

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GENÉTICA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA DE HUNTINGTON

Jamile Yvis Santos de Alcantara¹ (Iniciação Científica - PIBIC), Iane dos Santos da Silva² (Mestrado - PPGGBM - CAPES) Luciana de Andrade Agostinho³ (Doutorado - PPGNEURO - CAPES), Carmen Lúcia de Antão Paiva^{1,2,3} (Orientadora)

1. Departamento de Genética e Biologia Molecular, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

3. Programa de Pós-Graduação em Neurologia (PPGNEURO), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ; CAPES

Palavras chave: Huntington; CAG; CCG

INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (DH) é uma doença autossômica dominante neurodegenerativa causada por uma expansão anormal do trinucleotídeo citosina-guanina-adenina (CAG) no primeiro exon no gene da Huntingtina, localizado no cromossomo 4p16.3. A expansão anormal leva a uma sequência poliglutâmica (poli Q) expandida na extremidade N-terminal da proteína huntingtina (htt). Esta expansão confere toxicidade à proteína mutante quando presentes mais de 35 repetições CAGs. A htt mutante forma agregados insolúveis, causa desregulação transcricional na região cortical e estriada, perturbações na homeostasia protéica e na morte neuronal (BENN et al., 2008; HODGES et al., 2006; ROSS, 2002; SCHAFFAR et al., 2004; WALKER, 2007; ZHAI et al. 2005; ZUCCATO et al., 2003;)

O alelo de repetição CAG pode ser classificado como de penetrância completa, se possui 40 ou mais repetições, de penetrância incompleta, quando possui entre 36 e 39 repetições; normal elevado, quando possui entre 27 e 35 repetições; ou normal, quando possui 26 ou menos repetições. Pais, mas não mães, que possuem alelos normais (muitas vezes referidos como “alelos intermediários” ou “alelos normais mutáveis”) têm o risco de transmitir um alelo DH com penetrância incompleta ou completa para a prole. Portanto, o pai corre o risco de ter um filho que, eventualmente, desenvolva HD, embora o próprio pai não venha a desenvolver a doença. Apesar de vários estudos sugerirem que os portadores masculinos de alelos normais altos têm uma baixa probabilidade de transmissão de um alelo expandido HD na faixa de penetrância completa, poucos estudos têm tentado estimar essa probabilidade (HENDRICKS et al., 2010)

Outra região polimórfica, adjacente à região de repetições CAG no gene HTT, é a região com repetições de trinucleotídeos CCG, que não está relacionada com a idade de início da DH. O perfil alélico das repetições CCG está relacionado às diferentes ancestralidades de uma população. Em uma população com descendência da Europa Ocidental ou da Índia há maior frequência dos alelos CCG com 7 unidades de repetição CCG, enquanto que na população Japonesa e Chinesa há maior frequência de 10 unidades de repetição CCG (COSTA et al., 2006; MOROVVATI et al. 2008; PRAMANIK et al., 2000; ZHANG et al. 2012).

OBJETIVO

Realizar o diagnóstico dos pacientes suspeitos de DH, avaliar o número de repetições CAG e CCG dos indivíduos suspeitos, correlacionar o número de repetições CAG encontradas com a idade de início da DH e identificar o número de repetições CCG.

METODOLOGIA

Os pacientes estudados foram provenientes do Ambulatório de Genética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro e do município de Ervália, Minas Gerais. Todos os pacientes assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” concordando com os termos da pesquisa.

Foram coletados de 1 a 3 mL de sangue periférico em tubos com o anticoagulante com EDTA para a análise molecular. O material biológico sangue foi armazenados em geladeira a 4 °C até que a extração do DNA fosse realizada.

Para a extração do DNA dos pacientes identificados como 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 e 97, foi utilizado o Blood Genomic Prep spin KIT da GE Healthcare Life Sciences.

Para amplificação da região de interesse com repetições CAG foi realizada a PCR (Polymerase Chain Reaction) das amostras 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94 e 95 empregando-se o primer forward HD1 (5' TGGCGACCTGGAAAAGCTGAT 3') e o primer reverse HD3 (5' GCGGTGGCGGCTGTGCTGCT 3'). Em cada tubo numerado foram adicionados: 1 µL do primer HD1, 1 µL do primer HD3, 6,25 µL de TaqGreen e 4,25 µL de DNA de cada amostra. Em seguida, os tubos foram levados para o termociclador e a PCR foi realizada conforme as etapas a seguir: Desnaturação - 94 °C por 5 minutos; seguidos de 35 ciclos de Desnaturação a 94 °C por 1 minuto, Hibridação do primer a 59,1 °C por 1 minuto, Extensão a 72 °C por 2 minutos; e Extensão final a 72 °C por 50 minutos.

Para amplificação da região CCG, a PCR seguiu a metodologia e ciclos de temperatura da PCR utilizada para amplificação da região CAG, com a exceção de no lugar de utilizar o primer HD3, utilizou-se o primer reverse HD4 (5' CGGCGGCGGCTGAGGAAGCTG 3').

Para se determinar o número de repetições CAG e CCG em cada alelo, realizou-se a eletroforese capilar por meio do analisador genético ABI

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

3500 da Applied Biosystems. 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 e os picos foram selecionados manualmente. Um dos critérios de seleção do pico foi o pico principal ser acompanhado de um, dois ou três picos denominados picos stutters. A diferença de tamanho, entre os picos stutters e os picos principais, deve ser de 3pb. Este fenômeno ocorre devido ao escorregamento da Taq polimerase na região com repetições in tandem de trinucleotídeos ao replicar a fita de DNA. Deve-se selecionar o do pico de maior altura quando o eletroferograma apresentar um perfil alélico de cinco ou mais picos com intervalos de 3 em 3 pb e a exclusão de fragmentos inespecíficos amplificados.

No cálculo do número de repetições CAG foi utilizada a seguinte expressão: $(A) - [(B) + (C)] / 3 =$ Número de repetições CAG, na qual A= Tamanho (pb) total do amplicon detectado; B= Tamanho (pb) da região de hibridação dos primers e C= Tamanho (pb) da região não polimórfica.

No cálculo indireto do número de repetições CCG foi utilizada a seguinte expressão: $(E) - [(F) + (G)] / 3 =$ Número de repetições CCG, na qual E= Tamanho (pb) total do amplicon detectado; F= Tamanho da região polimórfica CAG incluindo o primer forward e G= Tamanho (pb) do primer reverse.

RESULTADOS

Do total dos pacientes, 55,56% foram positivos para DH, sendo todos do gênero masculino e já apresentavam sintomas, e 44,44% foram negativos do gênero feminino. Do total de pacientes positivos, 80% eram portadores de um alelo de repetição CAG de penetrância completa, pois possuíam 40 ou mais repetições CAG, e 20% eram portadores de um alelo de repetição CAG de penetrância incompleta, por possuir entre 36 e 39 repetições. Em relação aos indivíduos normais, houve maior predomínio dos alelos com 13 unidades de repetição CAG e 15 unidades de repetição CAG. Os pacientes que possuíam um alelo com 40 ou 41 repetições CAG apresentaram os sintomas mais cedo (entre 34 e 53 anos) quando comparado ao paciente que possuía 38 repetições CAG no alelo, que começou a apresentar os sintomas aos 67 anos.

Em relação à região polimórfica CCG, todos os pacientes, com exceção do paciente 89, cujo diagnóstico não foi conclusivo, apresentaram pelo menos um alelo com 7 unidades de repetição CCG. O alelo CCG7 tem sido encontrado em alta frequência nos pacientes com DH de populações da Europa Ocidental ou naquelas populações que dela se originaram. Na análise das repetições CCG no paciente 89, foi observada a presença de mais de dois picos no resultado da eletroforese capilar para a região CCG, o que indica que possa ter ocorrido contaminação com DNA externo no momento da realização do PCR ou amplificação de fragmentos inespecíficos devido à presença de algum fator externo desconhecido. Portanto, torna-se necessário realizar a análise por PCR para definir o número exato de repetições CCG deste paciente.

CONCLUSÃO

Cinco indivíduos (55,56%) foram diagnosticados como portadores da Doença de Huntington e quatro foram diagnosticados como normais para DH. Dos indivíduos portadores da DH, os que possuíam maior número de repetições CAG (40 ou 41 repetições), apresentaram sintomas mais cedo do que o paciente que possuía menor número de repetição CAG (38 repetições) o que é esperado. Todos os pacientes, exceto um, cujo diagnóstico não foi conclusivo, indicam possuir a mutação para DH característica da população europeia.

REFERÊNCIAS

- BENN, C. L. et al. Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *The Journal of neuroscience*, v. 28, n. 0–33, 15 out. 2008.
- COSTA, M. D. C. et al. The CAG repeat at the Huntington disease gene in the Portuguese population: insights into its dynamics and to the origin of the mutation. *Journal of human genetics*, v. 51, n. 3, p. 189–95, jan. 2006.
- HENDRICKS, A. E. et al. Estimating the Probability of de novo HD cases from Transmissions of Expanded Penetrant CAG Alleles in the Huntington Disease Gene from Male Carriers of High Normal Alleles (27–35CAG). *American Journal of Medical Genetic Part A*, v. 149A, n. 7, p. 1375–1381, 2010.
- HODGES, A. et al. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human molecular genetics*, v. 15, n. 6, p. 965–77, 15 mar. 2006.
- MOROVVATI, S. et al. Analysis of CCG Repeats in Huntingtin Gene among HD Patients and Normal Populations in Japan. *Archives of Medical Research*, v. 39, n. 1, p. 131–133, jan. 2008.
- PRAMANIK, S. et al. Analysis of CAG and CCG repeats in Huntingtin gene among HD patients and normal populations of India. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 8, n. 9, p. 678–82, set. 2000.
- ROSS, C. A. Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*, v. 35, n. 5, p. 819–22, 29 ago. 2002.
- SCHAFFAR, G. et al. Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Molecular cell*, v. 15, n. 1, p. 95–105, 2 jul. 2004.
- WALKER, FO. Huntington's disease. *Lancet*, v. 369, n. 9557, p. 218–228. 2007
- ZHANG, B. et al. CCG polymorphisms in the huntingtin gene have no effect on the pathogenesis of patients with Huntington's disease in mainland Chinese families. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 312, n. 1, p. 92–96, jan. 2012
- ZHAI, W. et al. In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell* 123: 1241–1253. 2005
- ZUCCATO, C. et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics*, v. 35, n. 1, p. 76–83, set. 2003.