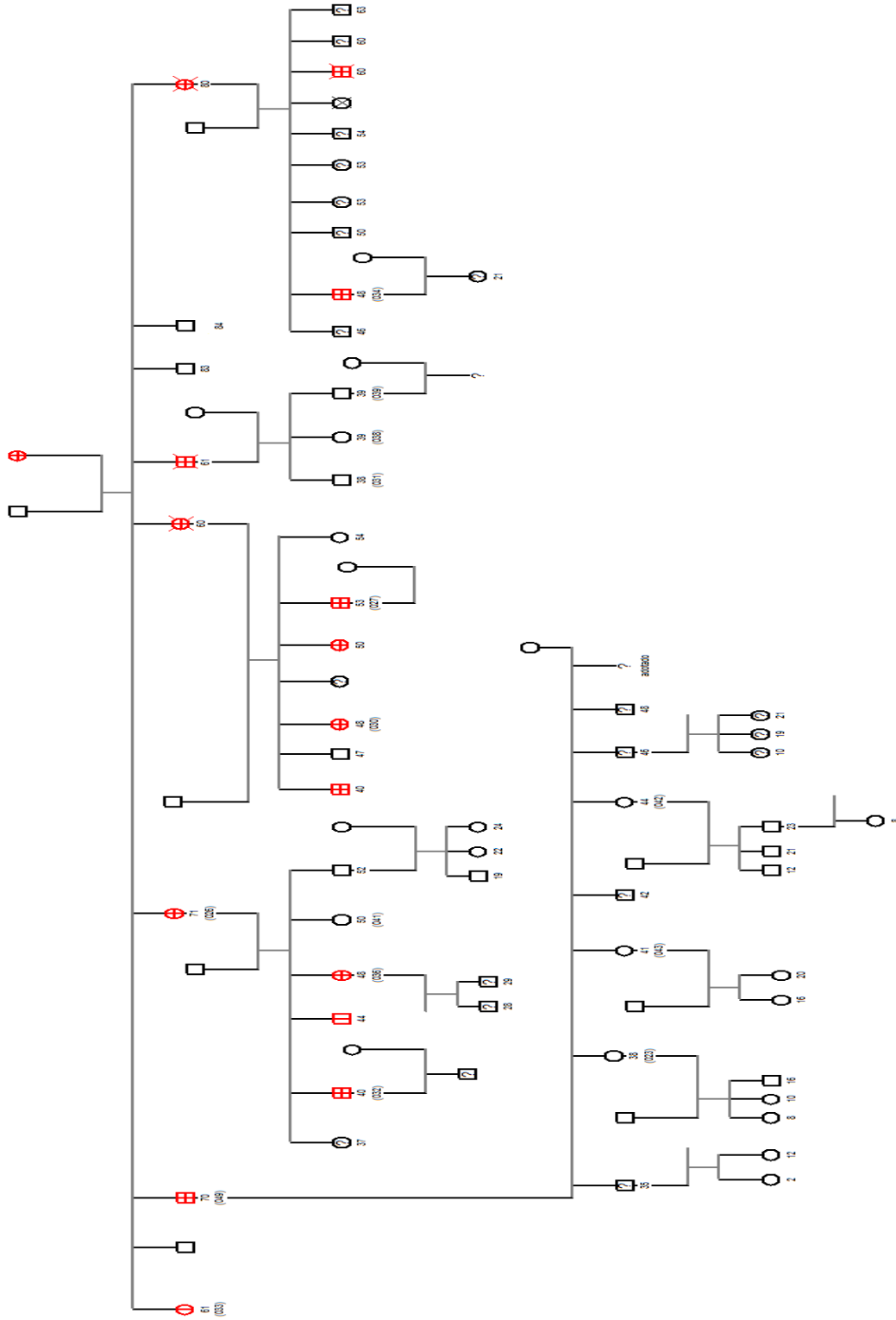
Heredograma Familiar 013: Paciente 019



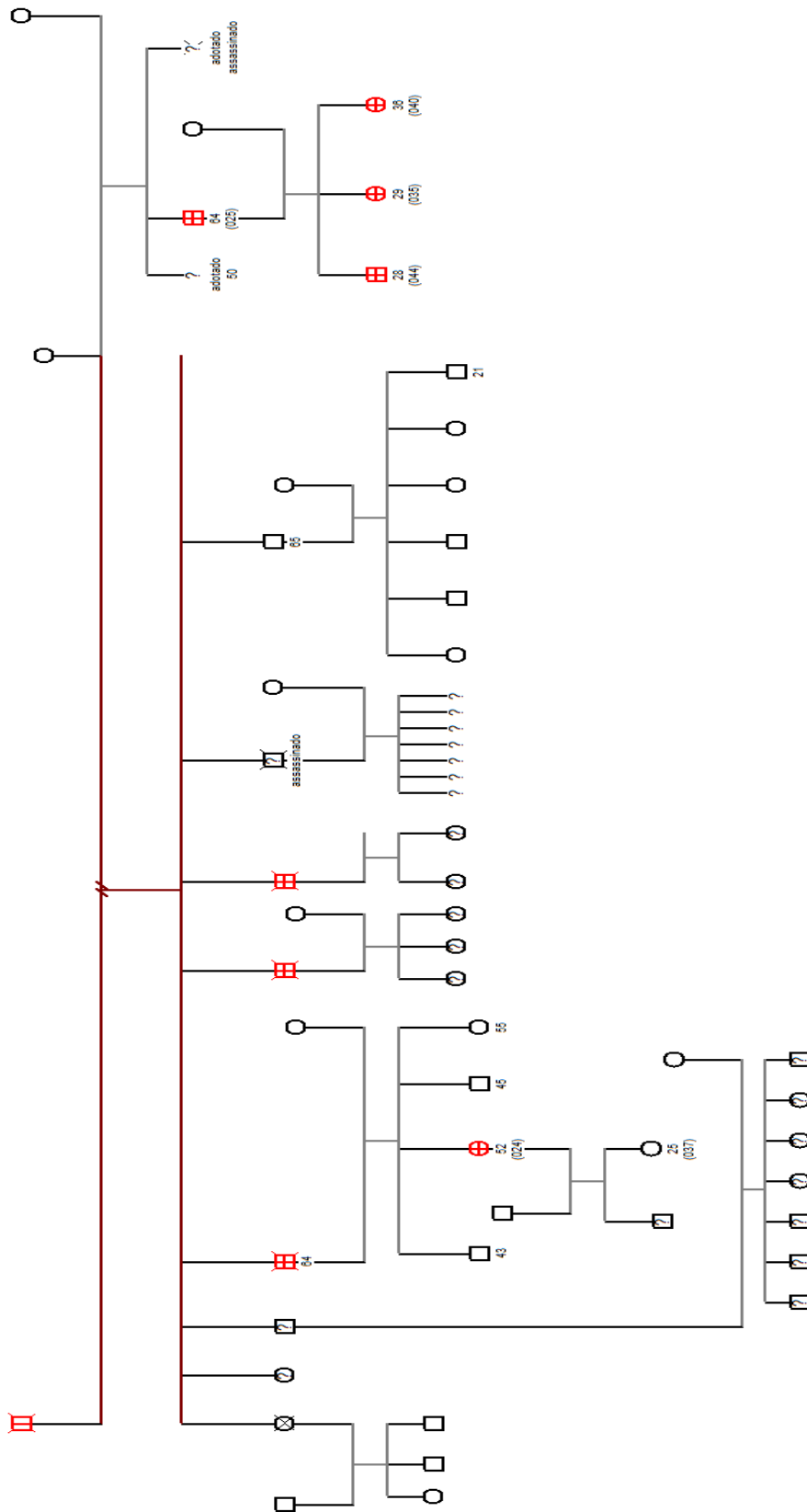
Heredograma Familiar 014: Paciente 021



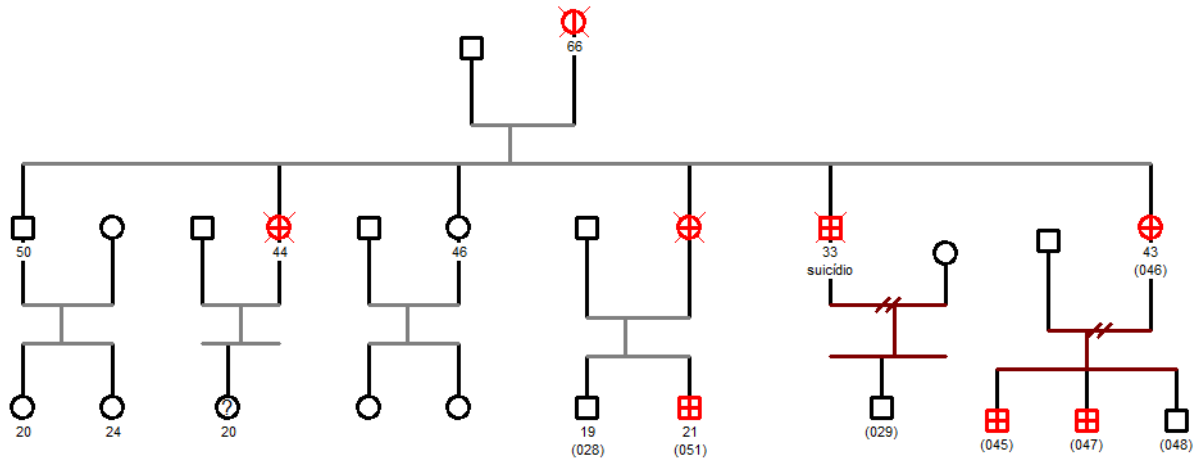
Heredograma Familiar 015: Pacientes 023, 026, 027, 030, 031, 032, 033, 034, 036, 038, 039, 041, 042, 043 e 049



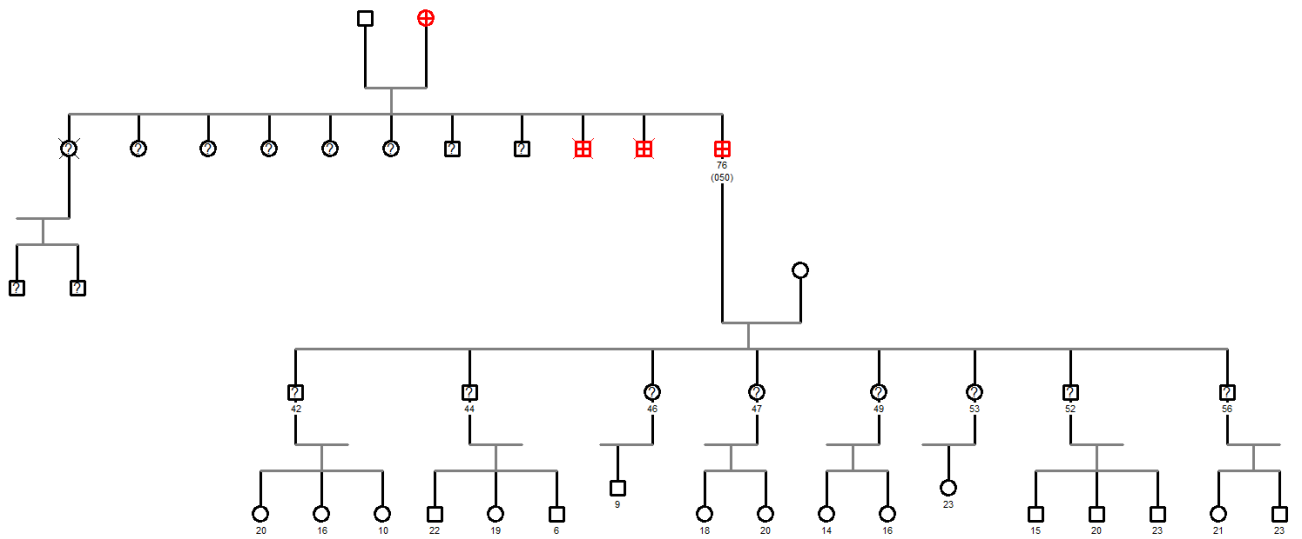
Heredograma Familiar 016: Pacientes 024, 025, 035, 037, 040, 044.



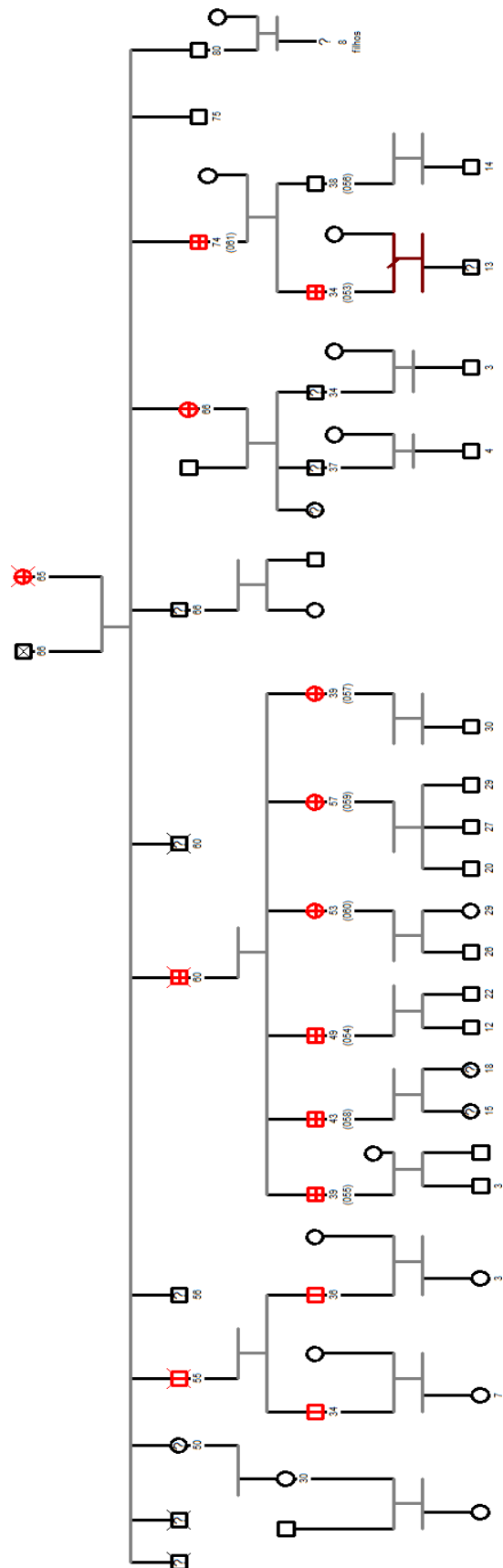
Heredograma Familiar 017: Pacientes 028, 029, 045, 046, 047, 048 e 051



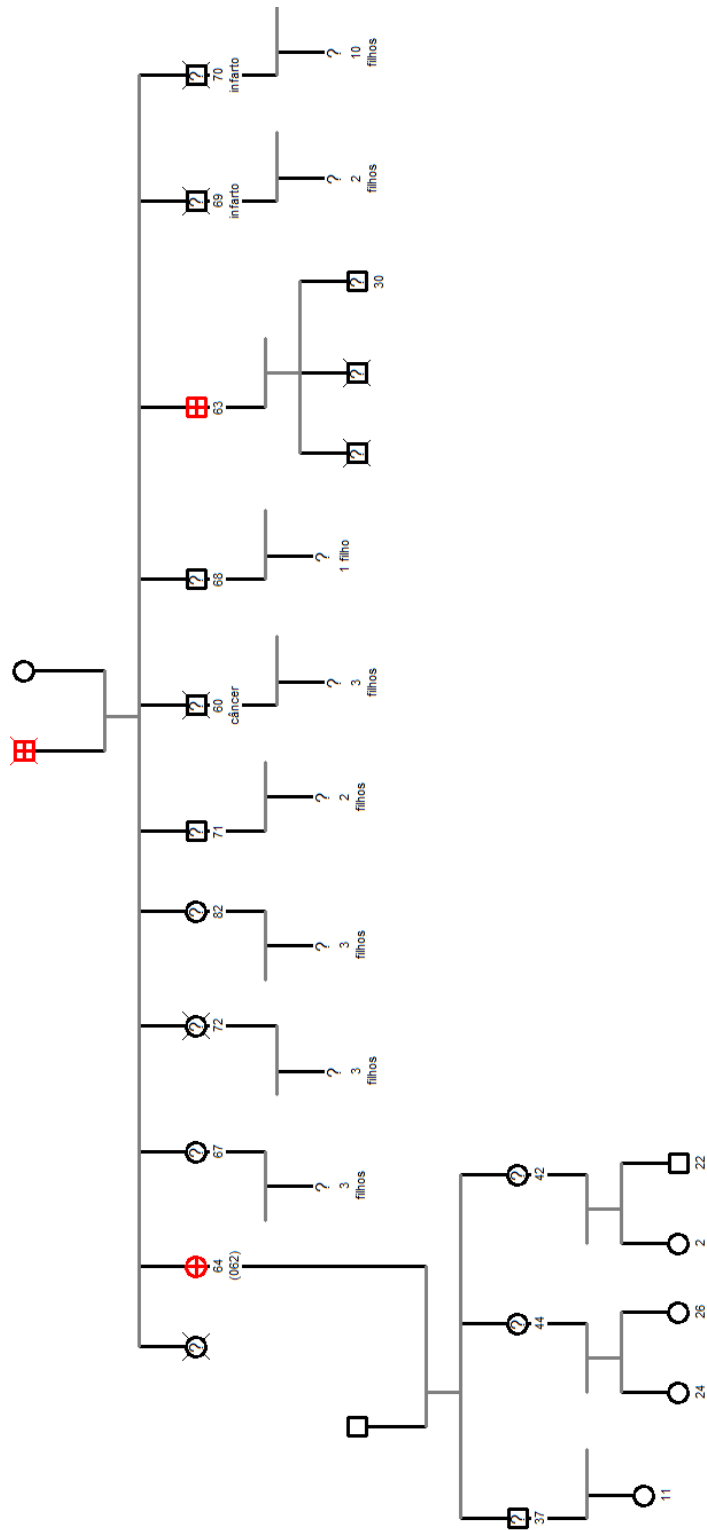
Heredograma Familiar 018: Paciente 050



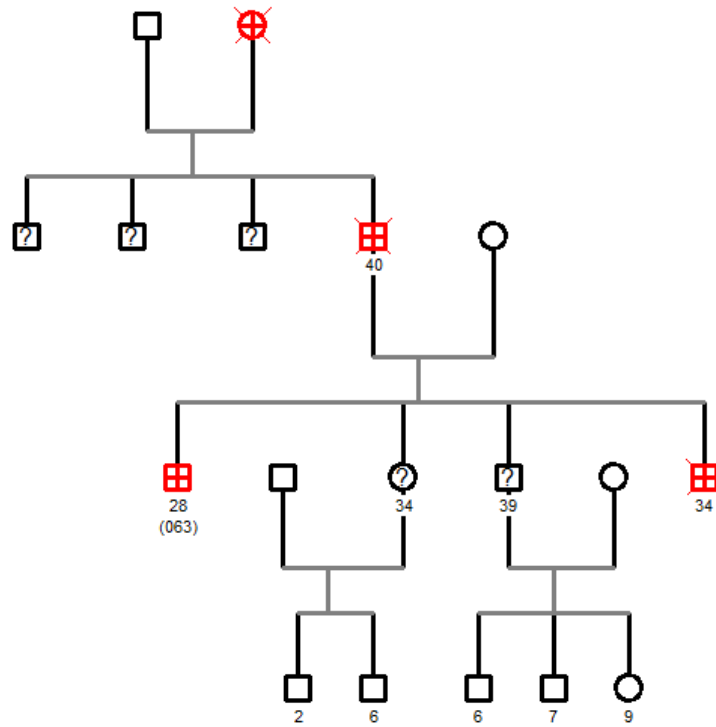
Heredograma Familiar 019: Pacientes 053, 054, 055, 056, 057, 058, 059, 060, 061



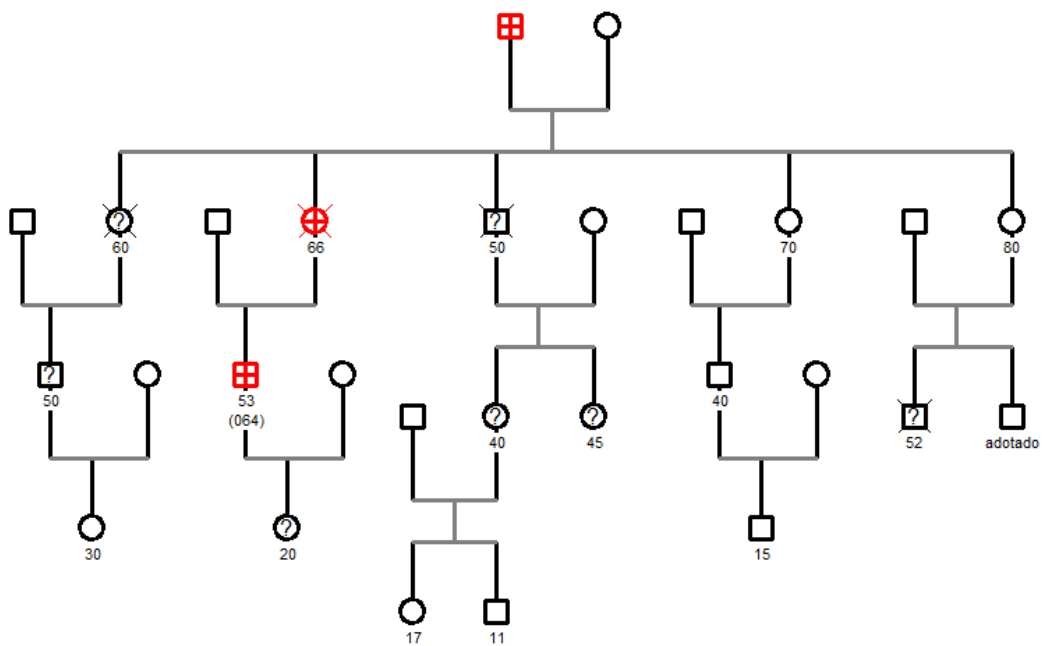
Heredograma Familiar 020: Paciente 062



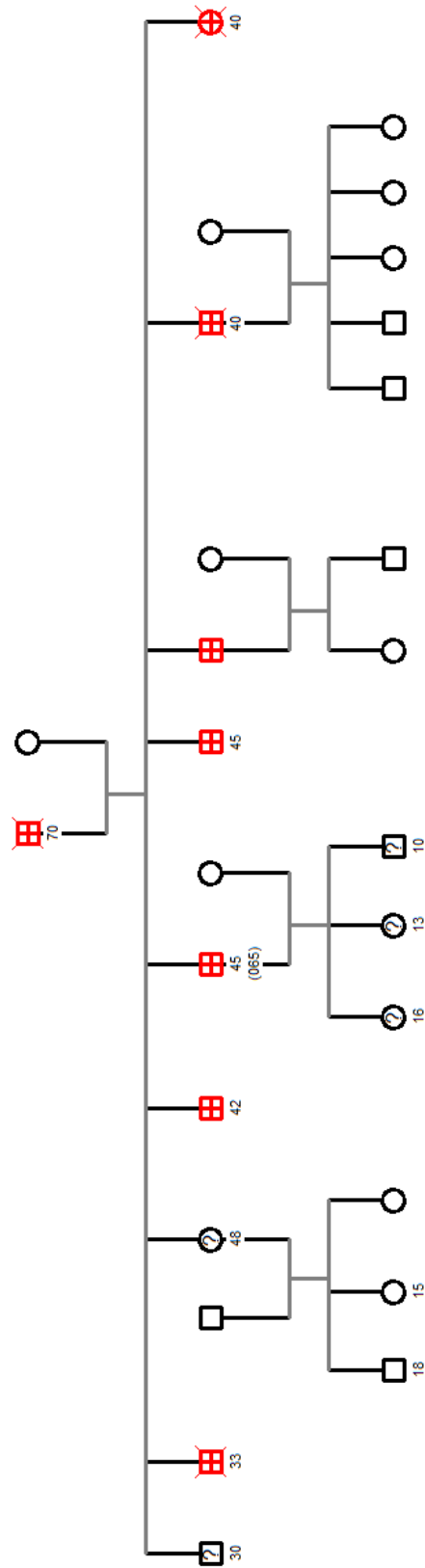
Heredograma Familiar 021: Paciente 063



Heredograma Familiar 022: Paciente 064



Heredograma Familiar 023: Paciente 065



APÊNDICE C - Artigo de revisão enviado para publicação

Intergenerational aspects and diverse genetic profiles of Huntington's Disease SistematicReview

Luciana de Andrade Agostinho^{1,2}, Catielly Ferreira Rocha^{1,2}, Eduardo Ribeiro Paradela^{1,2}, André Figueiredo^{1,2}, Simão Pedro Fernandes Pereira³, Regina Maria Papais Alvarenga², Suely Rodrigues dos Santos¹, Carmen Lúcia Antão Paiva^{1,2}.

¹Department of Genetics and Molecular Biology, Instituto Biomédico, ² Programa de Pós-Graduação em Neurologia (PPGNEURO), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, and ³FAMINAS, MG, Brazil

Abstract

Huntington disease (HD) is a rare progressive and fatal neurodegenerative disease, characterized by movement disorders, personality disorders and progressive dementia. The prevalence of HD varies according to ethnic origin, and there are different genetic profiles in each population. The prevalence is 5-10 per 100,000 individuals in Caucasian populations of Northern America and Western Europe. HD is associated with the expansion of CAG repetitive sequences in gene *IT15*. This gene, that is located on the short arm of chromosome 4, encodes for the protein huntingtin (HTT). In this study, we reviewed 16 articles about HD that report data of 2354 affected individuals from different regions of the world such as Venezuela, China, Croatia, Turkey, Germany, Italy, Brazil, Spain, Taiwan, India, Netherlands, Russia and the USA, with a focus on genetic profiles and intergenerational expansions or contractions of expanded alleles responsible for causing HD. It was held a discussion on the genetic characteristics of HD in different populations and atypical cases were also reported.

Keywords: Huntington disease, CAG repeats and intergenerational.

Corresponding author:

Dr. Carmen L A. Paiva

Department of Genetics and Molecular Biology,

Instituto Biomédico

UNIRIO

Rua Frei Caneca 94, Centro

Rio de Janeiro, RJ

Brazil

clapaiva1@gmail.com

phone: +55 (021) 25317921

Introduction

Huntington's disease is a rare progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by lack of motor coordination of voluntary and involuntary muscles, called choreic movements, personality disorders and progressive dementia¹. The genetic profiles of HD and intergenerational aspects of expanded allel transmission varied according to different regions of the world. The prevalence of HD varies with ethnical origin, there is 5-10 affected subjects per 100,000 in Caucasian populations of Northern America and Western Europe 2,3,4. Furthermore, the existence of atypical cases of HD reported in the literature favored the conduction of this systematic review. Therefore, this review aggregates these informations and highlights regional differences.

Huntington's disease occurs by an unstable mutation in gene *IT15* located on the short arm of chromosome 4 (4p16.3). A variation in the number of CAG repeats causes the mutation.

The mutable region is located in the first exon of *IT15* and encodes a polyglutamine N-terminal tail of a protein known as huntingtine⁵. Alleles that bear 27 or less copies of CAG, lead to normal phenotype. Intermediary alleles have 27 to 35 CAG repeats, are unstable and can be transmitted as an expanded allele to offspring; nevertheless, holders of this type of allele present a normal phenotype. Intermediary alleles are unstable and can be expanded mainly during male gametogenesis, whose number of cycles of division and duplication of genetic material is greater in relation to oogenesis. Hence, there is a greater probability of error in DNA replication during spermatogenesis, which increases the risk of mutations of alleles when inherited from the father⁶.

The alleles with 36 to 39 CAG units are those with reduced penetrance and can generate both a normal phenotype as well as rarer cases of HD. The alleles with 36 or more CAG copies show complete penetrance and determine, inevitably, at some stage of life, the phenotype in Huntington's disease.

Classical studies conducted on different geographical distribution of HD, along with several epidemiological studies suggest that the alleles responsible for causing the HD have originated from a single mutation in one ancestor in Western Europe, which spread to other regions of the world by emigration. Different haplotypes that include the CCG repeated region, which is adjacent to the CAG region, were identified in different populations and confirm the existence of mutations that had an independent and distinct origin from a single common HD ancestor⁷.

Patients of HD usually have the onset of clinical symptoms at the age of 35 to 55, although the disease can manifest after the age of 80, or much earlier in teenagers or children due to the phenomenon of anticipation. Approximately 10% of patients with Huntington have onset of clinical manifestations before the age of 20 and 5% before the age of 14. This phenomenon occurs in 20% of cases of HD. When the transmission of an expanded allele is maternal, an expansion longer than 20 units is very rare in the offspring^{8,9}.

The incidence of genetically confirmed cases of HD in individuals who have no family history of HD, and therefore, would be the first case of the family, is greater than 8%. These cases are caused by new sporadic expansions of intermediary alleles. Such unstable alleles favor the emergence of a mutated allele in the offspring, which determines the disease in the carriers⁹.

From the onset of initial symptoms the bearer has a progression to death within 15 to 20 years¹⁰. Variability in clinical symptoms and signs of the disease often requires a precise molecular investigation at genetic level for final diagnosis¹¹.

HD is an autosomal dominant genetic disease. Each child of an affected parent has a chance of 50% of developing the disease; therefore, only one allele inherited from the mother, or from the father, is able to determine the disease in the offspring. However, when in homozygosis, although very rare, two expanded alleles are responsible for the deterioration of the clinical picture of HD if compared to the affected individuals bearing only one expanded allele. Studies in this area suggest that homozygous expanded alleles did not diminish the age of onset of the disease, just change the severity of symptoms and their levels of progression.¹²

Material and Methods

A search was conducted in the internet at database sites which are related to Health Sciences, such as: Pubmed/Medline, Scielo and Bireme. The articles were selected from those encountered in the Genetics area in these three databanks. The keywords used were HUNTINGTON'S DISEASE, INTERGENERATIONAL and CAG repeats. Advanced search system was selected and the following inclusion criterion was chosen: period of publication from 2000 to 2010.

Results

We found a total of 980 scientific articles published from year 2000 to 2010, and 40 of them were selected accordingly to the chosen theme. Sixteen articles out of 40 were chosen because they reported, in deeper manner, aspects of molecular investigation of HD, and intergenerational analysis of expanded alleles in different regions of the world, as well as atypical cases of the disease (Table 1). In these papers, 2354 affected individuals were reported and they will be subject of discussion in this systematic review. Out of the selected articles, eight papers reported HD affected patients regarding to anticipation; and five articles discussed the cases of juvenile Huntington disease caused more often by paternal inheritance⁶.

Studies conducted in Venezuela, with 112 individuals affected by HD, confirmed the high instability of alleles when transmitted by the father due to the higher frequency of juvenile HD with paternal inheritance⁶. However, in two studies, cases of juvenile HD had not shown significant difference between HD inherited from the father or from the mother⁹.

In 2005, an experimental study carried out with two individuals showed a case of HD with anticipation which was inherited from the mother. She had 70 CAG repeats and she transmitted an allele containing 130 CAG copies⁹.

There were only two articles that reported data about Brazilian HD patients. They were a case-control study and a case study. These Brazilian articles reported the investigation of alleles containing CAG repeats at molecular level^{2,13}. One of these papers correlated genetic aspects of HD with age of onset of clinical symptoms². And the study of case-control type reported the investigation of 84 affected individuals. In the latter study, the shortest allele for HD found was that with 39 CAG repeats. It was also observed the inverse correlation between the onset of clinical manifestations and the size of the CAG repeated regions¹³. Furthermore, in the cases showing trinucleotide expansions, these expansions were longer when the mutated allele was inherited from the father, in comparison to maternal inheritance¹³.

In Turkey, a study showed that among 127 individuals, the shortest allele responsible for causing HD had 38 copies of CAG and the longest one had 78 CAG repeats¹⁴.

Another survey conducted in Crete Island and Greece, in which 33 individuals were studied, the shortest allele causing HD showed 36 copies of CAG and the longest 42 CAG copies¹⁵. In India, the shortest allele identified for HD presented 41 repetitions of CAG and the longest allele had 56 CAG repeats¹⁶.

Furthermore, it was in India where, for the first time, four CCG repeats were found adjacently to the CAG region in a HD affected subject. The CCG region next to CAG region has also been target of many molecular investigations. They are useful for confirming the results of the molecular diagnosis or for the genetic study of the ancestral origin of HD causative alleles. Most of the articles that analyzed the CCG regions reported that the genetic origin of the expanded alleles was in Western Europe^{7,17}.

An experimental study with 53 patients suggested that the size of CCG repeats is not a determining factor for the age of onset of HD¹⁸. On the other hand, in a study with 980 individuals in European countries, there is strong evidence of involvement of CAG and CCG repeats in the determination of age of onset of HD¹⁹.

Among the individuals studied in Brazil, the smallest allele responsible for HD had 39 CAG repeats and the longest 88 CAG repeats^{13,2}. In 2008, an atypical case was reported in Germany of a patient who was affected by the disease and showed an allele with only 34 copies of CAG²⁰.

Discussion

HD is a disease of adults. Juvenile cases are rare (approximately 10% of total cases) and the majority of the affected individuals inherited the expanded alleles from the father and, rarely, from the mother⁹. Unlikely, another study showed no significant difference between the numbers of cases of juvenile HD caused by paternal or by maternal inheritance². Usually, a maternal allele does not expand more than 20 copies of CAG^{21,9}, however, in 2005, it was reported a case of an affected mother who transmitted a double size allele to her daughter⁹. The alleles with less than 26 CAG repeats are not associated with the phenotype of HD and do not show genetic instability.

There are two case reports in the literature of individuals clinically diagnosed as affected by HD who had intermediary alleles. In one article an individual who had 29 CAG repeats was diagnosed with HD by *post-mortem* autopsy²². There is another article that reports the case of an individual who presented cortical atrophy, disorder of movement and cognitive impairment presenting only 34 copies of CAG²⁰. However both studies do not mention the investigation of Huntington-like disease or other diseases showing similar symptoms to HD.

Alleles showing intermediate number of CAG repeats are unstable; however, the holders of this type of allele present a normal phenotype. The alleles with reduced penetrance, called pre-mutational alleles, can generate not only a normal allele but also an abnormal one, which leads to HD phenotype, despite the low risk of this event.

Among the studies on HD that differential diagnosis for other similar diseases was performed, the smallest number of CAG units associated with HD phenotype was that of 37 repetitions in an European descendant. The absence of HD clinical symptoms has not been documented in any individual whose allele had more than 39 CAG repeats, yet.

The alleles with seven CCG units were found in 95% of the cases. This may mean that those alleles had a genetic origin in Western Europe, where it is believed the founder effect of Huntington's disease has occurred. On the other hand, alleles containing 10 CCG units may be caused by independent mutations with recent genetic origins in other geographical regions. Usually the alleles possess seven or ten CCG repeats, with the exception of the case, reported by PRAMANIK et al., in which four CCG units were identified¹⁶.

It is difficult to define the smallest size of expanded CAG repeats responsible for HD phenotype, since there are differences among individuals and populations. Variability in clinical presentation of signs and symptoms of the disease often requires caution for a definite diagnosis.

Therefore, for part of the clinical investigation, the following procedures must be taken into account: differential diagnosis for atypical cases must be done as well as paternity tests for confirming the origin of the alleles mainly of new cases in the family. This review shows that intergenerational aspects and genetic profiles of HD vary conspicuously among the different regions of the world.

Funding

Financial support: CAPES/ PROAP, FINEP, PROPG Neuro and Department of Genetics and Molecular Biology, UNIRIO.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chandler JH, Reed TE, DeLong, RN: Huntington's chorea in Michigan. Clinical observations. *Neurology* 1960; 10:148-153.
2. Silva TCL, Serra HG, Bertuzzo CS: Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients *Arq. Neuropsiquiatr* 2000;58:11-17.
3. Hormozian F, Houshmand M, Sanati MH *et al*: Molecular analysis of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 34 Iranian families. *Indian Journal of Human Genetics* 2004;10.
4. Gil JM, Rego AC: Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* 2008;2803-2820.
5. Wexler NS, Bonilla E, Young AB *et al*: Huntington's disease in Venezuela and gene linkage. *Cytogenet. Cell Genet.* 1984;37:605.
6. Wheeler, VC, Persichetti F, Mcneil SM, *et al*: Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington's disease, *J. Med. Genet.* 2007;44:695–701.
7. Garcia-Planells J, Burguera JA, Solis P *et al*: Ancient Origin of the CAG Expansion Causing Huntington Disease in a Spanish Population. *Human Mutation* 2005;25:453-459.
8. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B *et al*: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics* 1993;4.
9. Nahhas FA, Garbern J, Krajewski KM *et al*: Juvenile onset huntington disease resulting from a very large maternal expansion. *American Journal of Medical Genetics* 2005;137A:328–331.
10. Ho LW, Carmichael J, Swart J, *et al*: The molecular biology of Huntington's disease. *Psychological Medicine* 2001; 3–14.
11. Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre A-S: Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain* 2003;126:1599–1603.
12. Squitieri F, Gellera C, Cannella M *et al*: Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 2003;126:946-955.
13. Raskin S, Allan N, Teive HAG *et al*: Huntington disease: Dna analysis in brazilian population. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2000;58:977-985.
14. Akbas F, Erginel-Unaltuna N: DNA Testing for Huntington Disease in the Turkish Population. *European Neurology* 2003;50:20–24.
15. Kartsaki E, Spanaki C, Tzagournissakis M. *et al*: A. Late-onset and typical Huntington disease families from Crete have distinct genetic origins. *International journal of molecular medicine* 2006;17:335-346.
16. Pramanik S, Basu P, Gangopa HDaya PK *et al*: Analysis of CAG and CCG repeats in Huntingtingene among HD patients and normal populations of India. *European Journal of Human Genetics* 2000;8:678–682.

17. Hećimović S, Klepac N, Vlašić J *et al*: Genetic Background of Huntington Disease in Croatia: Molecular Analysis of CAG, CCG, and $\Delta 2642$ (E2642del) Polymorphisms. *Human Mutation* 2002.
18. Wang, CK, Wub EYR, Hwuc WL *et al*: DNA Haplotype Analysis of CAG Repeat in Taiwanese Huntington's Disease Patients. *Eur. Neurol.* 2004;52:96–100.
19. Metzger S, Bauer P, Tomiuk J *et al*: Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Human Genetics* 2006;120:285-92.
20. Andrich J, Arning L, Wieczorek S *et al*: Huntington's Disease as Caused by 34 CAG Repeats. *Movement Disorders* 2008;6:879–881.
21. Kenney C, Jankovic: Autopsy-proven Huntington's disease with 29 trinucleotide repeats. *Movement Disorders* 2007;22:127-30.
22. Andresen JM, Gayan J, Cherny SS *et al*: Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *Journal of Medical Genetics* 2007; 44:44–50.
23. Tang Y, Wang Y, Yang P *et al*: Intergeneration CAG Expansion and Contraction in a Chinese HD Family. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 2006;141B:242–244.
24. Siesling S, Vegter-Van De Vlis M, Losekoot M *et al*: Family history and DNA analysis in patients with suspected Huntington's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2000;69:54–59.
25. Kutuev IA, Khusainova RI, Khidiyatova IM *et al*: Analysis of the IT15 Gene in Huntington's Disease Families. *Russian Journal of Genetics* 2004;40:919–925.

Table 1: Showing the selected articles of this review about diverse genetic profiles and intergenerational transmission of HD in different regions of world

Authors/ years	Experimental mode	Study design	Number of individuals investigated	Methods	Objective	Place of study	Results
Andresen, J.M. <i>et al.</i> , 2007 ²²	HD affected children	Experimental	443	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Relate polymorphic CAG and CCG regions to age at onset of HD	Venezuela	Size of CAG repeats correlates with the variation at age of HD onset
Wheeler, V.C. <i>et al.</i> , 2007 ⁶	Sperm and blood samples of affected individuals	Experimental	112	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Investigate factors associated with intergenerational instability in paternal transmission	Venezuela	Intergenerational instability in paternal transmission
Akbas, F. & Erginel-Unaltuna, N., 2002 ¹⁴	Adults individuals of both sexes	Experimental (case control study)	127	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Population investigation of CAG repeats	Turkey	Juvenile-onset occurs more frequently due to paternal transmission of expanded alleles
Hecimovic, S., <i>et al.</i> , 2002 ¹⁷	HD affected individuals	Experimental (case control study)	44	Molecular analysis of three polymorphic regions related to HD	Population investigation of CAG and CCG repeats	Croatia	HD genes in Croatia came from Western Europe
Tang, Y. <i>et al.</i> , 2006 ²³	One family with HD history	Experimental (case study)	15	Molecular analysis of polymorphic CAG region of HD family	Investigate the intergenerational transmission of the HD gene	China	Expanded alleles have frequently paternal origin

Authors/ years	Experimental mode	Study design	Number of individuals investigated	Methods	Objective	Place of study	Results
Metzger, S. <i>et al.</i> , 2006 ¹⁹	HD affected individuals	Experimental	980	Molecular analysis of polymorphic CAG and CCG regions	Relate polymorphic CAG and CCG regions to age at onset of HD	Germany, Italy and others countries of Europe	Size of CAG and CCG repeats explain the variation in HD age of onset
Wang, C.K. <i>et al.</i> , 2004 ¹⁸	HD affected individuals	Experimental (case control study)	53	Molecular analysis of polymorphic CAG and CCG regions	Relate polymorphic CAG and CCG regions to age at onset of HD	Taiwan	Size of CAG repeats explains the variation in HD age of onset and CCG length is not related to age at onset
García- Planells, J. <i>et al.</i> , 2005 ⁷	HD affected individuals	Experimental	115	Molecular analysis of six polymorphic regions related to HD	investigate the origin of HD gene in Spain	Spain	Size of CAG repeats is related to HD age of onset and the origin of Spanish HD genes was in Western Europe
Andrich, J. <i>et al.</i> , 2008 ²⁰	One HD affected individual	Experimental (case study)	1	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Report HD clinical symptoms in an individual with HD intermediary allele	Germany	Putative HD intermediary allele may cause HD phenotype
Kartsaki, E. <i>et al.</i> , 2006 ¹⁵	Individuals with HD family history	Experimental	33	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Intergenerational study of HD families	Crete	Genetic profile of Crete population is 36-42 CAG repeats, the onset of juvenile HD cases was caused by alleles inherited from either father or mother

Authors/ years	Experimental mode	Study design	Number of individuals investigated	Methods	Objective	Place of study	Results
Pramanik, S. <i>et al.</i> , 2000 ¹⁶	HD affected individuals	Experimental	28	Molecular analysis of polymorphic CAG and CCG regions	Investigate the origin of HD gene and genetic profile of India population	India	CCG allele with four repeats was found in an Indian population and its genetic profile was 41-56 CAG repeats
Nahas, F.A. <i>et al.</i> , 2005 ⁹	HD affected individuals	Experimental (case study)	2	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Investigate maternal transmission of HD gene	Detroit, Michigan	Very long expansions can also be inherited from the mother
Siesling, S. <i>et al.</i> , 2000 ²⁴	HD affected individuals	Experimental (case study)	172	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Investigate mistakes in clinical diagnosis of HD	The Netherlands	Mistakes in clinical diagnosis of HD
Kutuev, I.A. <i>et al.</i> , 2004 ²⁵	HD affected individuals	Experimental	59	Molecular analysis of polymorphic CAG and CCG regions	Intergenerational study of HD families	Russia	High instability of HD gene in paternal transmission
Raskin, S. <i>et al.</i> , 2000 ¹³	HD affected individuals	Experimental (case study)	92	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Population investigation of CAG repeats	Brazil	Expanded alleles are more frequently transmitted by the father. Brazilian genetic profile for HD: 39-88 CAG repeats

Authors/ years	Experimental mode	Study design	Number of individuals investigated	Methods	Objective	Place of study	Results
Silva, T.C.L. <i>et al.</i> , 2000 ²	HD affected individuals	Experimental (case study)	44	Molecular analysis of polymorphic CAG region	Relate polymorphic CAG regions to age at onset of HD	Brazil	Brazilian genetic profile: 43-53 CAG repeats. There was no difference in CAG size whether the expanded allele was inherited from the father or mother

APÊNDICE D - Tabela com informações dos indivíduos portadores de alelos anormais para DH analisados

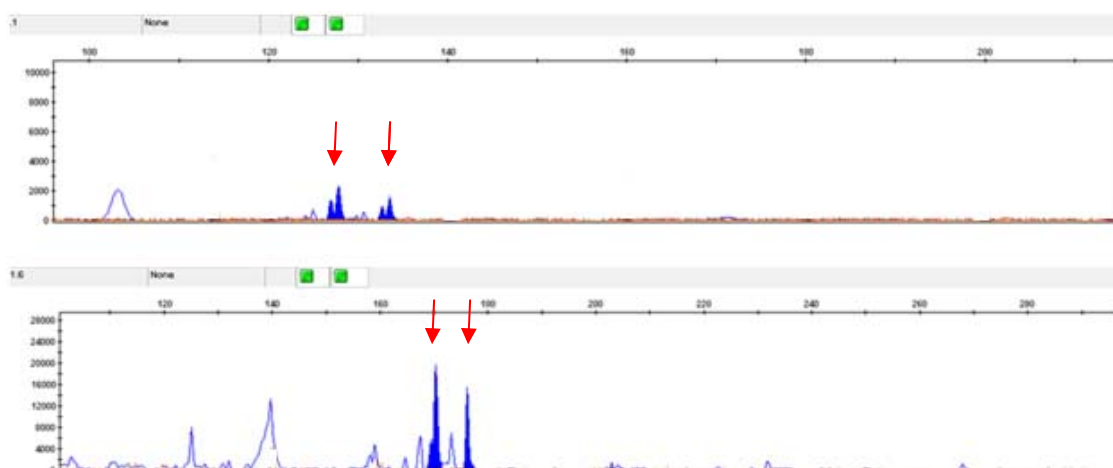
Número de identificação do paciente	Número de identificação do Heredograma familiar	Gênero	Transmissão	Idade de início da doença	Alelo expandido (unidades CAG)	Alelo normal (unidades CAG)	Alelos da região polimórfica CCG correspondente ao alelo expandido	Alelos da região polimórfica CCG correspondente ao alelo normal
2	2	M	Materna	40	43	16	7	10
7	6	F	Paterna	47	45	13	7	7
8	7	F	Materna	38	39	15	7	7
9	8	F	Materna	38	42	24	7	7
10	9	F	Paterna	32	45	13	7	7
11	10	F	Paterna	28	49	19	8	7
12	8	F	Materna	43	40	15	7	10
14	11	F	Paterna	38	43	13	7	7
15	11	F	Paterna	43	43	13	7	7
16	12	F	Paterna	53	41	13	10	7
18	11	F	Paterna	42	41	17	7	10
19	13	F	Paterna	22	58	20	7	7
20	1	M	Paterna	32	42	22	7	7
21	14	F	1º caso	35	48	14	7	7
24	16	F	Paterna	43	42	15	7	7
25	16	M	Paterna	56	39	15	7	7
26	15	F	Materna	44	40	17	7	7
27	15	M	Materna	40	41	13	6	10
28	17	M	Materna	0	27	14	7	7
30	15	F	Materna	0	41	15	7	10
32	15	M	Materna	0	41	12	7	10
33	15	F	Materna	50	37	15	7	7
34	15	M	Materna	48	41	16	6	7
35	16	F	Paterna	0	41	15	6	7
36	15	F	Materna	45	41	15	7	7
40	16	F	Paterna	0	40	21	7	7
44	16	M	Paterna	0	42	21	7	7
45	17	M	Materna	0	51	18	7	9
47	17	M	Materna	0	46	18	7	9
48	17	M	Materna	0	27	16	7	7
49	15	M	Materna	50	40	15	7	7
50	18	M	Materna	55	38	15	7	7
51	17	M	Materna	18	49	17	8	10
52	8	F	Materna	40	42	26	7	7
53	19	M	Paterna	25	46	15	7	7

Número de identificação do paciente	Número de identificação do Heredograma familiar	Gênero	Transmissão	Idade de início da doença	Alelo expandido (unidades CAG)	Alelo normal (unidades CAG)	Alelos da região polimórfica CCG correspondente ao alelo expandido	Alelos da região polimórfica CCG correspondente ao alelo normal
54	19	M	Paterna	45	40	15	7	10
55	19	M	Paterna	0	39	15	7	7
57	19	F	Paterna	55	39	15	7	7
58	19	M	Paterna	40	40	15	7	10
59	19	F	Paterna	50	39	15	7	10
60	19	F	Paterna	50	39	15	7	7
61	19	M	Paterna	53	38	15	7	7
62	20	F	Paterna	54	37	15	7	7
63	21	M	Paterna	22	53	15	7	10
64	22	M	Materna	48	40	25	7	7
65	23	M	Paterna	32	45	22	7	7
66	5	F	Materna	50	38	15	10	7

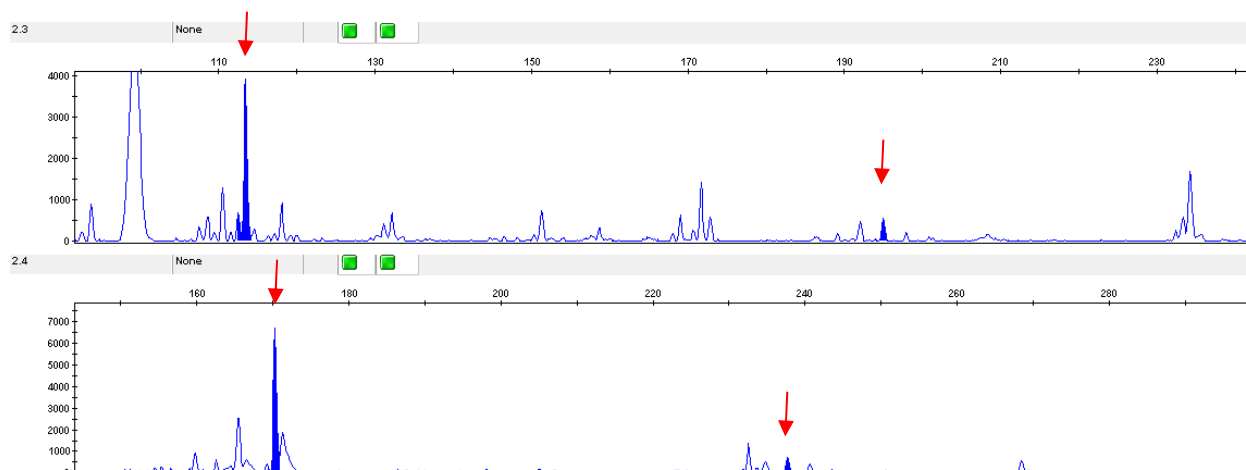
APÊNDICE E - Resultados da análise de fragmentos por eletroforese capilar (eletroferogramas) de cada paciente

Legenda: Pico azul cheio: picos alvos do estudo. Setas em vermelho: apontam o pico principal.

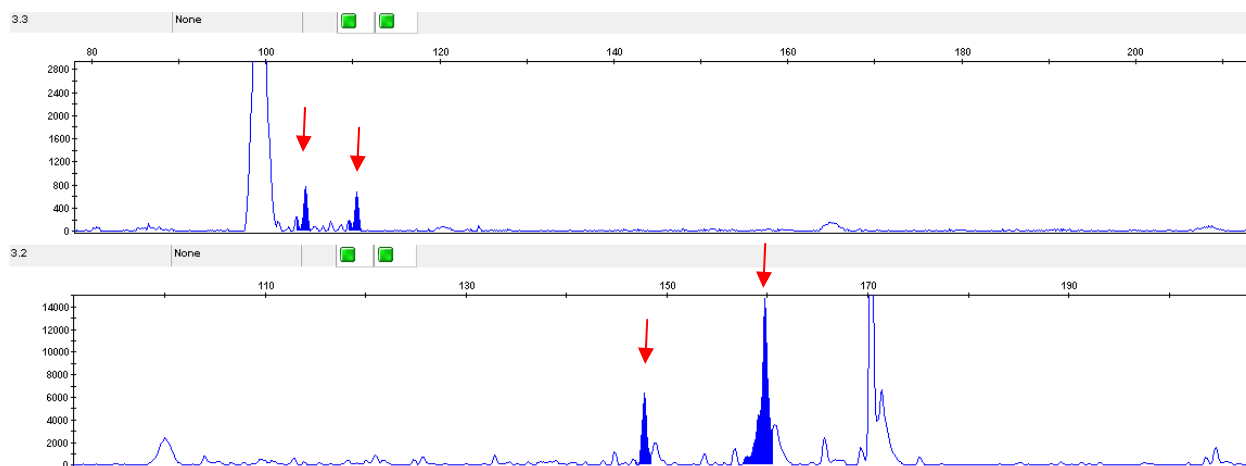
Amostra 001



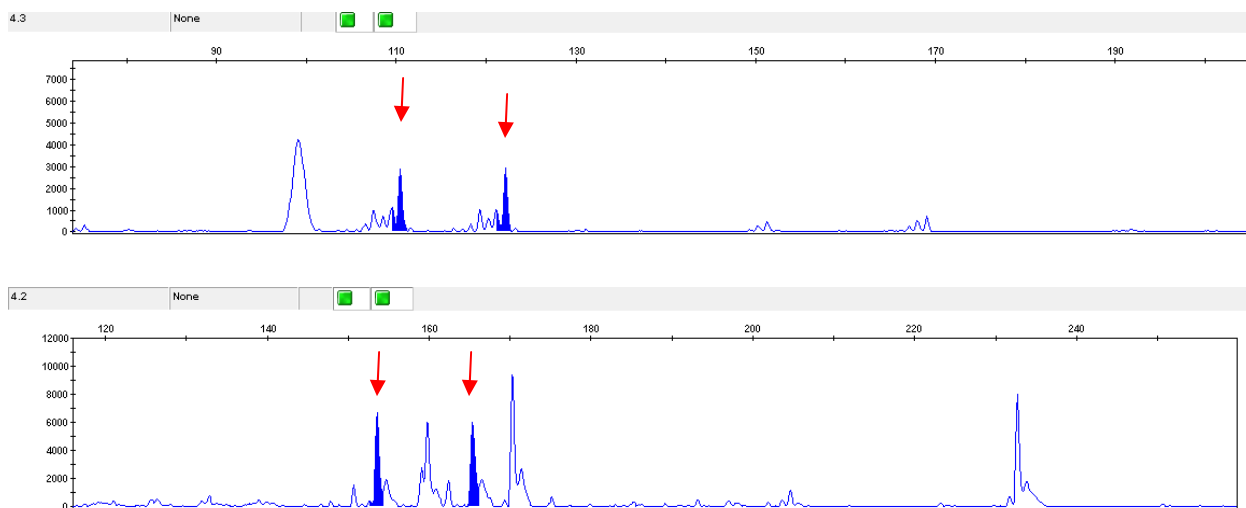
Amostra 002



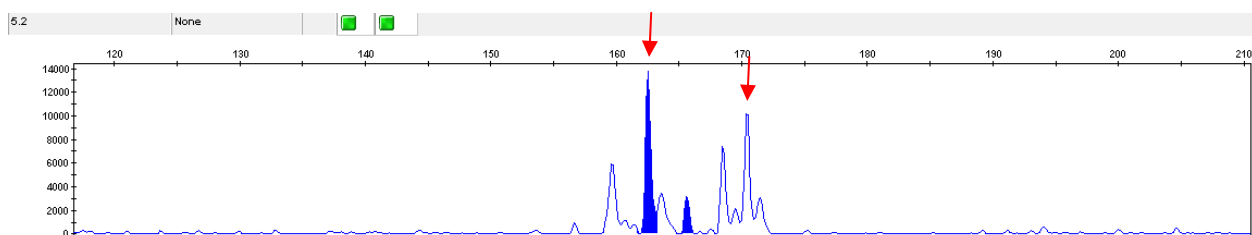
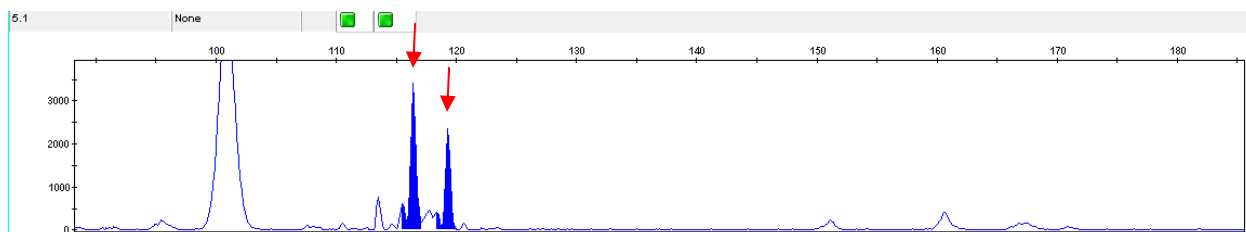
Amostra 003



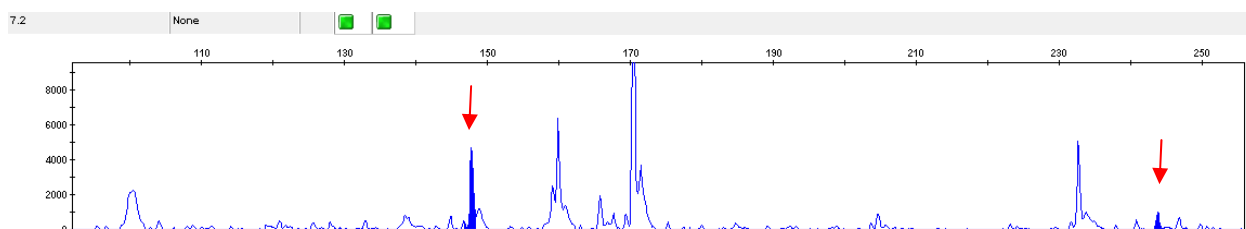
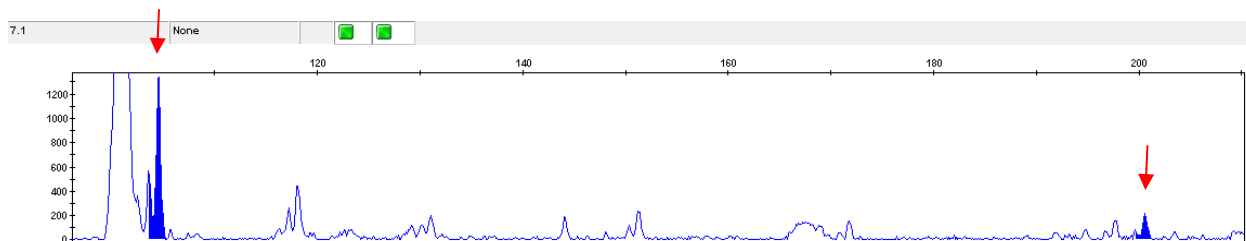
Amostra 004



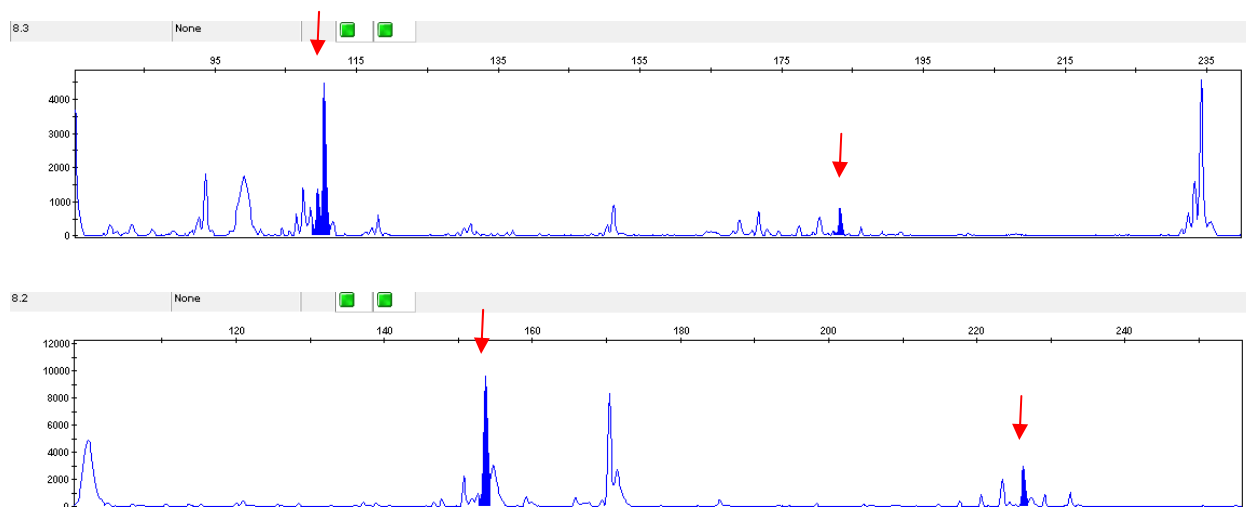
Amostra 005



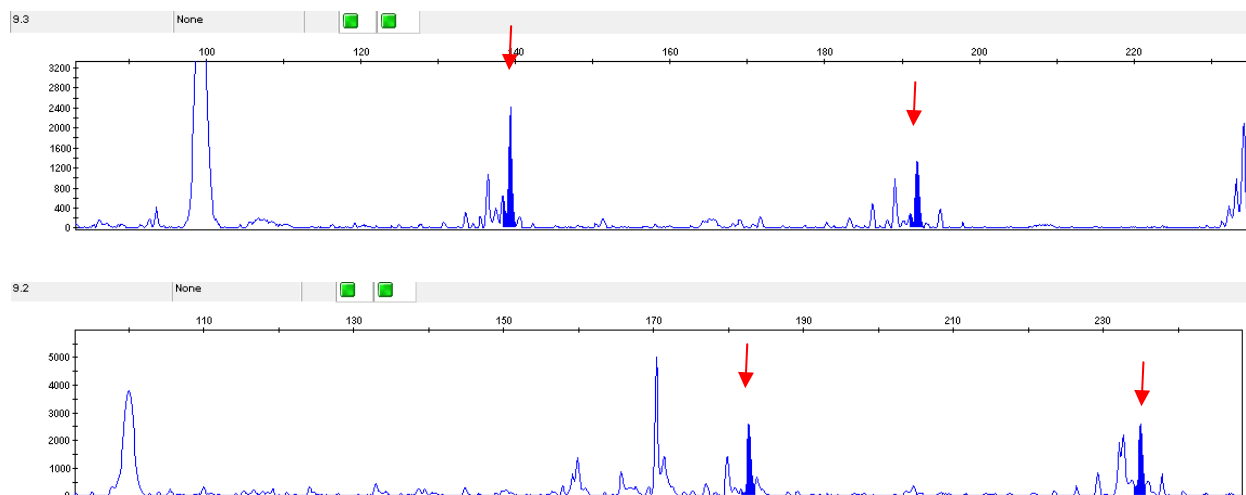
Amostra 007



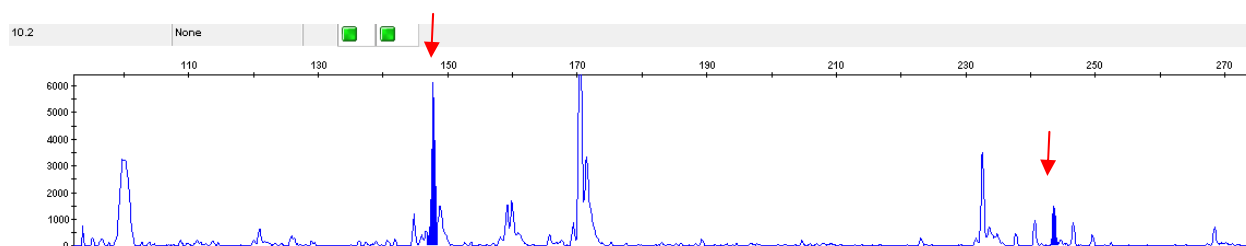
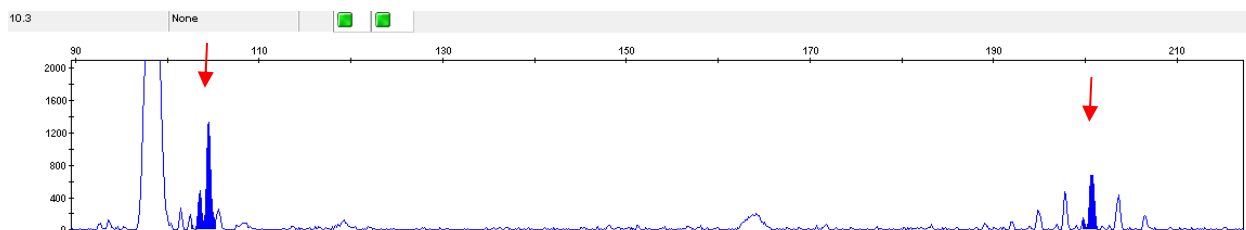
Amostra 008



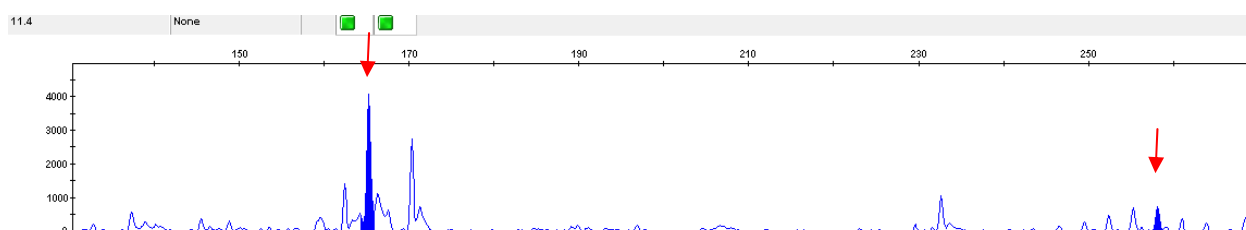
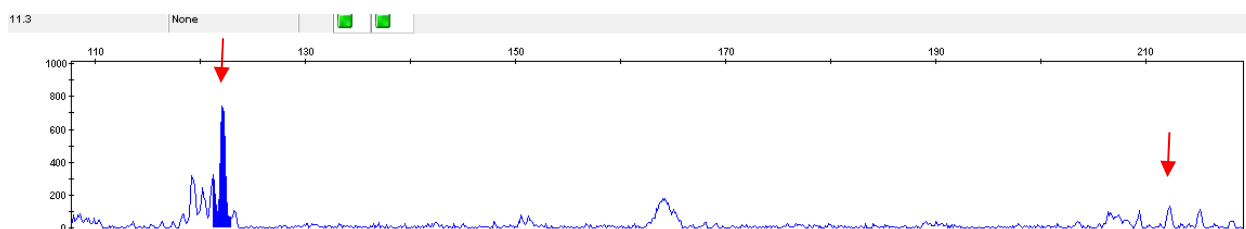
Amostra 009



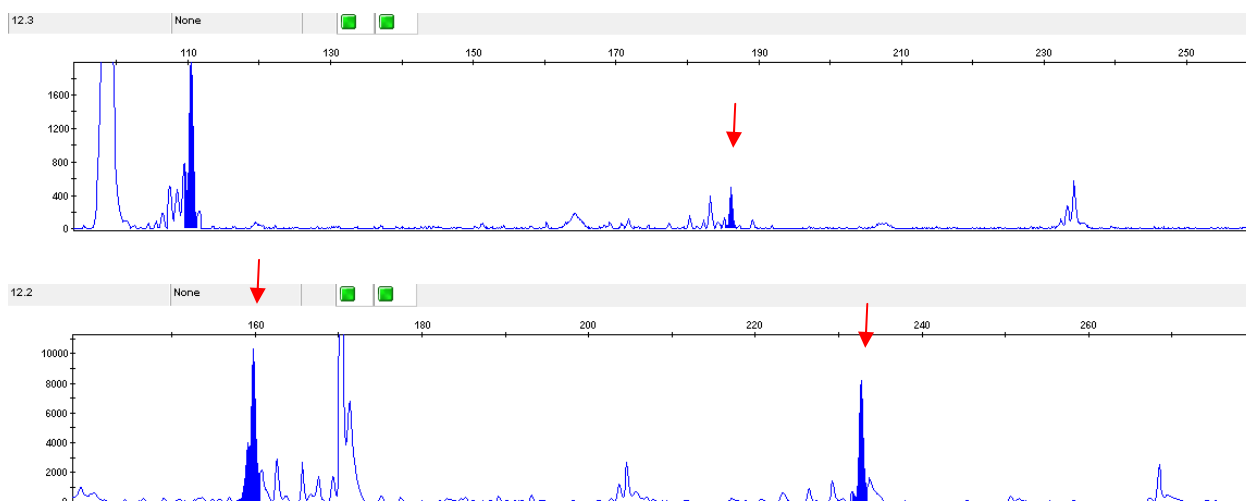
Amostra 010



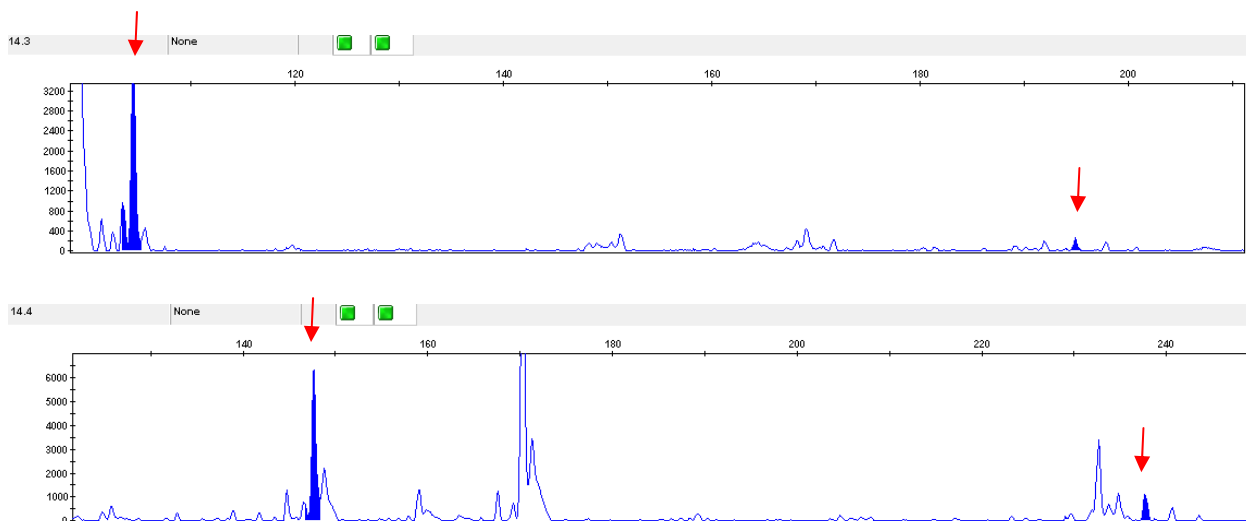
Amostra 011



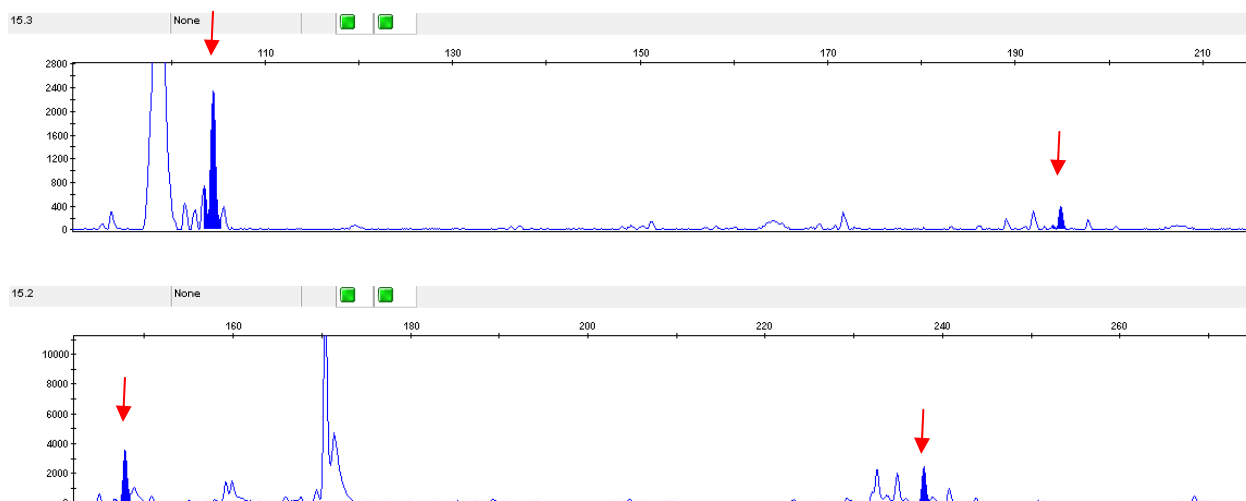
Amostra 012



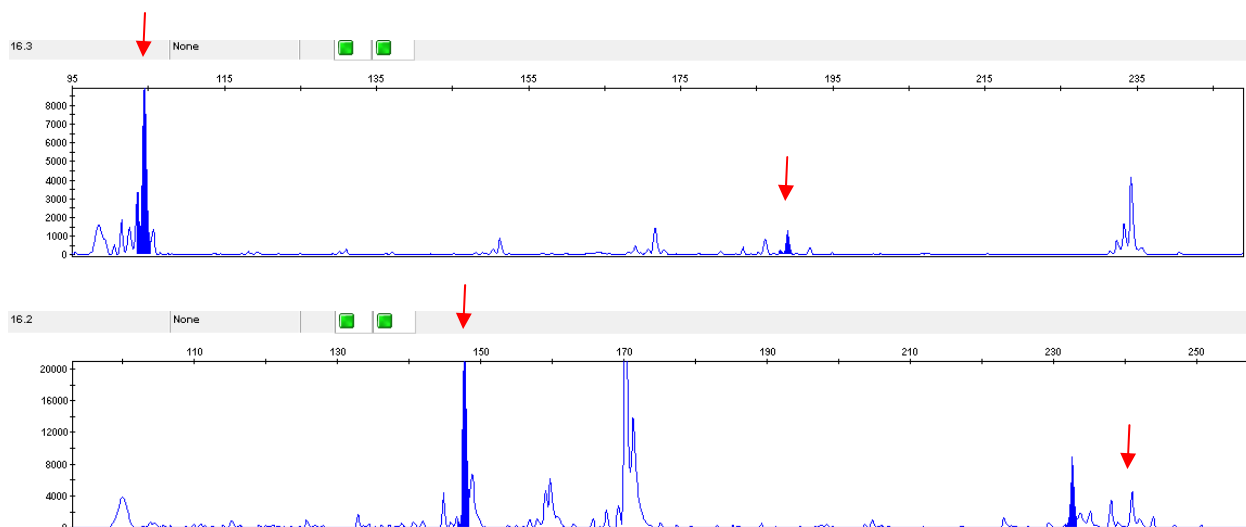
Amostra 014



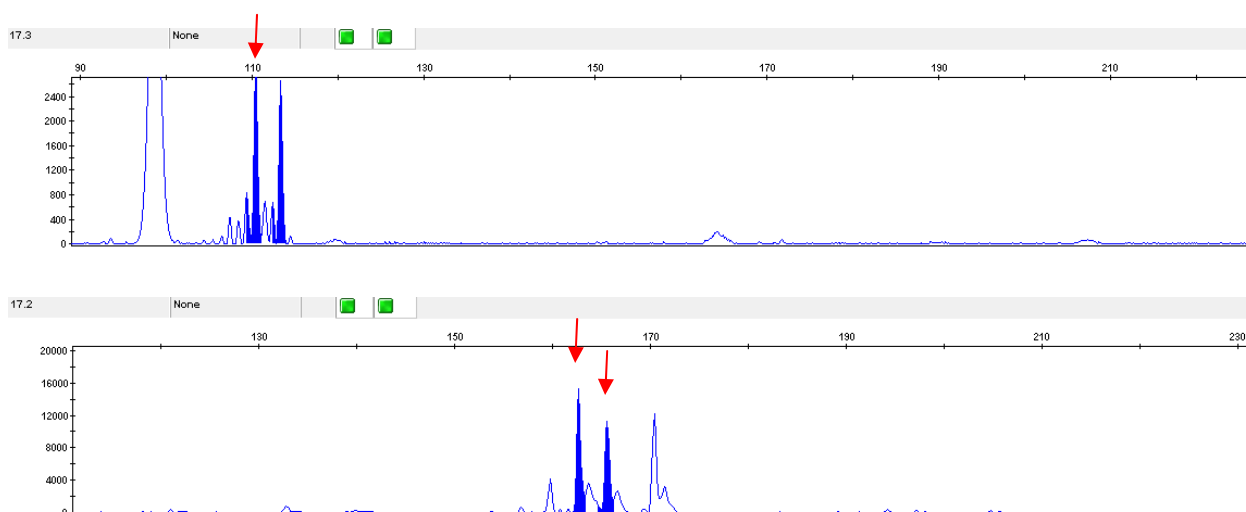
Amostra 015



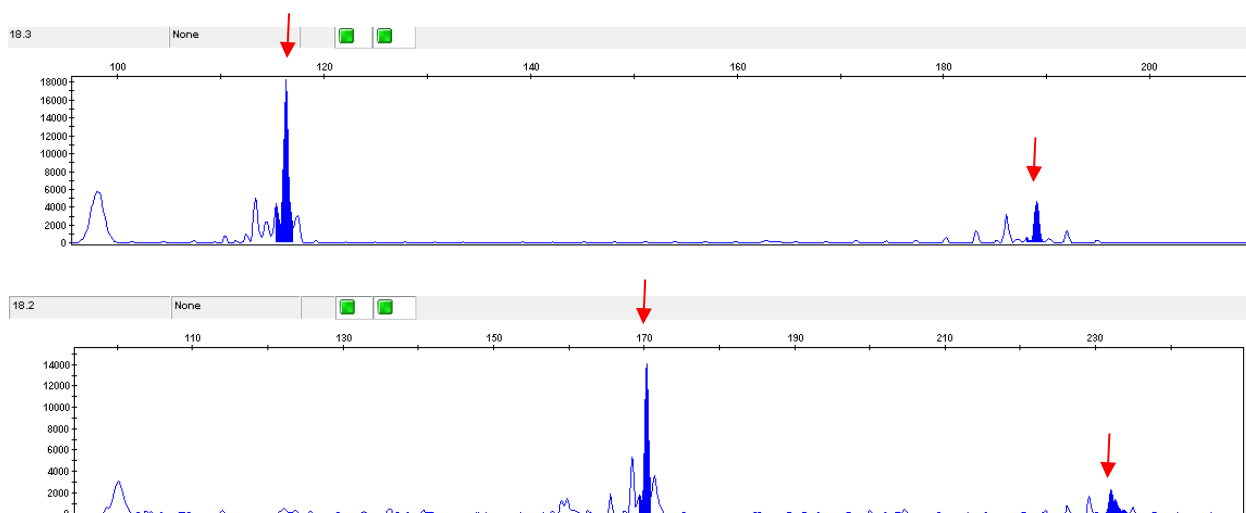
Amostra 016



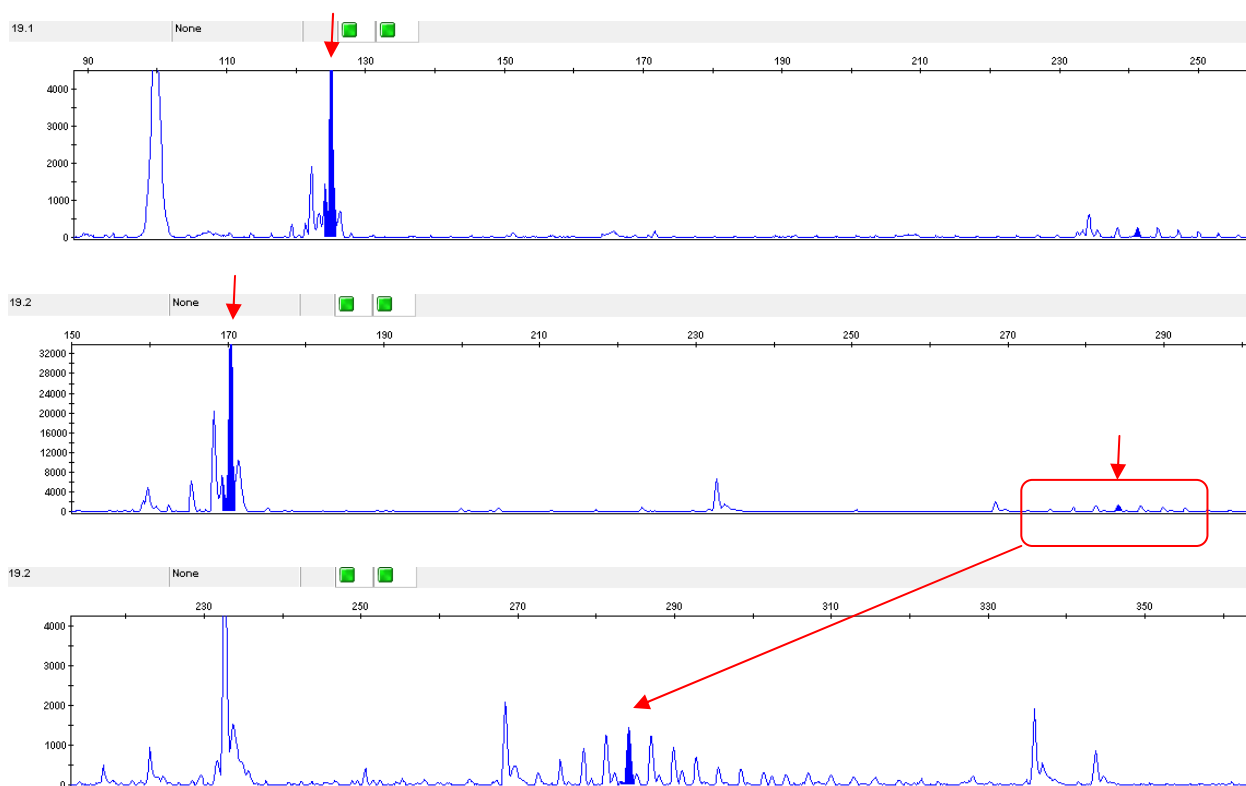
Amostra 017



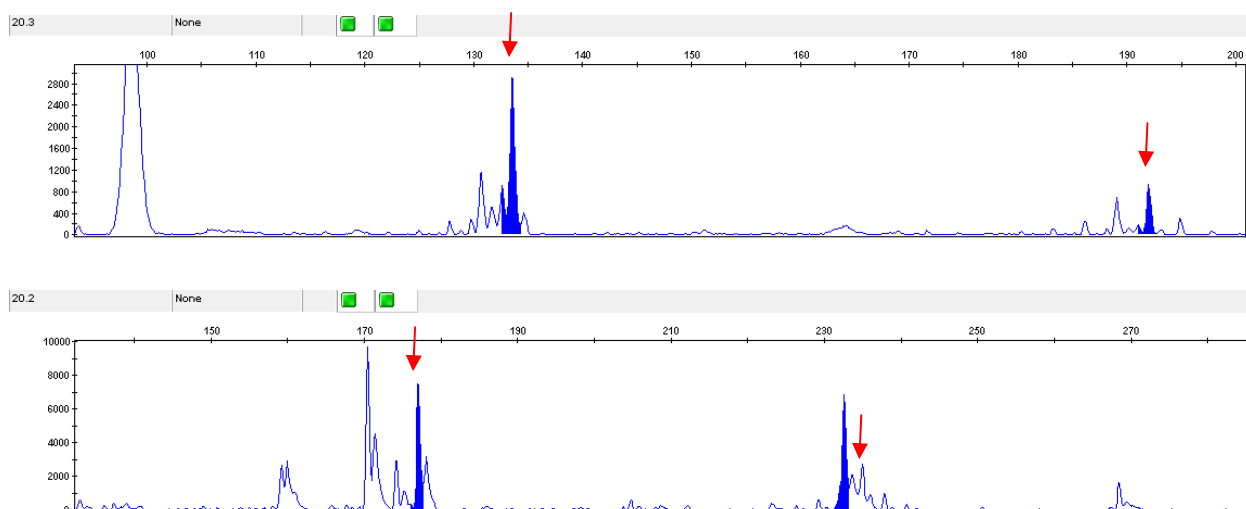
Amostra 018



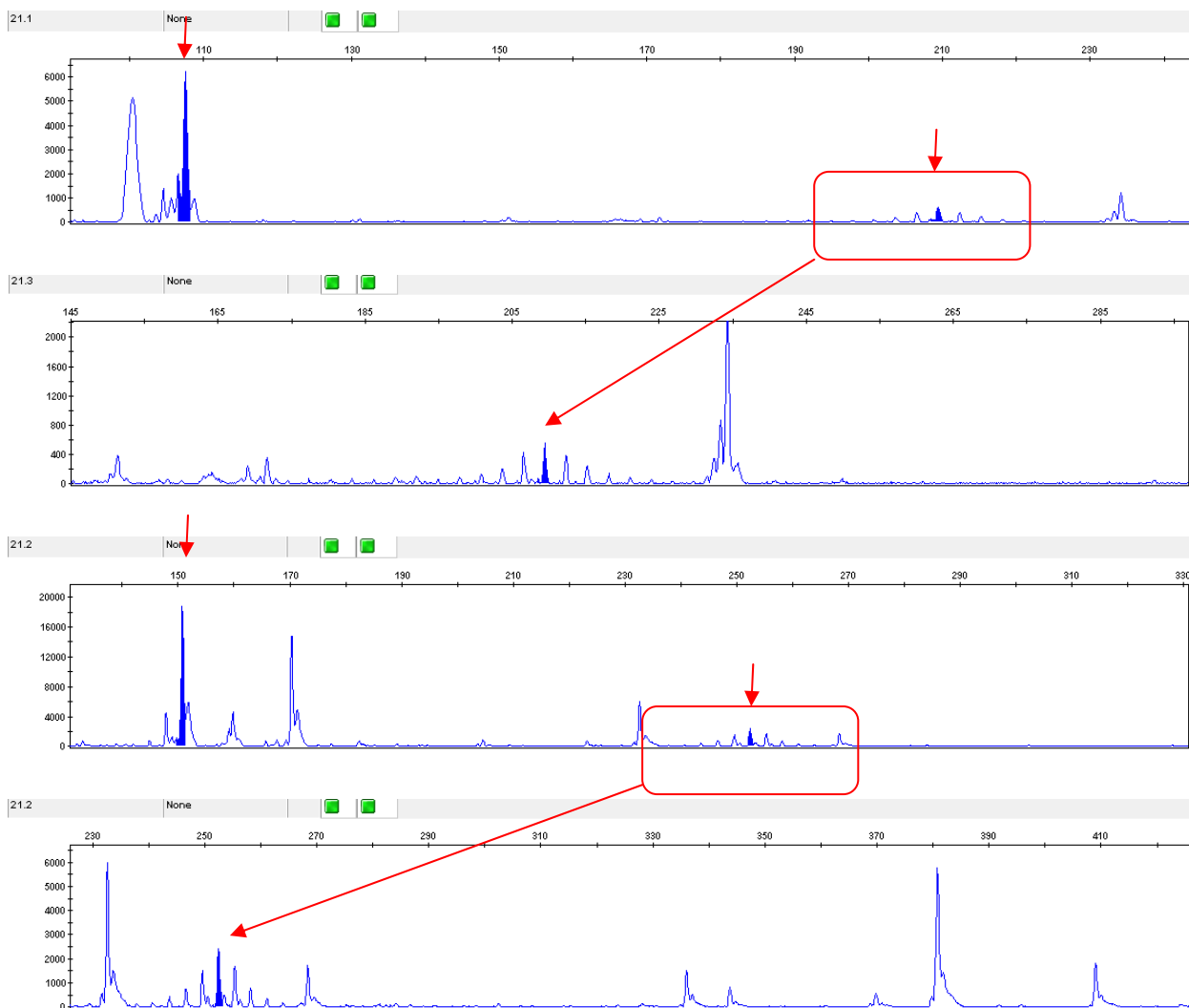
Amostra 019



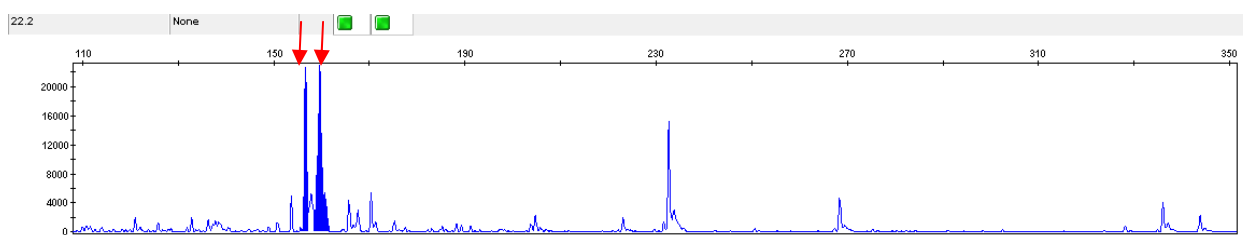
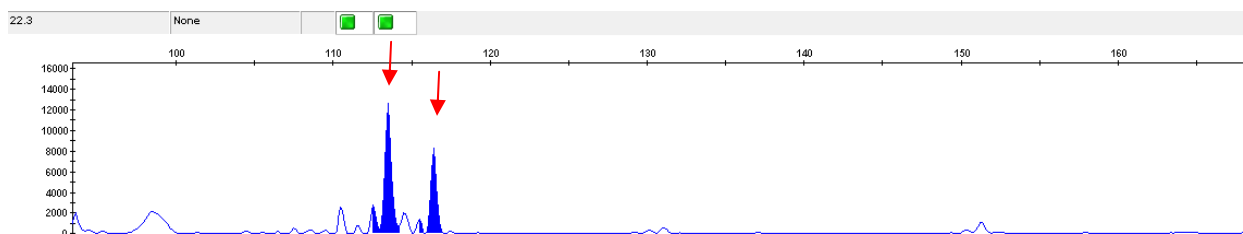
Amostra 020



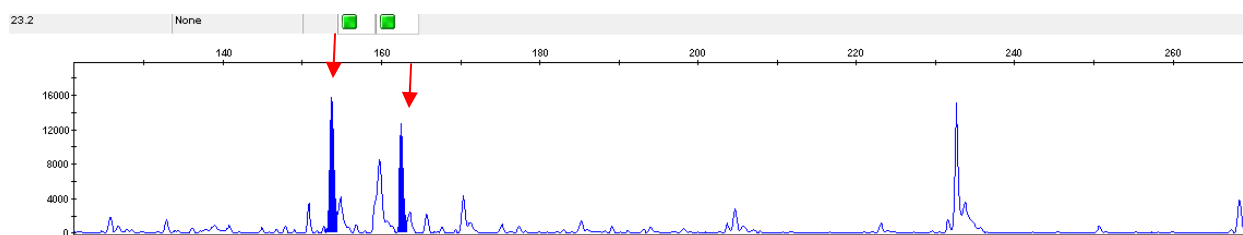
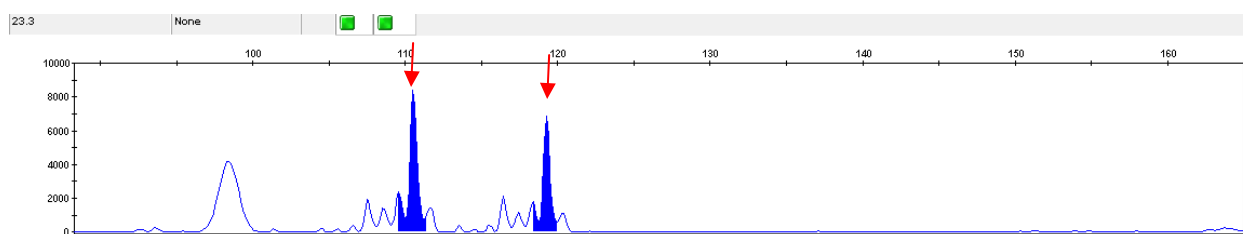
Amostra 021



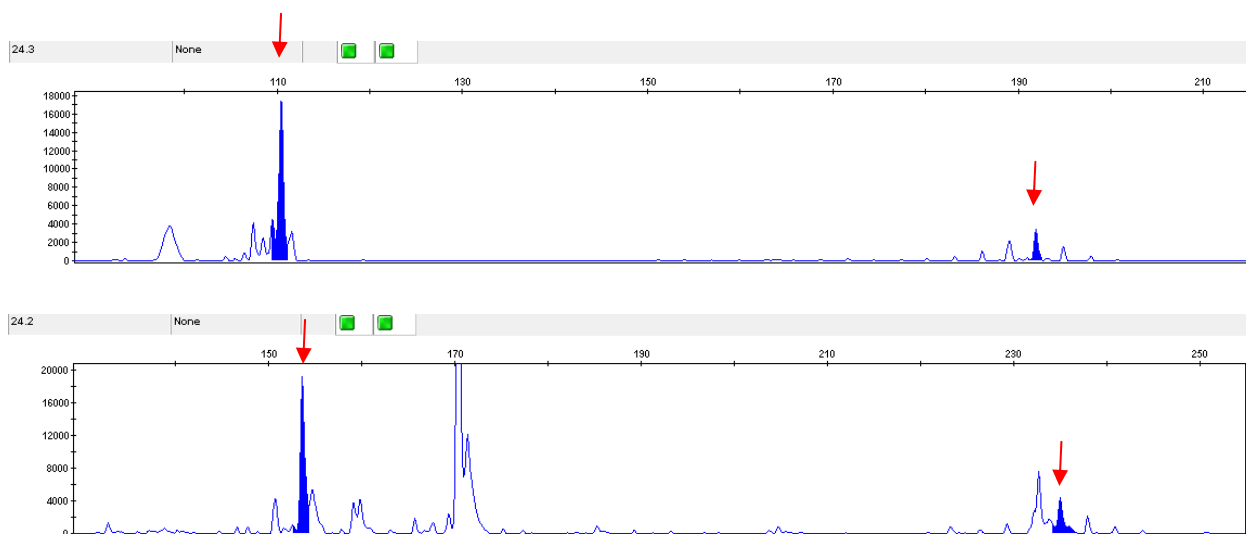
Amostra 022



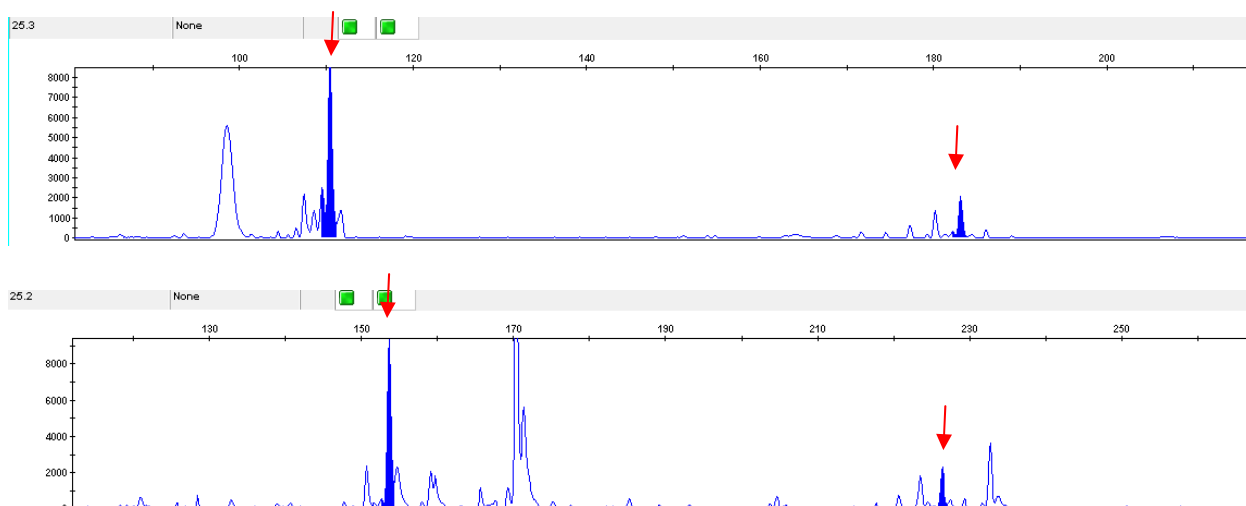
Amostra 023



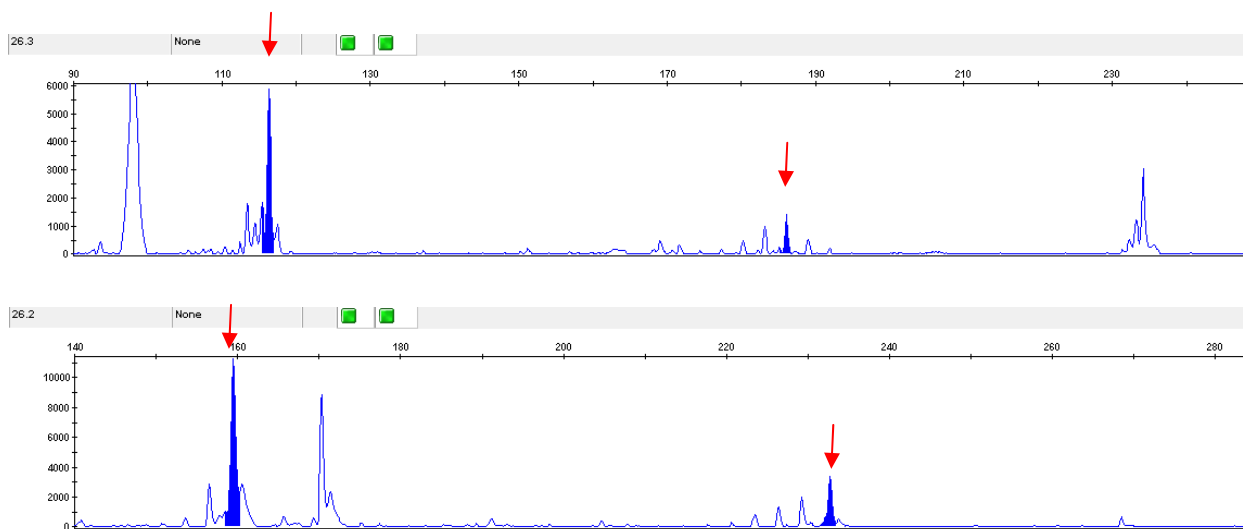
Amostra 024



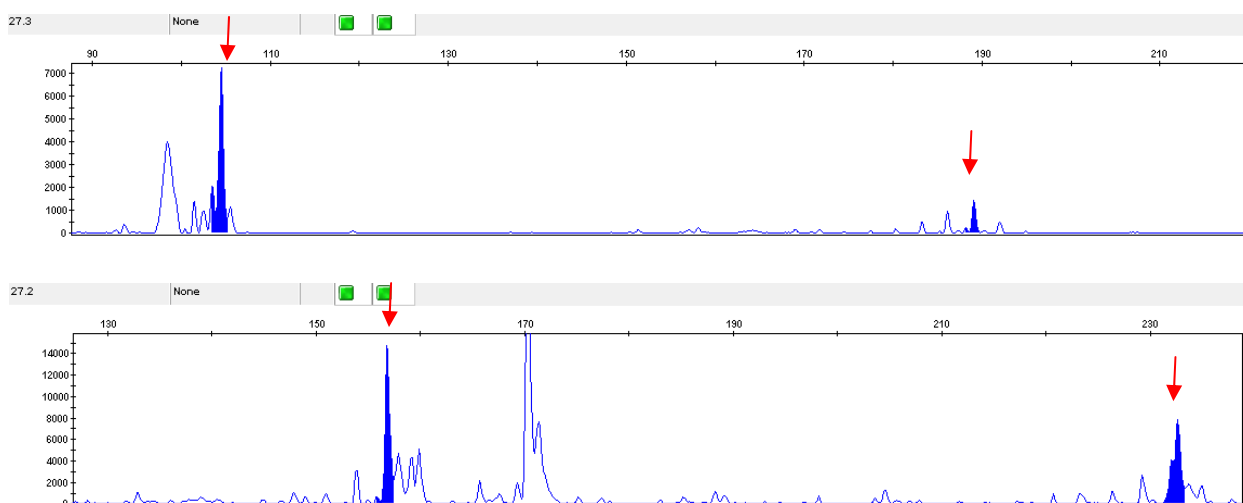
Amostra 025



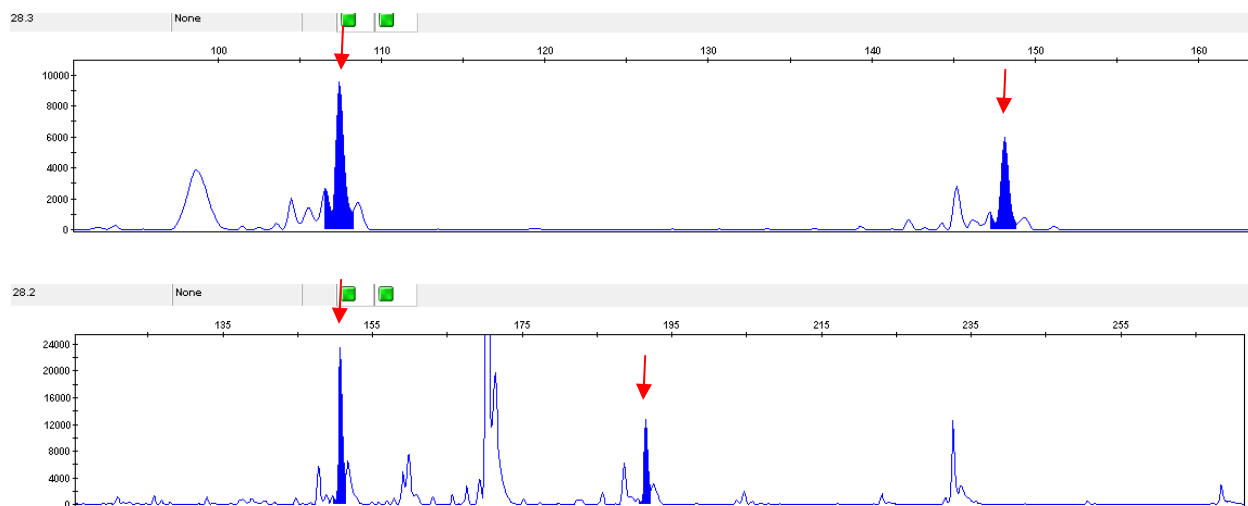
Amostra 026



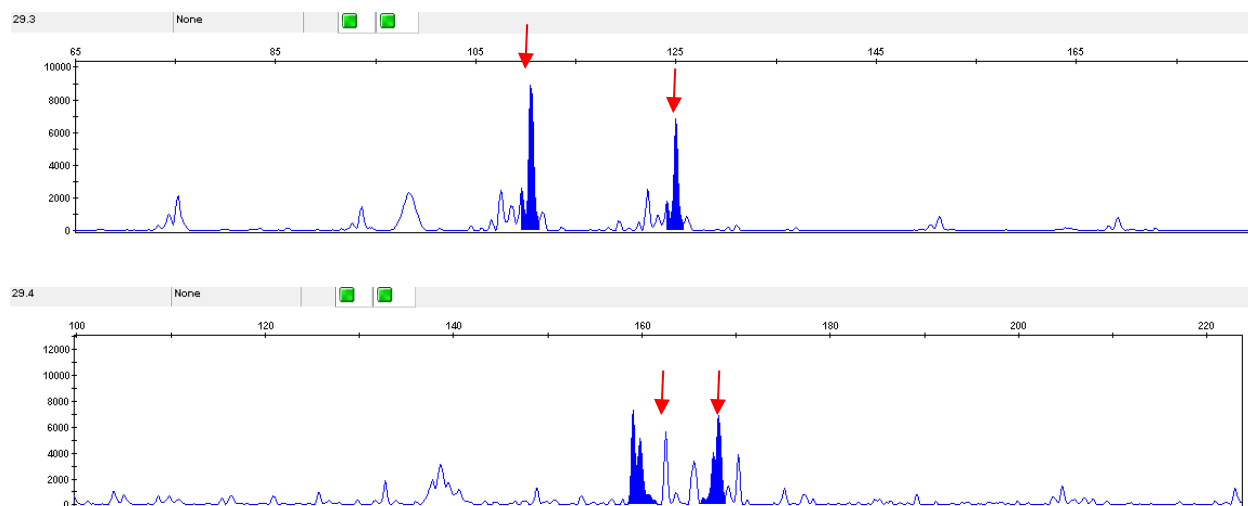
Amostra 027



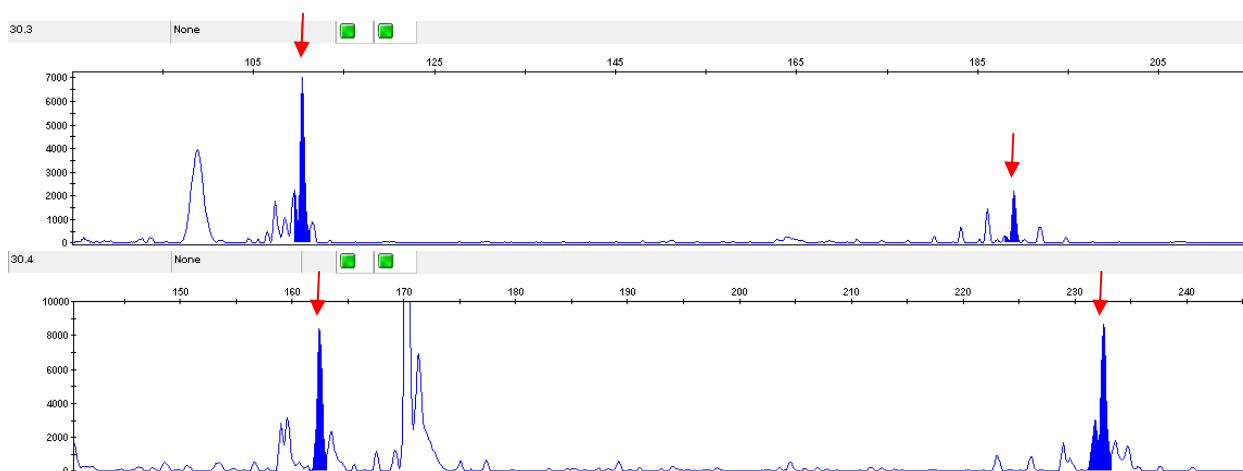
Amostra 028



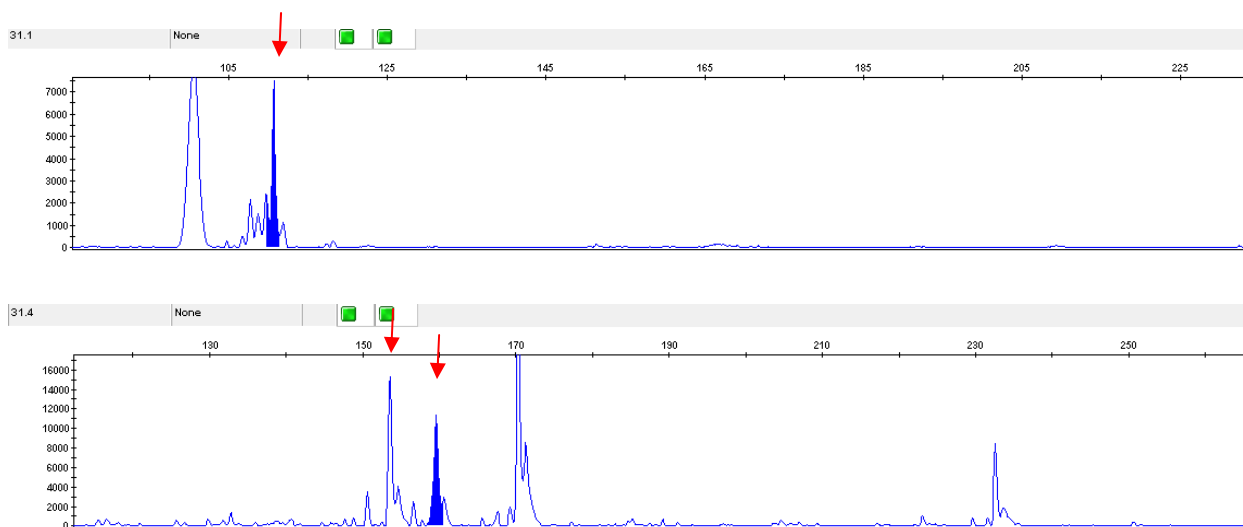
Amostra 029



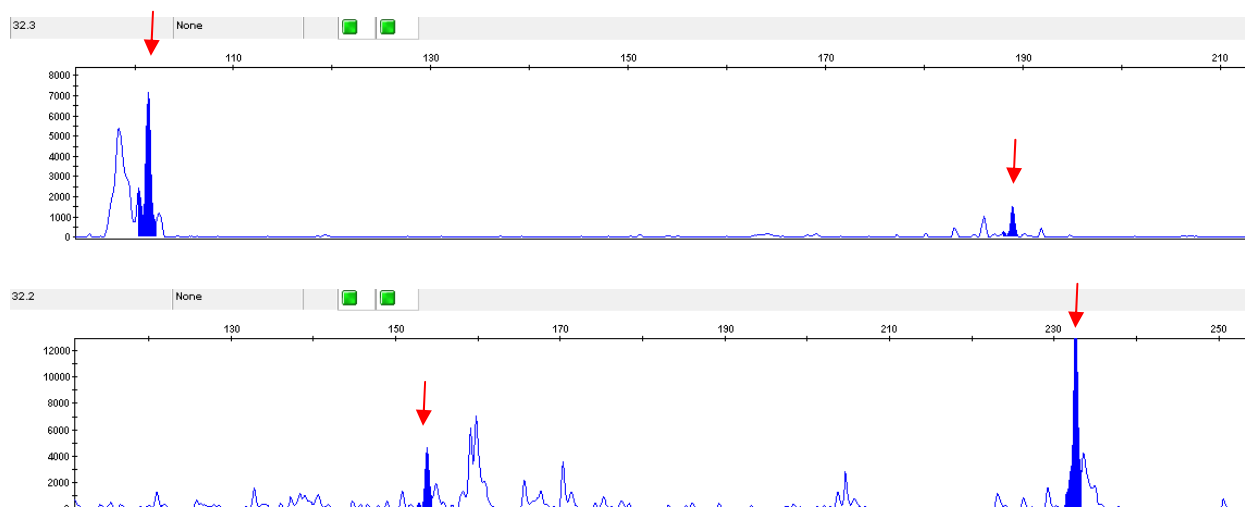
Amostra 030



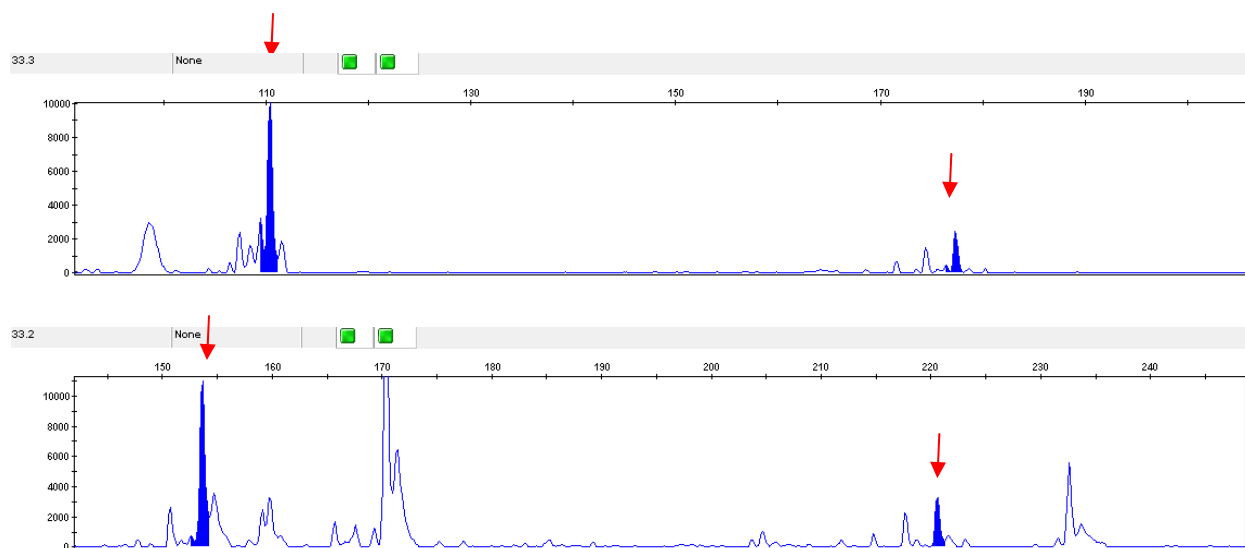
Amostra 031



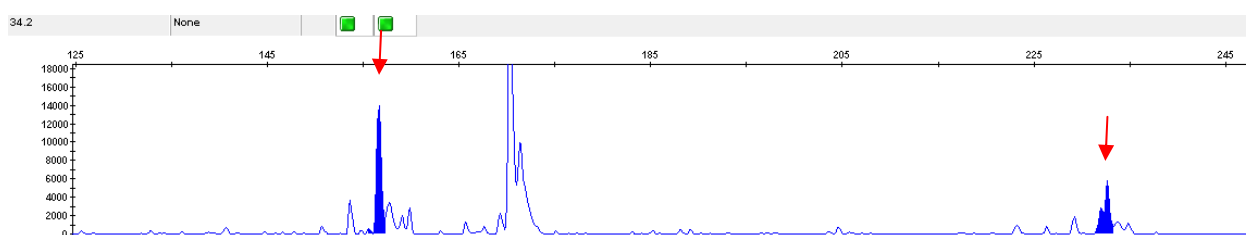
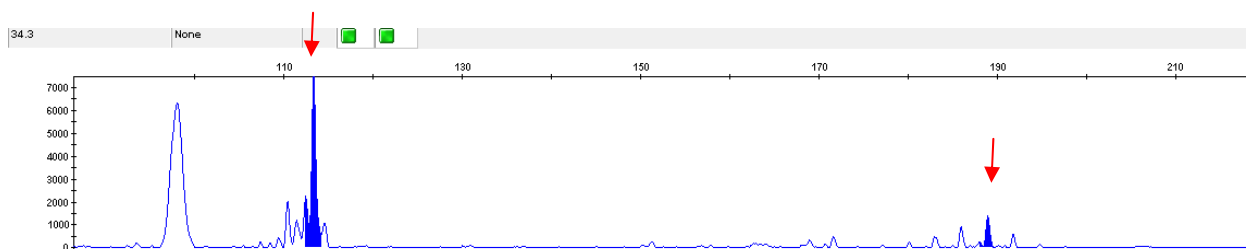
Amostra 032



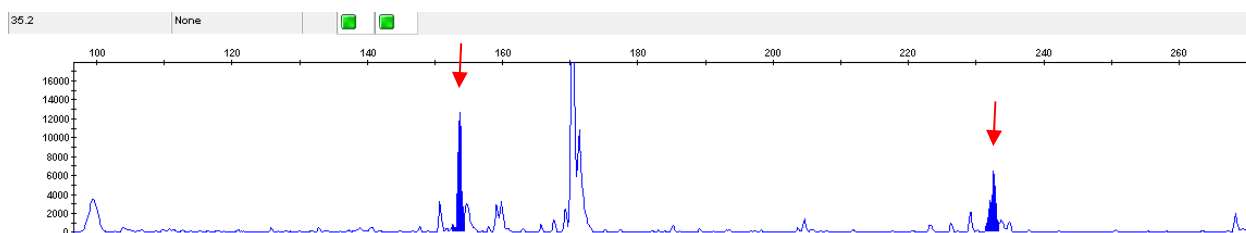
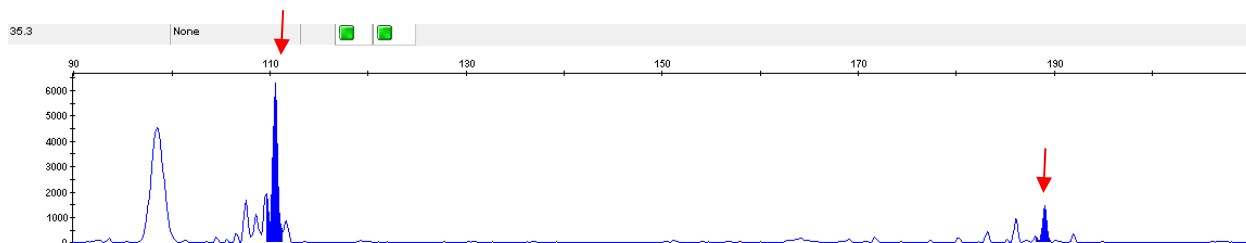
Amostra 033



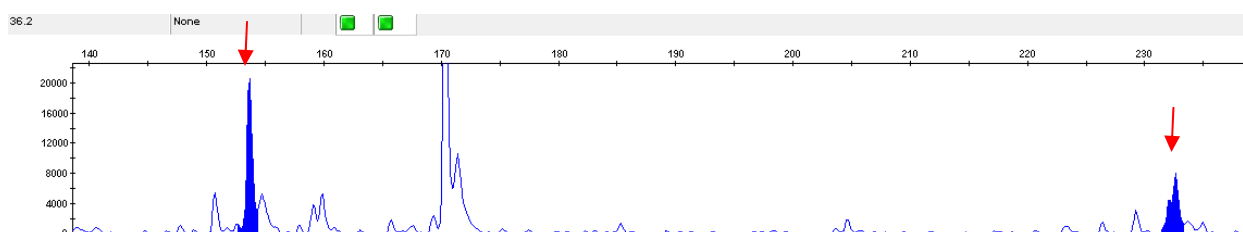
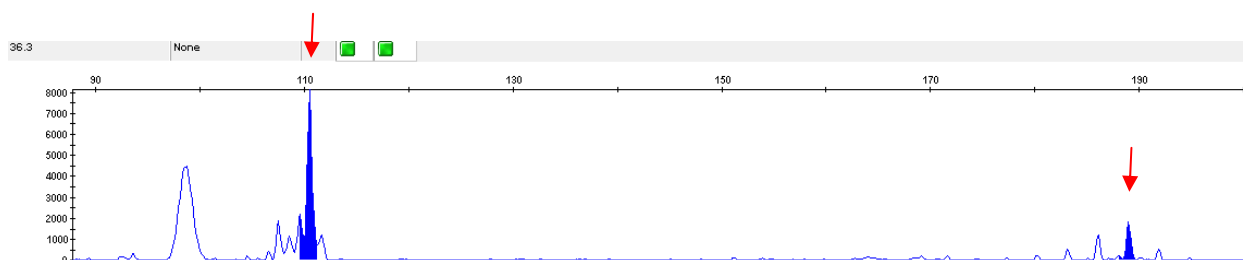
Amostra 034



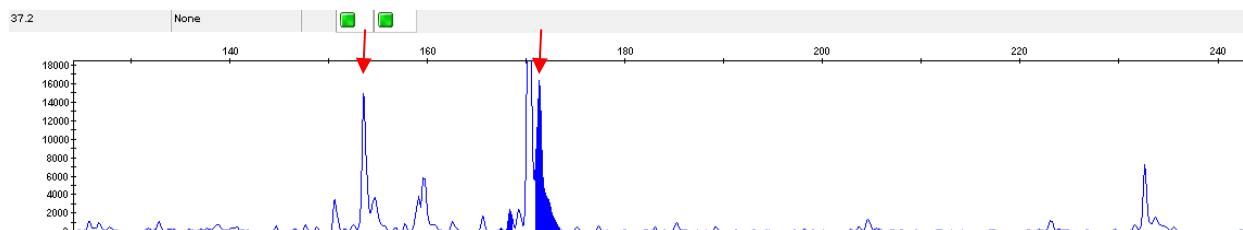
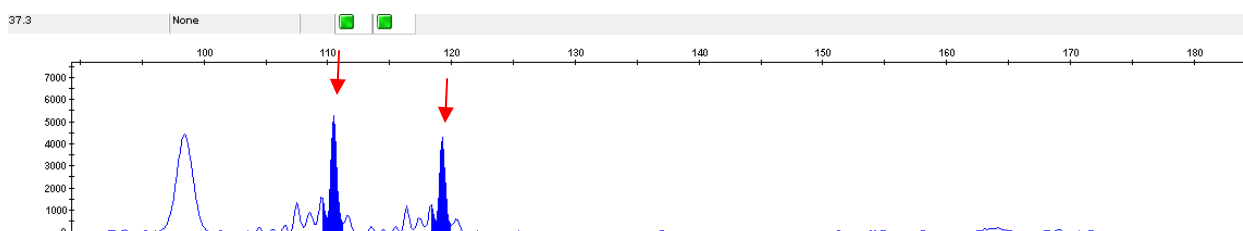
Amostra 035



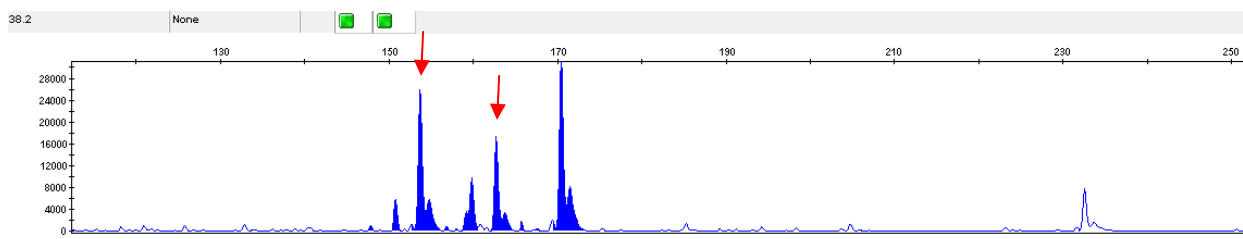
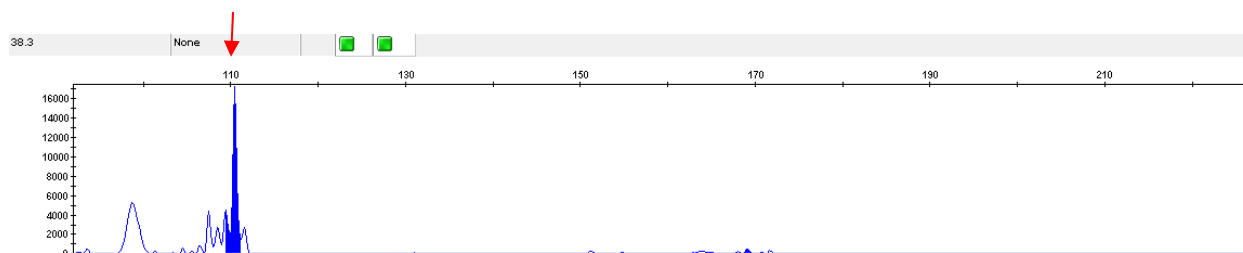
Amostra 036



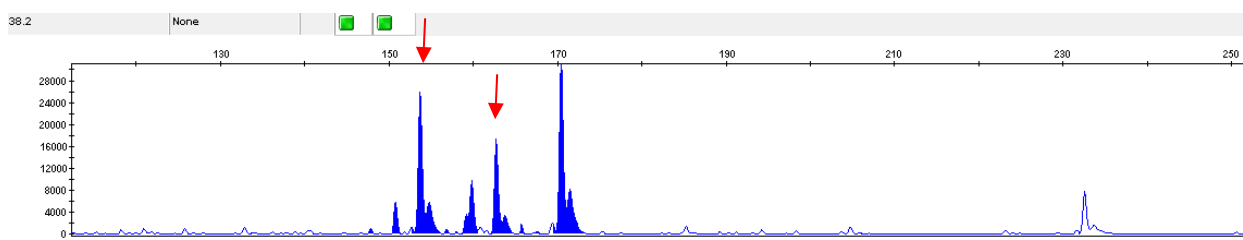
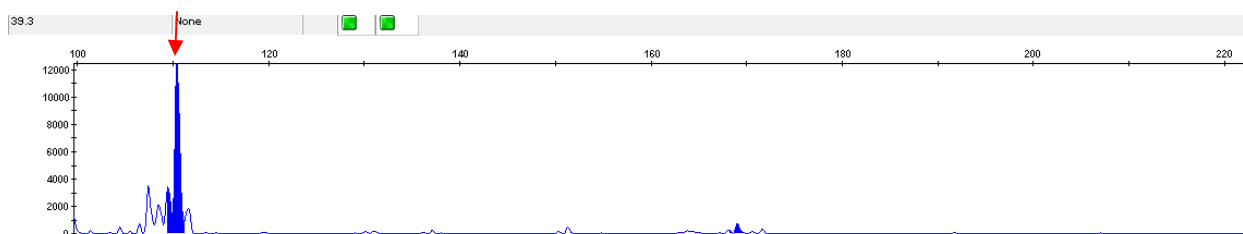
Amostra 037



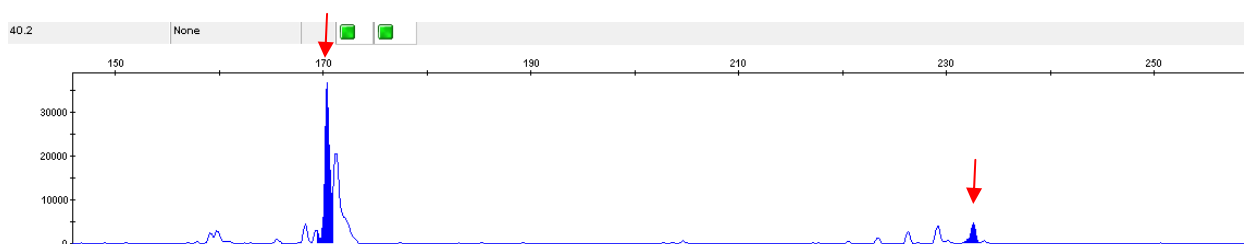
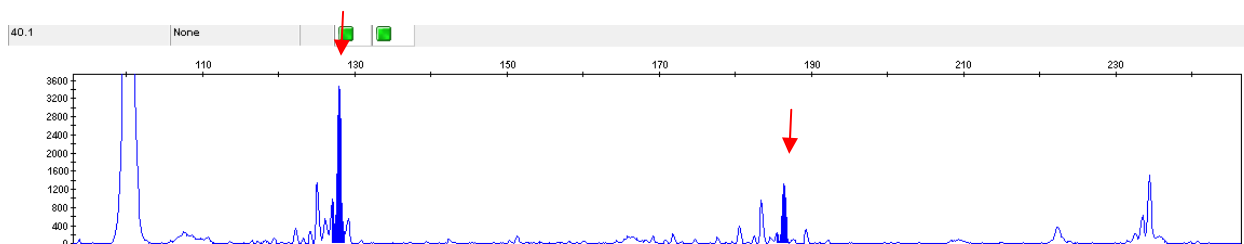
Amostra 038



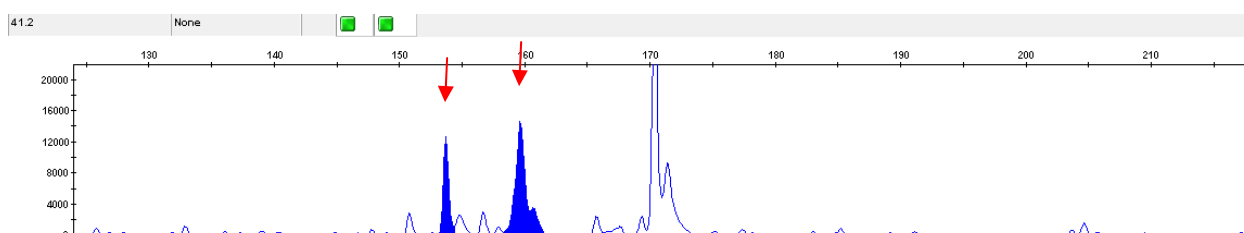
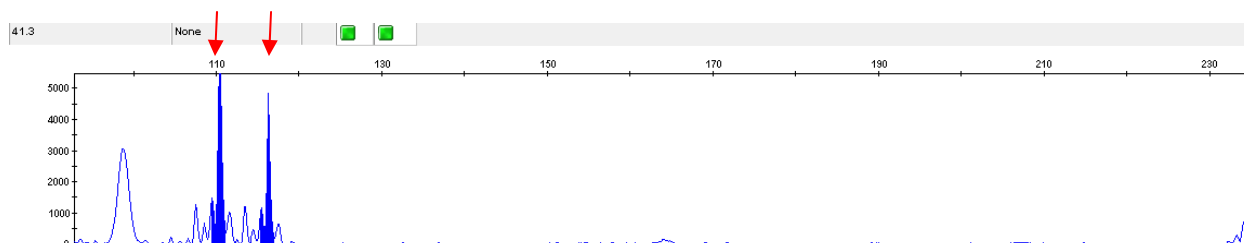
Amostra 039



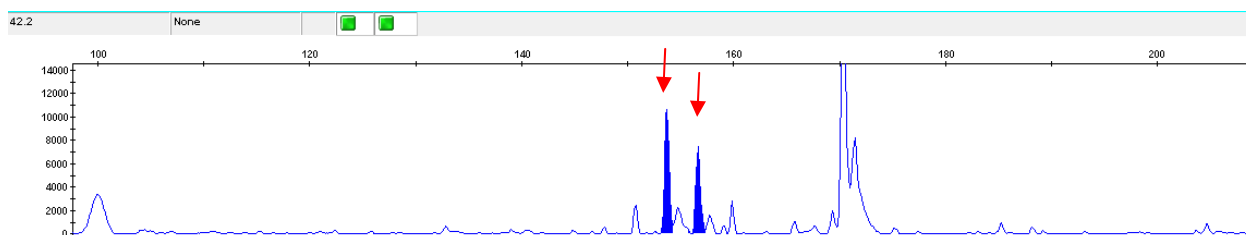
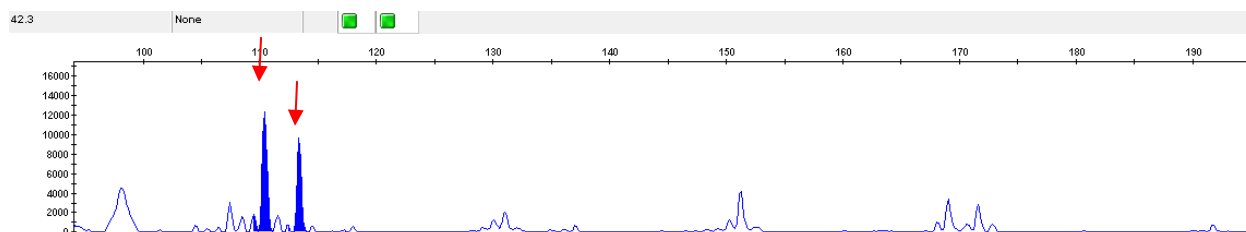
Amostra 040



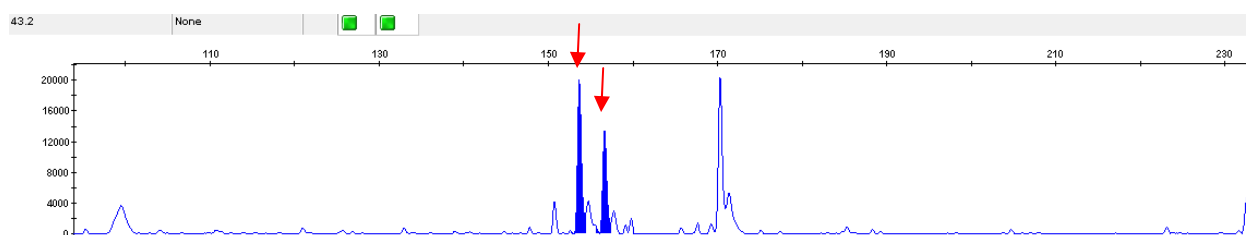
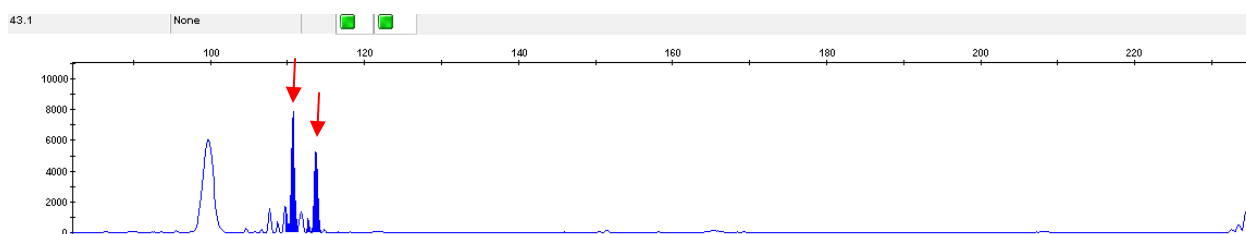
Amostra 041



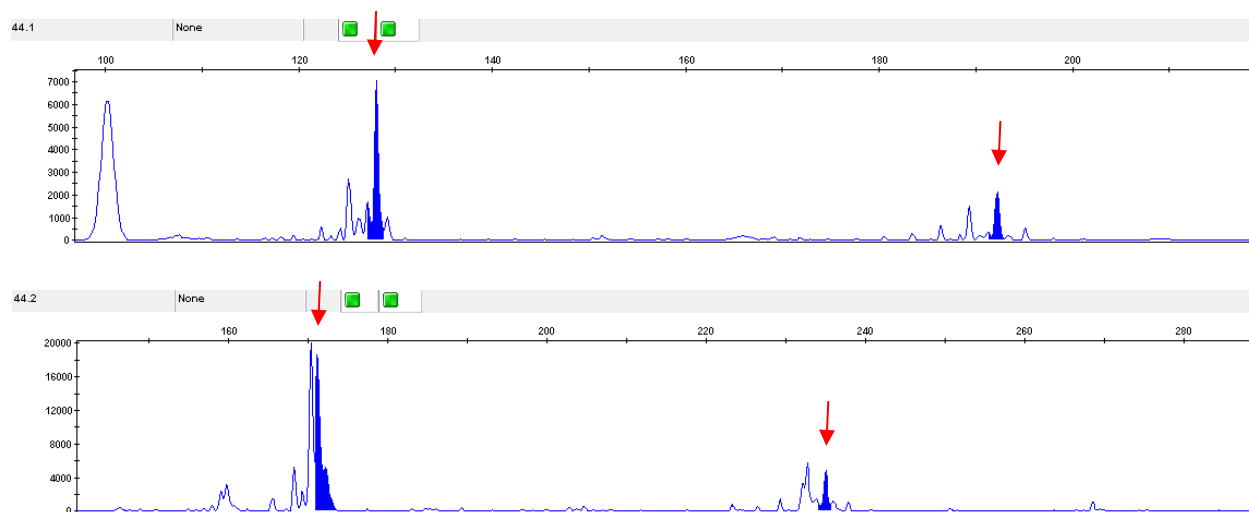
Amostra 042



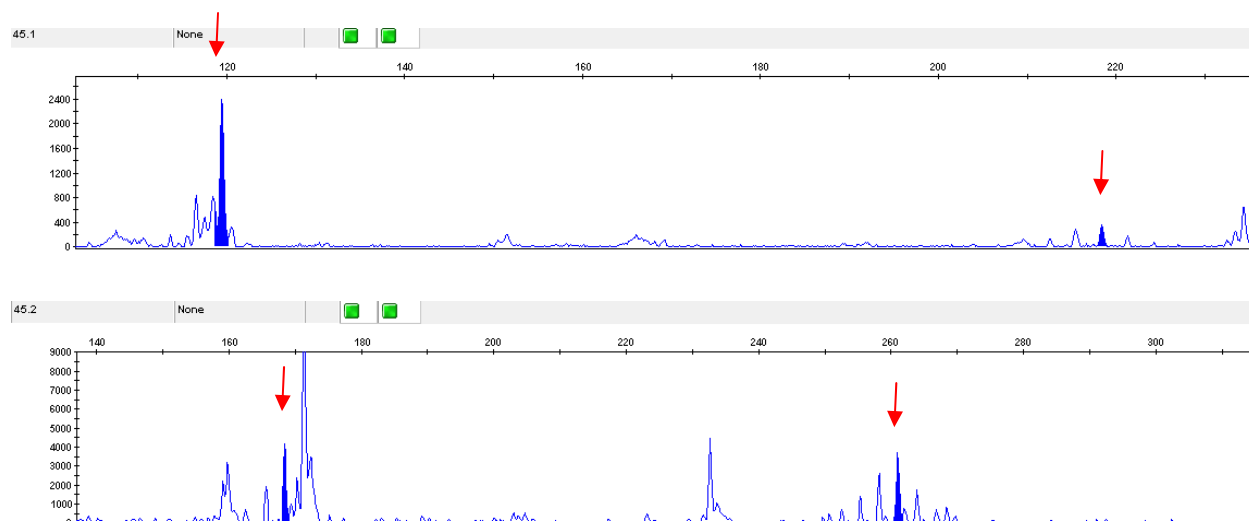
Amostra 043



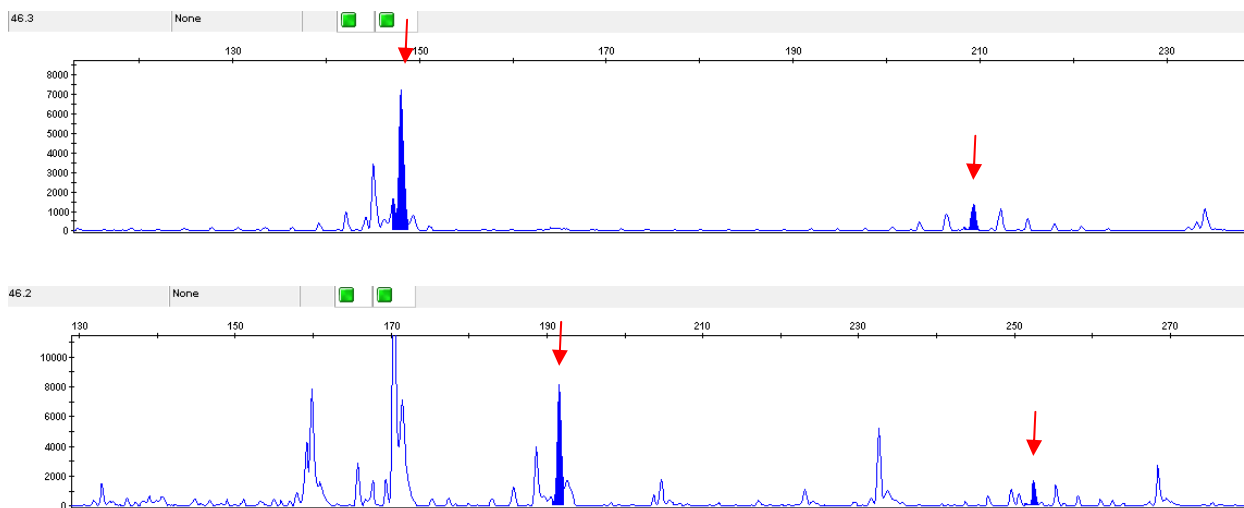
Amostra 044



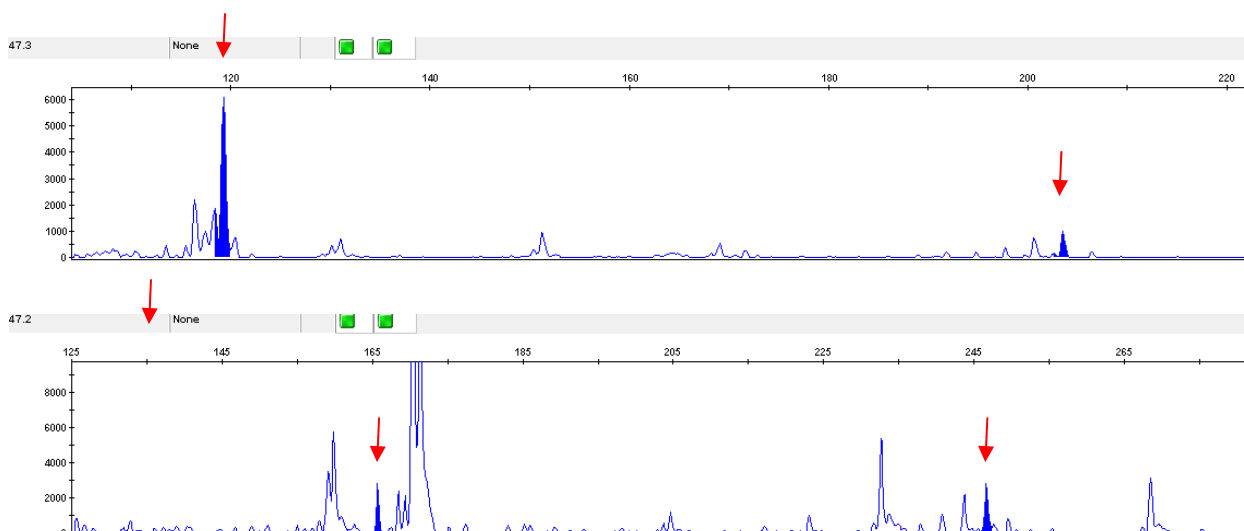
Amostra 045



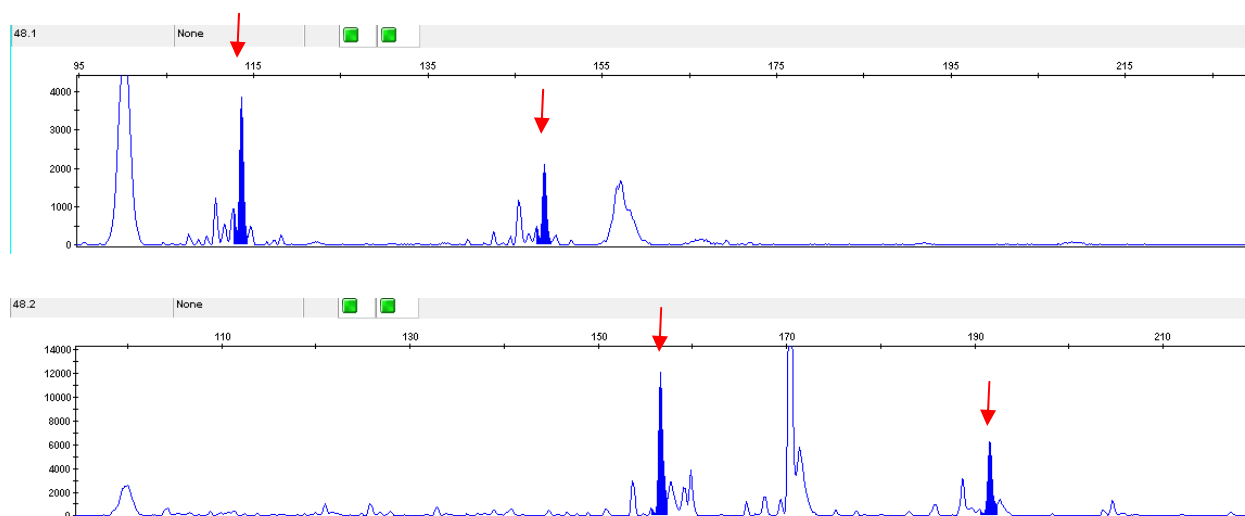
Amostra 046



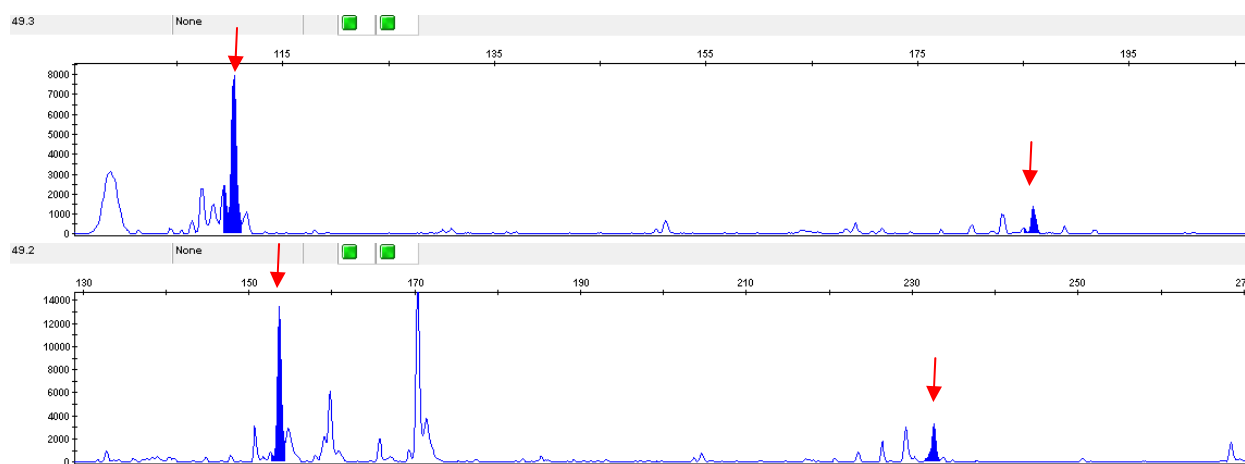
Amostra 047



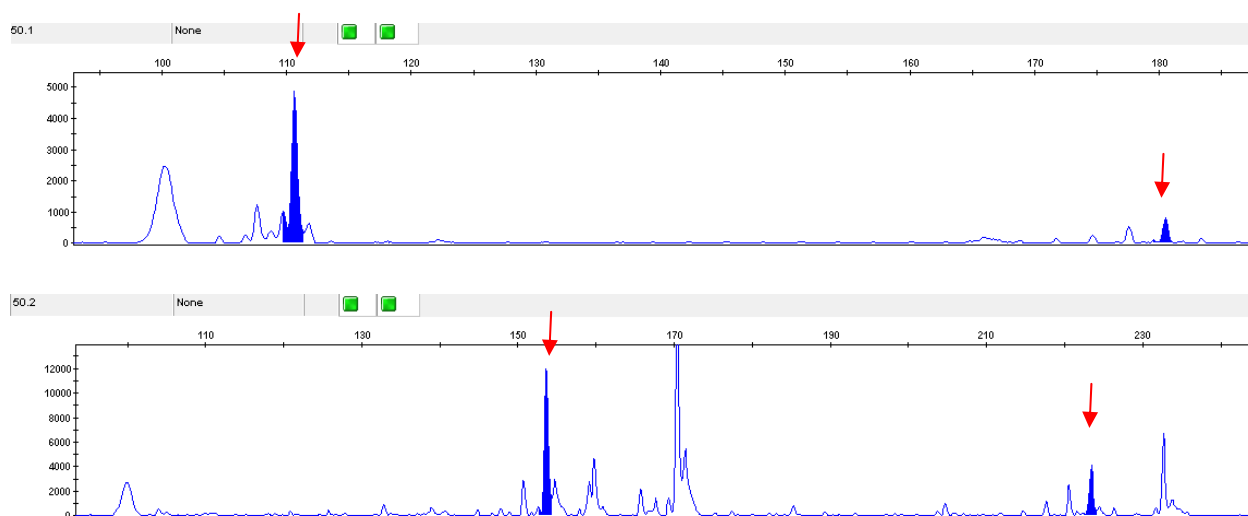
Amostra 048



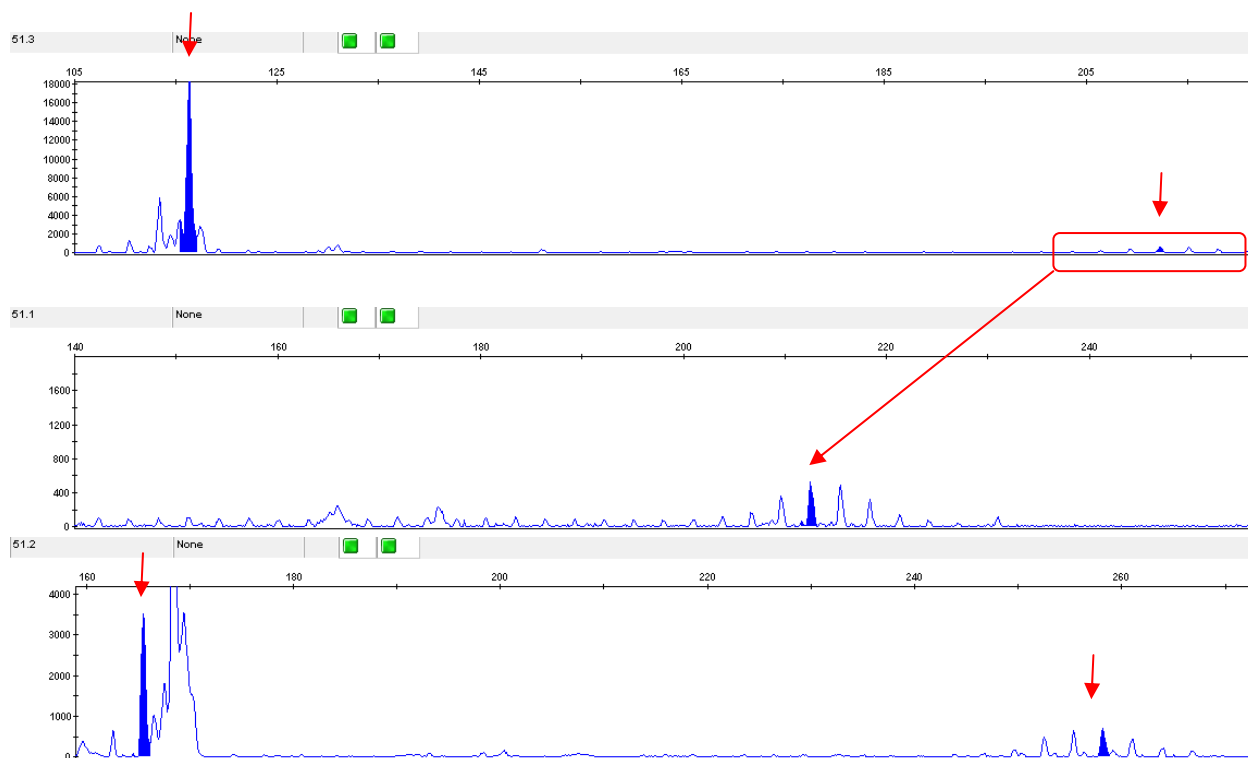
Amostra 049



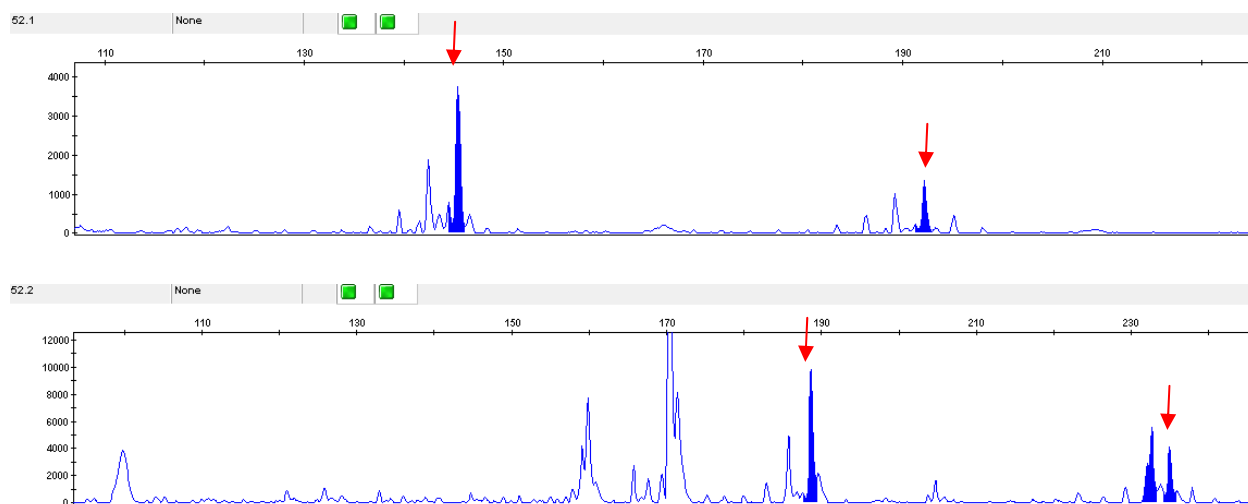
Amostra 050



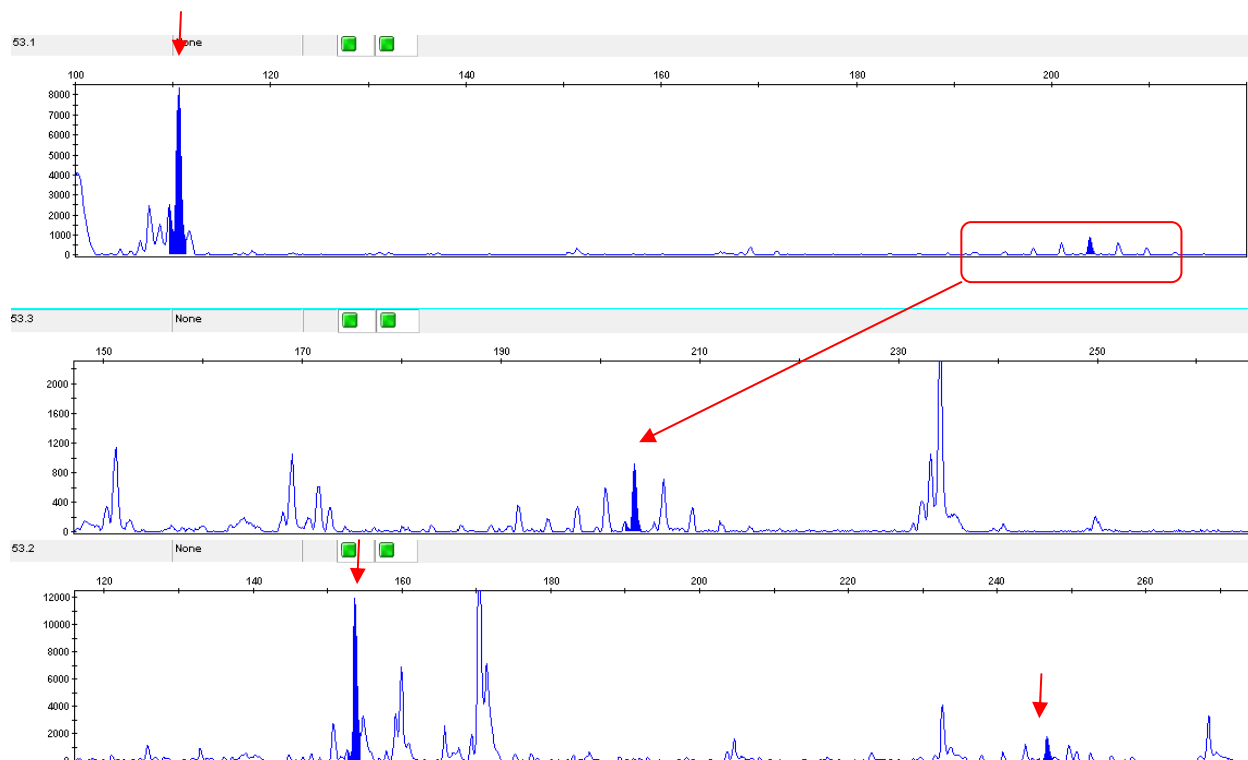
Amostra 051



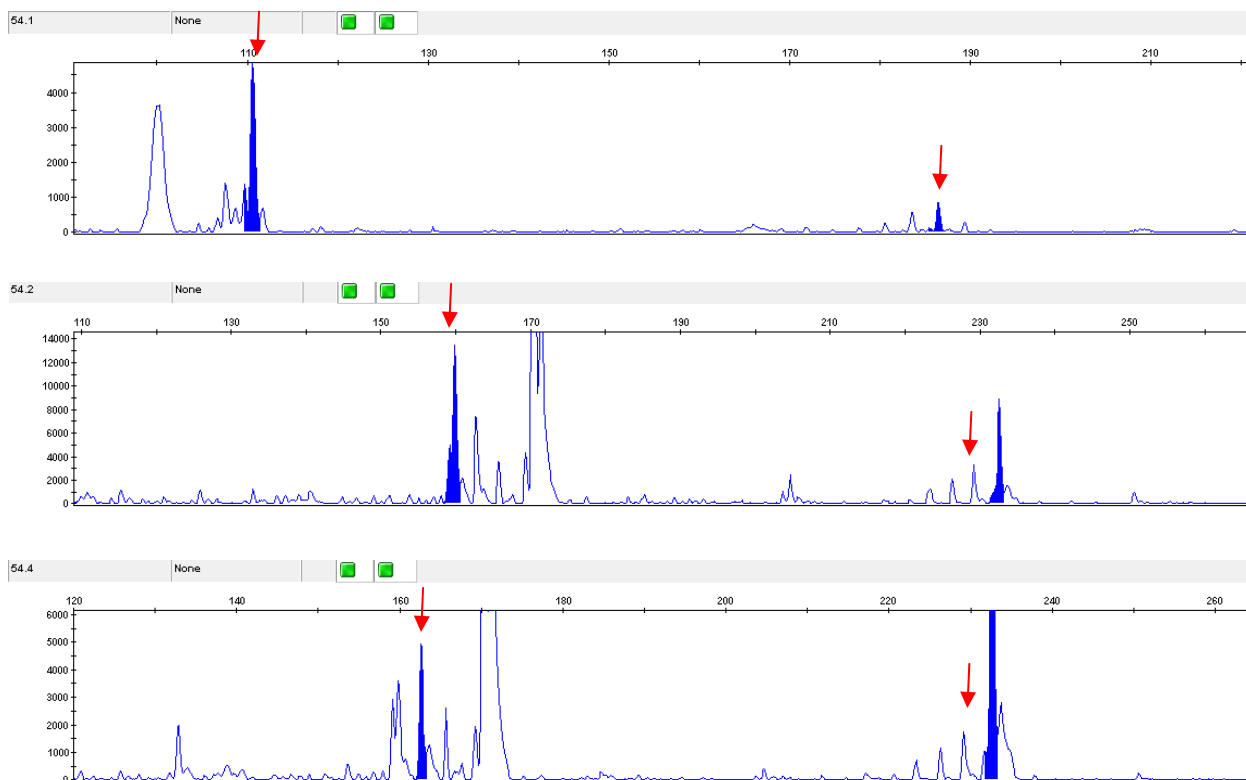
Amostra 052



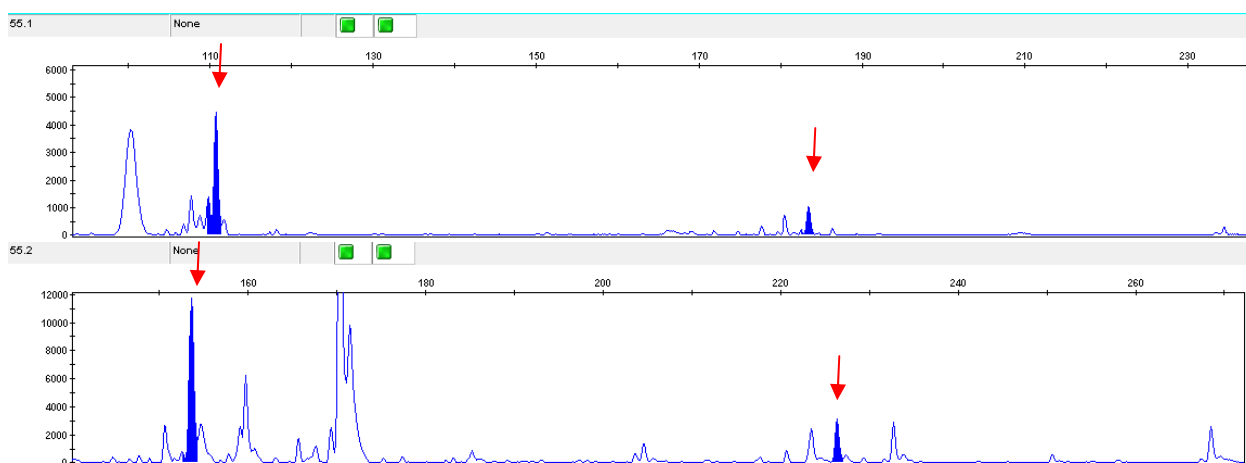
Amostra 053



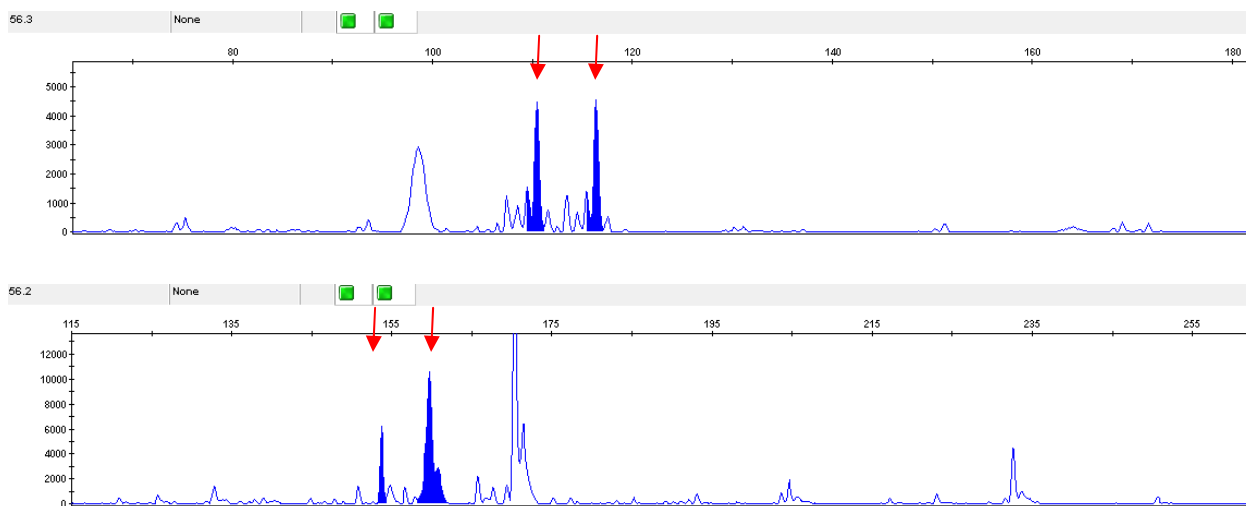
Amostra 054



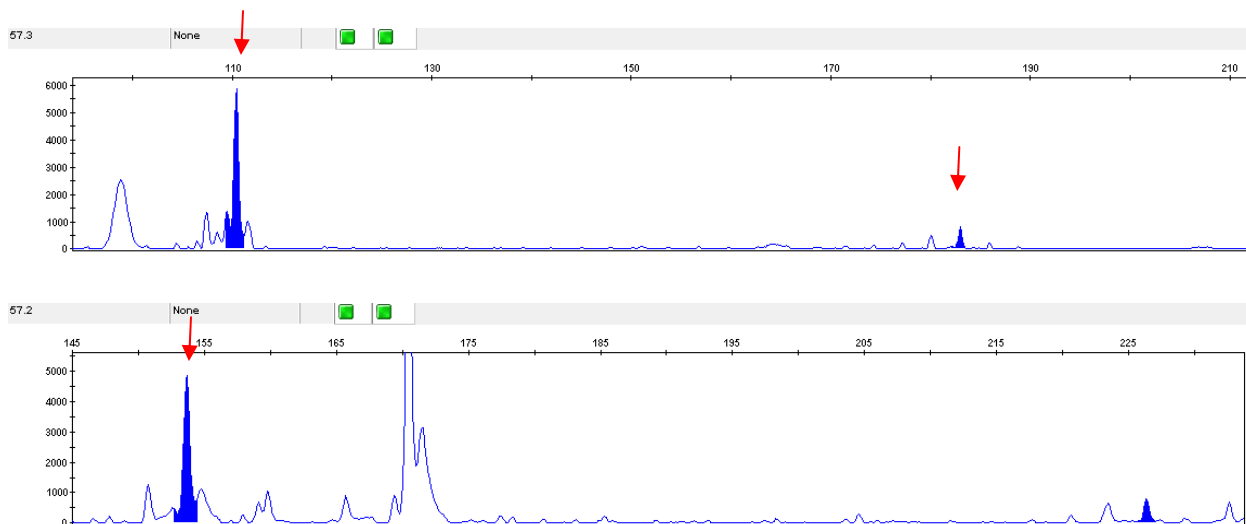
Amostra 055



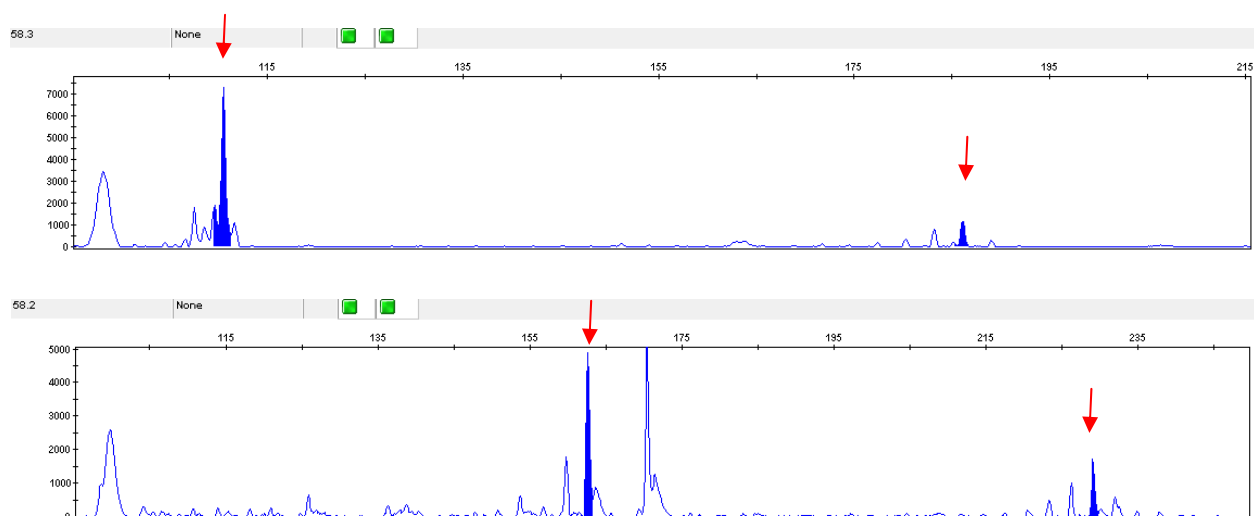
Amostra 056



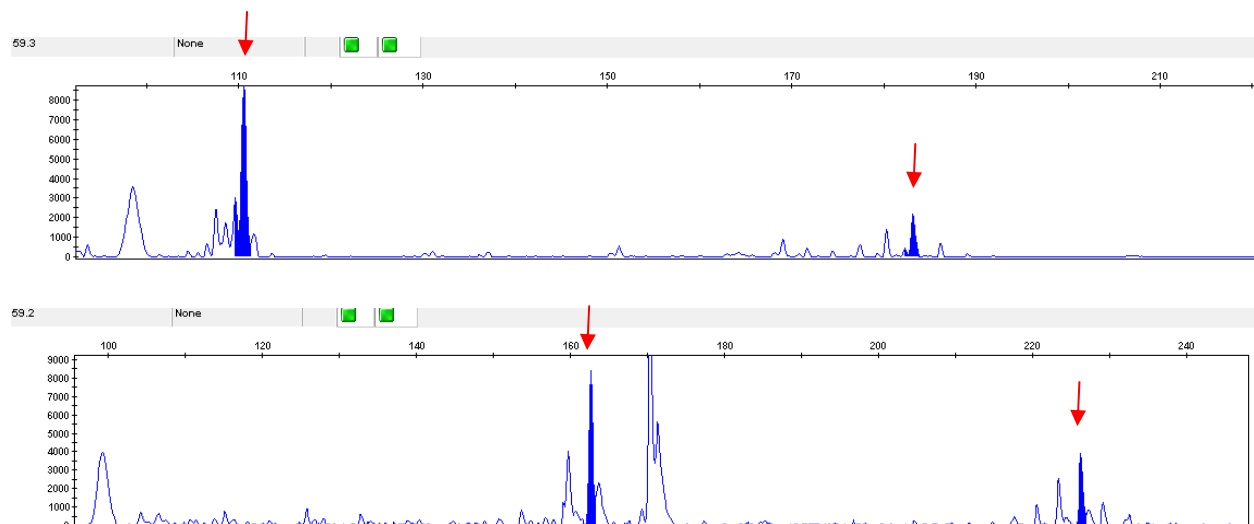
Amostra 057



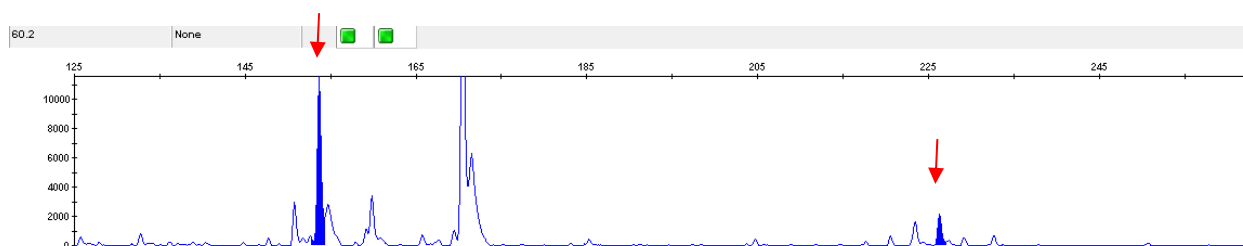
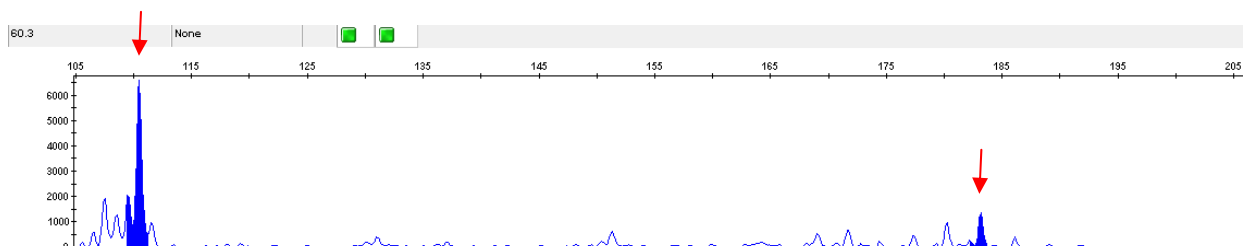
Amostra 058



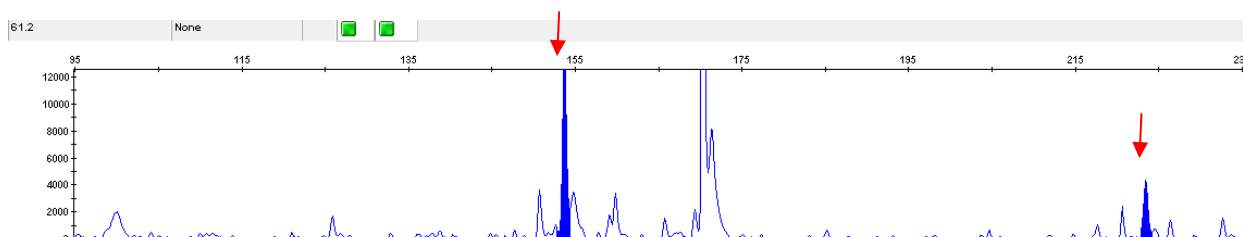
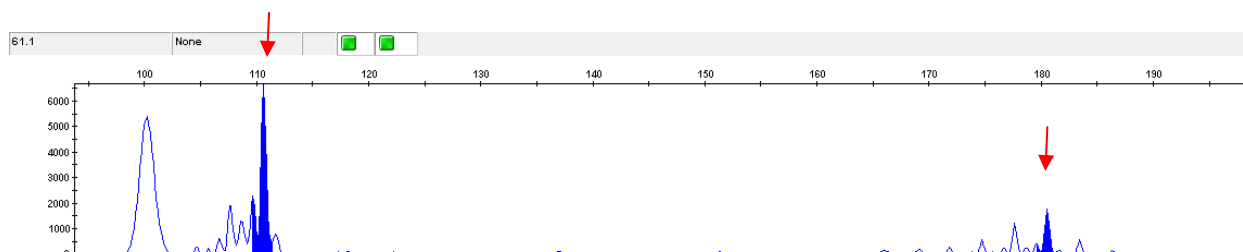
Amostra 059



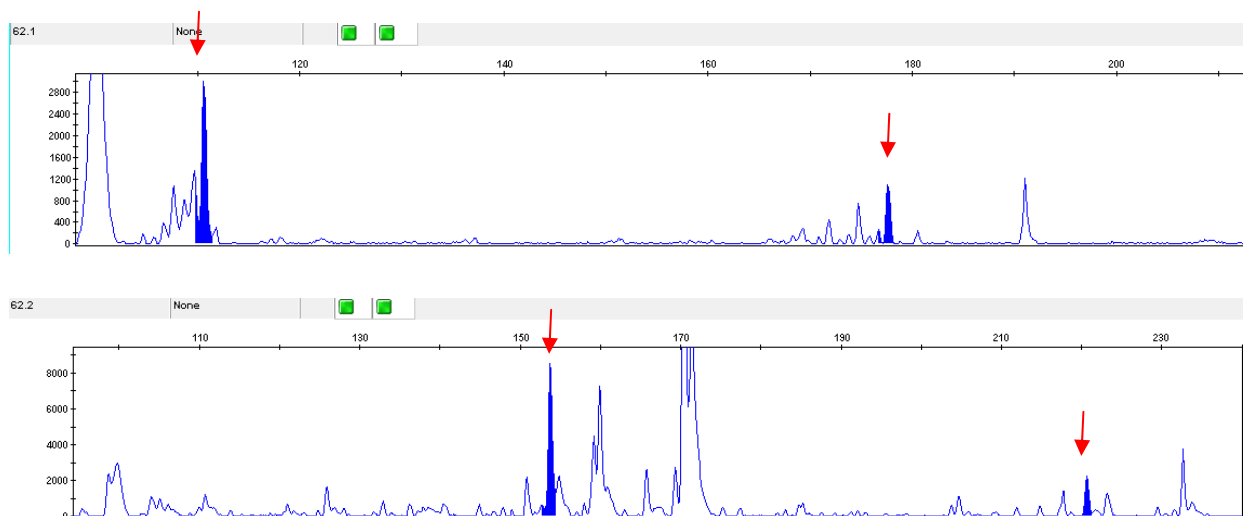
Amostra 060



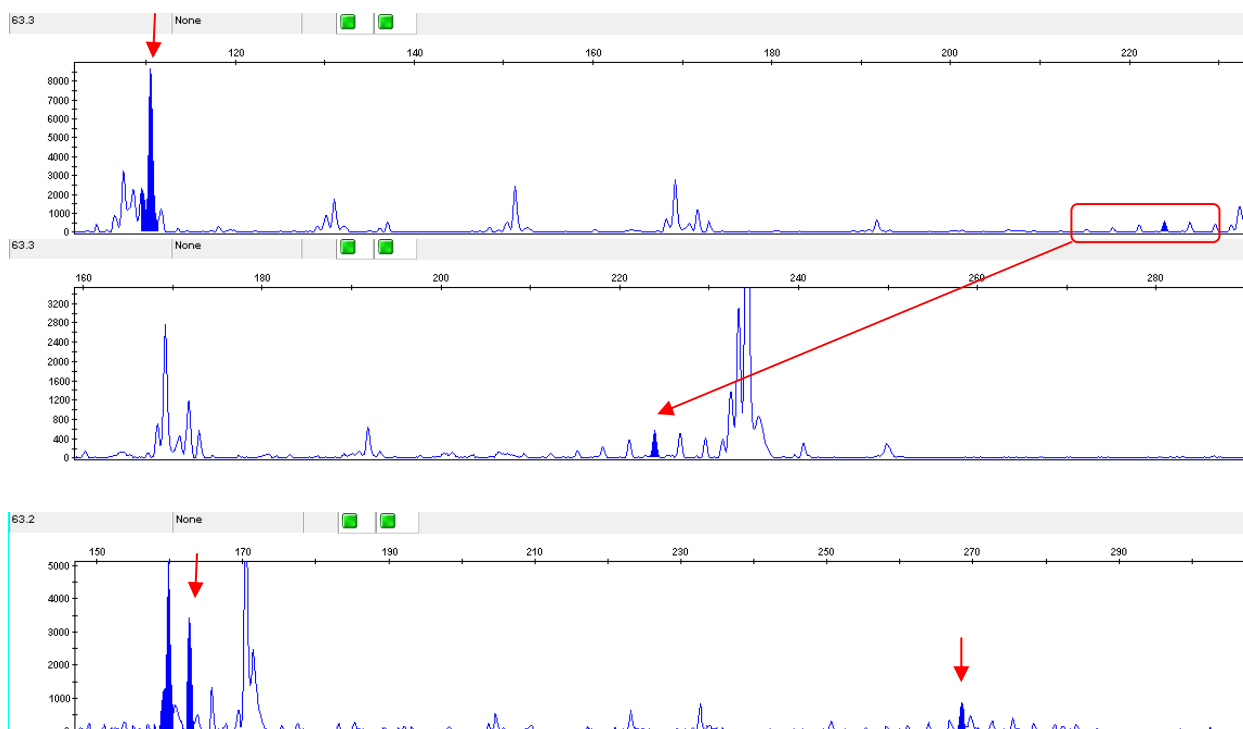
Amostra 061



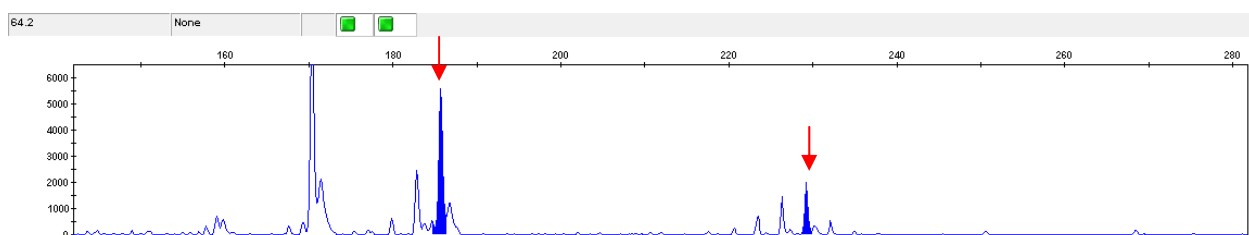
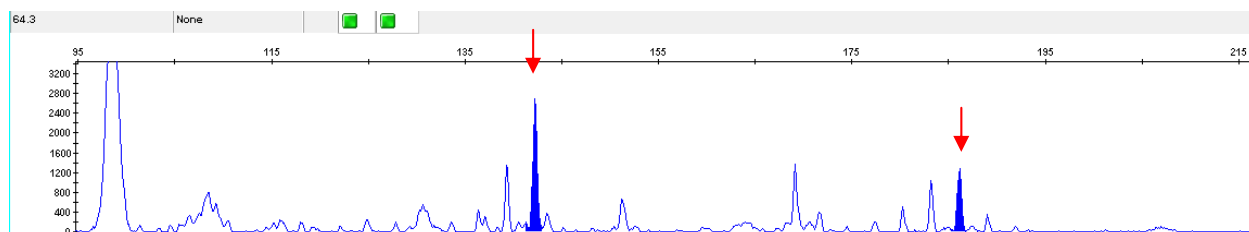
Amostra 062



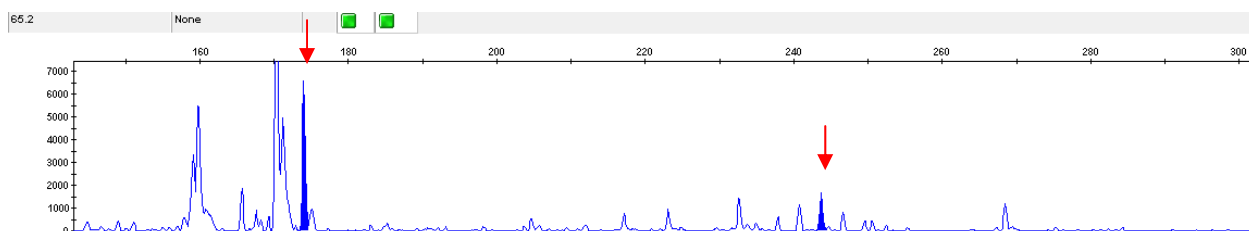
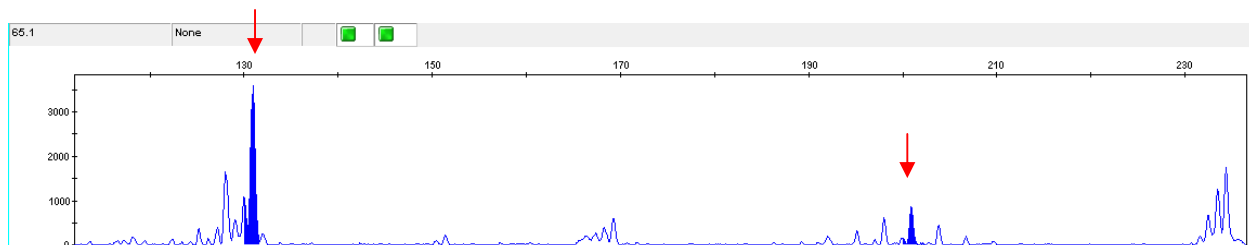
Amostra 063



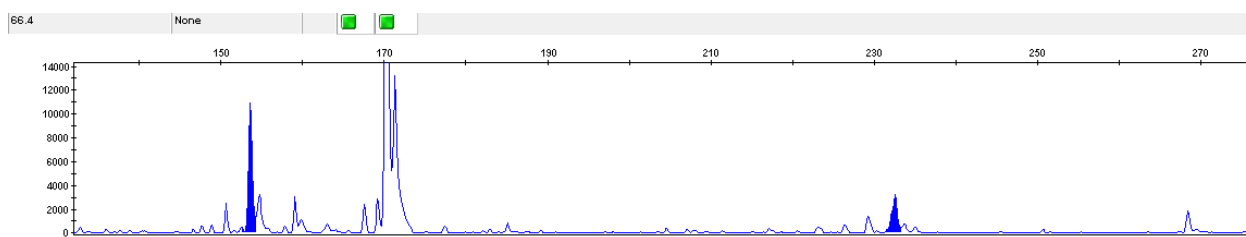
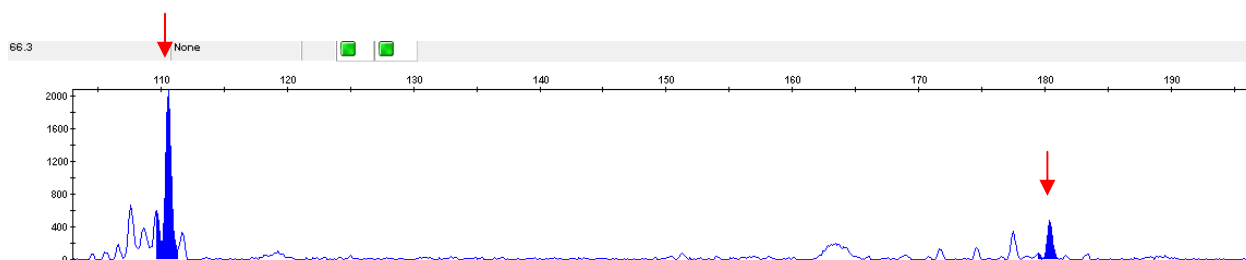
Amostra 064



Amostra 065



Amostra 066



ANEXO A - Carta de colaboração da Associação Brasil Huntington



Atibaia, 22 de dezembro de 2008.

À

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO
Programa de Pós-Graduação em Neurologia - Mestrado

A **ABH - Associação Brasil Huntington**, entidade de apoio às famílias portadoras da Doença de Huntington(DH) no Brasil, foi procurada pela biomédica **Luciana de Andrade Agostinho**, que relatou sua intenção de desenvolver o projeto de pesquisa **“Investigação de mutações novas em pacientes suspeitos e portadores de Doença de Huntington, provenientes da cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio”**.

Em nossa visão o objeto da pesquisa é de grande relevância para as famílias brasileiras com DH que não têm, no serviço público, acesso ao diagnóstico molecular que é, sem dúvida, uma ferramenta diagnóstica muito importante.

Gostaríamos, contudo, de salientar que os testes moleculares para a DH trazem consigo diversos dilemas éticos, por isso consideramos de extrema importância que haja o “aconselhamento genético” com apoio psicossocial para as famílias participantes da pesquisa, e que os testes sejam norteados pelas diretrizes éticas internacionais que foram traçadas por um comitê formado por representantes da *International Huntington Association* e da *World Federation of Neurology*. Bem como as brasileiras, elaboradas pela Sociedade Brasileira de Genética Médica.

Caso o projeto venha a ser aprovado, a ABH se encarregará de encaminhar correspondência da equipe de pesquisa, por e-mail e por correio convencional, para as famílias da região de abrangência do projeto cadastradas na entidade (atualmente 58 famílias), convidando-as a participar do mesmo.

Esse projeto beneficiará inicialmente as famílias cariocas mas, acreditamos, poderá se transformar em modelo a ser incorporado pelos serviços públicos através do Serviço Único de Saúde-SUS que recentemente aprovou a inclusão da Genética Clínica em seus serviços.

Atenciosamente
Walter Ribeiro da Silva
Presidente

R. Treze de Maio, 226 – Centro – Atibaia – SP – CEP 12940-720 – Tel: 11-4539-3110 – www.abh.org.br – abh@abh.org.br

ANEXO B - Aprovação do Comitê de ética e de pesquisa em seres humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MEMO CEP-HUGG / N° 015 / 2009

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009

À

Ilma. Profa. Carmen Lúcia Antão Paiva
Pesquisadora Responsável

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em reunião realizada em 12 de fevereiro de 2009, o projeto de pesquisa "Investigação de mutações novas em pacientes suspeitos e portadores de Doença de Huntington, provenientes da cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio", de número **03/2009** - CEP/HUGG, foi analisado e **APROVADO**, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96.

Informamos que, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96, cabe ao pesquisador apresentar ao CEP/HUGG os **relatórios parciais (semestrais) e final** do projeto aprovado.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro Eder Portari Filho
Coordenador do CEP/HUGG

ANEXO C - Documento de colaboração do projeto da cidade de Ervália - MG

Parecer do Comitê de Ética da FAMINAS - CEP-FAMINAS

Parecer: 038/2010

Titulo: Farmacoterapia e técnicas utilizadas no tratamento da Doença de Huntington e o Impacto causado pelos mesmos na Adesão do paciente ao tratamento.

O projeto encontra-se registrado no Comitê de Ética em Pesquisa da FAMINAS MURIAE, com o número 100331/0003.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FAMINAS, para análise das propostas metodológicas para o desenvolvimento da pesquisa.

Após análise do artigo e suas metodologias e justificativas propostas o Comitê de Ética da FAMINAS, aprova o artigo para sua realização enquanto projeto e os resultados para publicação em forma de artigo.

A pesquisadora Luciana de Andrade Agostinho será responsável pelas análises moleculares do projeto.

Muriaé, 10/04/2010