



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E
CELULAR

**INVESTIGAÇÃO DAS REPETIÇÕES TRINUCLEOTÍDICAS DOS
GENES *HTT* E *TBPEM* UMA COORTE DE INDIVÍDUOS
BRASILEIROS: CORRELAÇÃO COM A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA
DE HUNTINGTON**

IANE DOS SANTOS DA SILVA

RIO DE JANEIRO

AGOSTO, 2015

IANE DOS SANTOS DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS REPETIÇÕES TRINUCLEOTÍDICAS DOS
GENES *HTT* E *TBPEM* UMA COORTE DE INDIVÍDUOS
BRASILEIROS: CORRELAÇÃO COM A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA
DE HUNTINGTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana de Andrade Agostinho

RIO DE JANEIRO

AGOSTO, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E
CELULAR

FICHA CATALOGRÁFICA

A large, empty rectangular box with a black border, occupying the lower half of the page. It is intended for a catalog card or a detailed description of a document.

IANE DOS SANTOS DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS REPETIÇÕES TRINUCLEOTÍDICAS DOS
GENES *HTT* E *TBPEM* UMA COORTE DE INDIVÍDUOS
BRASILEIROS: CORRELAÇÃO COM A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA
DE HUNTINGTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Antão Paiva (ORIENTADORA)

Prof^a. Dr^a. Thereza Quírico - Santos (UFF)

Prof^a. Dr^a. Soniza Vieira Alves Leon (PPGNEURO – UNIRIO)

Prof^a. Dr^a. Joelma Freire de Mesquita (SUPLENTE) (COORDENADORA PPGBMC – UNIRIO)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cintia e Antonio.

Ao meu irmão, Igor e meu lindinho sobrinho Ian.

Ao meu namorado, Alexandre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir o dom da vida para meu aprendizado.

Aos meus pais, Cintia e Antonio, por todo carinho, amor, paciência e educação. Por me mostrarem a importância dos estudos e por sempre me incentivarem. Obrigada! Amo vocês!

Ao meu irmão, Igor, por ser um exemplo a seguir, por sempre persistir, por sempre nos orgulhar. Por ser o melhor irmão que alguém poderia ter!

Ao meu namorado, Alexandre, por todo amor, carinho, paciência, compreensão e companheirismo. Por estar comigo nos melhores e piores momentos! Obrigada meu amor!

Ao meu sobrinho Ian, por ser a alegria da casa! Por iluminar meus dias com apenas um sorriso!

À minha orientadora, professora Carmen Lúcia, por estar comigo desde a iniciação científica. Por me acompanhar durante toda esta jornada. Obrigada pela confiança, paciência, amizade, orientação e todos os ensinamentos!

À Luciana, minha coorientadora, por estar comigo desde a iniciação científica. Por toda paciência e orientação! Obrigada por todos os ensinamentos, amizade e a disponibilidade de sempre!

Às minhas amigas Alessandra, Erika, Luiza e Nathália, que apesar de não estarem todos os dias comigo, fazem parte da minha vida! Obrigada por me proporcionarem dias sempre muito divertidos e por aguentarem minhas manias, por tudo que aprendi e continuo aprendendo com vocês! Obrigada por sempre me orgulharem!

À Catielly, Thays, Mayra e Juliana por toda ajuda e amizade.

À Professora Joelma Mesquita, por ter aceitado ser minha revisora e acompanhar todo esse projeto.

Às colegas da plataforma de sequenciamento de DNA do IOC/FIOCRUZ/RJ.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite para fazer parte.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à FAPERJ pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença genética rara, neurodegenerativa, progressiva e fatal, causada pelo número expandido de repetições CAG no gene *HTT*. Conforme a literatura, o número de repetições CAG deste gene explica aproximadamente 70% da idade de início da DH. Os outros 30% são atribuídos a genes modificadores e/ou a fatores ambientais. O gene *TBP* codifica a proteína de ligação à região *TATA Box* e possui uma região de repetição de CAG/CAA que, quando expandida, ocasiona a SCA17 (ataxia espinocerebelar 17). A proteína TBP normal já foi encontrada no cérebro de pacientes com DH junto aos agregados de huntingtina. As repetições de nucleotídeos CAG/CAA normais (>35 repetições) do gene *TBP* já foram associadas com risco de esquizofrenia e também com a modulação da idade de início da SCA7 (ataxia espinocerebelar 7). O objetivo deste estudo foi investigar as repetições trinucleotídicas dos genes *HTT* e *TBP*, assim como, relacionar as repetições CAG do gene *HTT* e CAG/CAA do gene *TBP* com a idade relatada de início da doença de Huntington em uma coorte brasileira. Foram investigados molecularmente 104 indivíduos: 72 foram positivos e 32 negativos para DH. Nos indivíduos molecularmente negativos, os alelos não expandidos do *HTT* variaram entre 12 a 30 repetições CAG (média de 19 ± 4 CAG e mediana 17) e a maior frequência foi do alelo com 17 CAG. Em indivíduos molecularmente positivos, os alelos não expandidos do *HTT* variaram entre 14 a 30 CAG (média de 19 ± 4 repetições e mediana 17) e o alelo mais frequente possuía 17 CAG. As repetições dos alelos expandidos variaram entre 39 a 62 CAG (média de 45 ± 4 e mediana 44) e o alelo expandido mais frequente apresentou 44 repetições. O número de repetições CAG do *HTT* na amostra estudada mostrou influenciarem 66% a idade de início da DH (r de Pearson = - 0,81, $R^2=0,66$, $p<0,05$). Nos alelos *TBP* de indivíduos molecularmente negativos para DH, as repetições CAG/CAA variaram de 27 a 37 repetições (média de 33 ± 2 CAG e mediana 34), sendo o alelo mais frequente aquele com 34 CAG/CAA. Nos indivíduos molecularmente positivos para DH as repetições CAG/CAA variaram de 23 a 38 repetições (média de 34 ± 2 e mediana 34) e o alelo mais frequente apresentou 36 repetições CAG/CAA. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de repetições do alelo *TBP* entre indivíduos molecularmente positivos e negativos para DH ($p>0,05$). Não houve aparentemente influência do número de repetições CAG/CAA do gene *TBP* na idade de início relatada dos sintomas da DH (r de Pearson = 0,2, $R^2=0,04$, $p>0,05$). Foram construídos 19 heredogramas para análise intra e intergeracional das repetições CAG do *HTT* e CAG/CAA do *TBP*. Os alelos *HTT* expandidos apresentaram maior expansão intergeracional quando a origem foi paterna e a maior diferença de repetições intrageracionais também se deu quando a origem foi paterna. Quando se fez a investigação da transmissão intergeracional dos alelos *TBP*, não foi possível se afirmar a origem parental dos alelos devido a uma diferença de apenas um trio de nucleotídeos no número de repetições de uma geração à outra. A análise intrageracional das repetições CAG/CAA do *TBP* revelou que a diferença entre irmãos é menor do que aquelas observadas para as repetições CAG do *HTT*.

Palavras-chave: Doença de Huntington, *TBP*, *HTT*, gene modificador

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a rare genetic, neurodegenerative, progressive and fatal disease caused by an expanded number of CAG repeats in the *HTT* gene. According with literature, the size of CAG repeats accounts for about 70% of the variation of the onset age of the disease. The others 30% are assigned to modifier genes and/or environmental factors. *TBP* gene encodes for a TATA box binding protein and has a CAG/CAA repeat region that, when expanded, causes SCA17 (Spinocerebellar ataxia type 1). The normal TBP protein has been found in brains of patients with HD. Normal CAG/CAA repeats of the *TBP* gene have been associated with risk of schizophrenia and also with modulation of age of onset in SCA7. The aim of this study was to investigate the trinucleotidic repeats of *HTT* and *TBP* genes, as well as to correlate CAG repeats of *HTT* and CAG/CAA repeats of *TBP* gene with the age of onset of symptoms in Huntington's disease, in a cohort of Brazilian subjects. We investigated 104 individuals who were molecularly tested: 72 tested positive for HD and 32 tested negative. In individuals, molecularly tested as negative, the number of CAG repeats in unexpanded *HTT* ranged from 12 to 30 (mean 19 ± 4 CAG and median 17) CAG, the most frequent allele had 17 repeats. Regarding the molecularly tested as positive individuals, their unexpanded alleles varied between 14-30 CAG repeats (mean 19 ± 4 CAG and median 17) and their most frequent allele had 17 repeats. In expanded alleles, CAG repeats ranged from 39 to 62 (mean 45 ± 4 and median 44) and the most frequent allele had 44 repeats. The size of *HTT* CAG repeats contributed to 66% of the age of onset of HD (Pearson's $r = -0.81$, $R^2 = 0.66$, $p < 0.05$). Concerning the *TBP* alleles, molecularly negative individuals had CAG/CAA repetitions ranging from 27 to 37 (mean 33 ± 2 and median 34), and the molecularly positive individuals had CAG/CAA ranging from 23 to 38 units (mean 34 ± 2 and median 34). The most frequent allele in molecularly negative and positive individuals were, respectively, 34 and 36 CAG/CAA repeats. There was no statistically significant difference in number of repetitions of *TBP* allele between those individuals ($p > 0.05$). Furthermore, there was no statistically correlation between age of onset of symptoms and the size of the *TBP* polymorphic region (Pearson's $r = 0.2$, $R^2 = 0.04$, $p > 0.05$). We draw 19 pedigrees for intra and intergenerational analysis to show the variation of *HTT* CAG and *TBP* CAG/CAA alleles. Expanded *HTT* alleles showed a higher expansion in the intergenerational pedigrees with paternal inheritance and the largest intragenerational difference also occurred in paternal transmission. When we perform investigation of intergenerational transmission of *TBP* alleles, it was difficult to say the parental origin of the alleles due to a difference of only one nucleotide trio in the number of repeats from one generation to another. The analysis of the variation of *TBP* CAG/CAA repeats within a sibling revealed that this variation was smaller than that observed for the *HTT* CAG repeats.

Key-words: Huntington's Disease, *TBP*, *HTT*, modifier gene.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Estruturas associadas a regiões de repetições nucleotídicas (MIRKIN, 2006)... | 15 |
| Figura 1.2: Modelo sugerido para o aparecimento de mutações dinâmicas: expansões ou contrações em regiões repetitivas pelo mecanismo de deslizamento do DNA (ELLEGREN, 2000). | 16 |
| Figura 1.3: Esquema de localização de repetições nucleotídicas de algumas doenças humanas (VAN EYK E RICHARDS, 2012)..... | 21 |
| Figura 1.4: Prevalência estimada em alguns países (WARBY et al., 2011). | 22 |
| Figura 1.5: Artigo Original “On Chorea” de George Huntington (HUNTINGTON, 1872). | 24 |
| Figura 1.6: Diagrama das repetições CAG, localizadas no exon 1 do gene HTT (BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014) | 26 |
| Figura 1.7: Representação das regiões da proteína huntingtina (CATTANEO, 2005)..... | 27 |
| Figura 3.1: Etapas da extração de DNA. (<i>Kit Blood Genomic Prep Spin</i> , GE Healthcare).... | 36 |
| Figura 3.2: Eletroferograma fornecido pelo software <i>GeneMapper</i> | 39 |
| Figura 3.3: Regiões do produto de PCR do gene <i>TBP</i> | 40 |
| Figura 4.1: Análise dos parâmetros % CG e temperatura dos primers por meio do programa OligoCalc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). | 47 |
| Figura 4.2: Análise dos potenciais de formação de dímeros e grampos pelos <i>primers</i> no programa <i>OligoCalc</i> (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). | 47 |
| Figura 4.3: PCR <i>in silico</i> no site UCSC Genome Bioinformatics (https://genome.ucsc.edu/) | 47 |
| Figura 4.4: Eletroferogramas dos <i>amplicons</i> referentes às regiões polimórficas CAG/CAA do gene <i>TBP</i> | 48 |
| Figura 4.5: Legenda para os símbolos dos heredogramas. | 57 |
| Figura 4.6: Heredograma dos indivíduos 001 e 020..... | 58 |
| Figura 4.7: Heredograma dos indivíduos 002 e 084..... | 58 |
| Figura 4.8: Heredograma Indivíduos 006, 066, 072 e 101 | 59 |
| Figura 4.9: Heredograma dos indivíduos 005 e 022..... | 60 |
| Figura 4.10: Heredograma dos indivíduos 009, 012, 017 e 052..... | 61 |
| Figura 4.11: Heredograma dos indivíduos 014, 015 e 018..... | 61 |
| Figura 4.12: Heredograma dos indivíduos 019 e 078..... | 62 |
| Figura 4.13: Heredograma dos indivíduos 021, 073 e 074..... | 62 |
| Figura 4.14: Heredograma dos indivíduos 024, 025, 035, 037, 040 e 044. | 63 |
| Figura 4.15: Heredograma dos indivíduos 028, 029, 045, 046, 047, 048 e 051..... | 63 |
| Figura 4.16: Heredograma dos indivíduos 23, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 41, 42, 43, 49, 75 e 79..... | 64 |
| Figura 4.17: Heredograma dos indivíduos 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 e 68..... | 65 |
| Figura 4.18: Heredograma dos indivíduos 62 e 93..... | 66 |
| Figura 4.19: Heredograma dos indivíduos 89, 99 e 100..... | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.20: Heredograma dos indivíduos 63, 67 e 86..... | 68 |
| Figura 4.21: Heredograma dos indivíduos 91 e 92..... | 68 |
| Figura 4.22:Heredograma dos indivíduos 94 e 95..... | 69 |
| Figura 4.23:Heredograma dos Indivíduos 102 e 103 | 69 |
| Figura 4.24:Heredograma dos Indivíduos 50, 82 e 85..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1: Repetições de nucleotídeos e doenças humanas (Parte 1/4) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010)..... | 17 |
| Tabela 3.1: Primers utilizados para amplificação da região CAG/CAA do gene TBP | 38 |
| Tabela 3.2: Cálculo realizado para determinação do número de repetições trinucleotídicas CAG/CAA do gene TBP..... | 40 |
| Tabela 4.1: Frequência de genótipos dos alelos <i>TBP</i> de indivíduos molecularmente negativos para DH | 52 |
| Tabela 4.2: Frequência de genótipos dos alelos <i>TBP</i> de indivíduos molecularmente positivos para DH e a idade de início para cada genótipo | 53 |
| Tabela 4.3: Valores obtidos pelo modelo de regressão..... | 54 |
| Tabela 4.4: Coeficientes de regressão e nível de significância. | 54 |
| Tabela 4.5: Frequência de genótipos dos alelos <i>HTT</i> e alelos <i>TBP</i> associados, em indivíduos molecularmente negativos para DH..... | 55 |
| Tabela 4.6: Frequência dos genótipos dos alelos <i>TBP</i> e <i>HTT</i> associados, em indivíduos molecularmente positivos para DH e idade de início..... | 56 |
| Tabela 4.7: Análise intergeracional dos alelos <i>HTT</i> expandidos | 71 |
| Tabela 4.8: Análise intrageracional (entre irmãos) dos alelos <i>HTT</i> expandidos | 71 |
| Tabela 4.9: Análise intergeracional dos alelos <i>TBP</i> | 72 |
| Tabela 4.10: Análise intrageracional (entre irmãos) dos alelos <i>TBP</i> | 73 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 4.1: Resultado do teste molecular para diagnóstico de DH..... | 42 |
| Gráfico 4.2: Número de alelos <i>HTT</i> detectados em indivíduos genotipicamente negativos para expansões CAG (n = 64 alelos) | 43 |
| Gráfico 4.3: Número de alelos <i>HTT</i> detectados em indivíduos genotipicamente positivos para expansões CAG (n =144 alelos; 72 normais e 72 expandidos)..... | 44 |
| Gráfico 4.4: Transmissão relatada do alelo expandido..... | 45 |
| Gráfico 4.5: Influência do número de repetições CAG expandidas do gene <i>HTT</i> na idade de início da doença (n=64). | 46 |
| Gráfico 4.6: Número de alelos <i>TBP</i> detectados em indivíduos genotipicamente negativos para DH (n = 64 alelos)..... | 49 |
| Gráfico 4.7: Número de alelos <i>TBP</i> detectados em indivíduos genotipicamente positivos para DH (n=144)..... | 49 |
| Gráfico 4.8: Comparação das medianas dos números de repetições CAG/CAA dos alelos <i>TBP</i> entre indivíduos diagnosticados molecularmente como negativos e positivos para DH. | 50 |
| Gráfico 4.9: Influência do número de repetições CAG/CAA do maior alelo <i>TBP</i> na idade de início da DH (n=64)..... | 51 |
| Gráfico 4.10: Comparação entre idade de início de indivíduos afetados pela DH que possuem pelos menos um dos alelos com ≤ 35 repetições CAG/CAA e indivíduos com >35 repetições CAG/CAA em seus dois alelos. ($p>0,05$, n de indivíduos com ≤ 35 repetições = 31; n de indivíduos com >35 repetições=33)..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – trifosfato de adenosina
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
DH – Doença de Huntington
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – desoxinucleotídeo
DRPLA - Atrofia DentatorubroPalidolusiana
EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
GABA - ácido gamaaminobutírico
GRIK2 – gene de umas das subunidades do receptor de glutamato
HEAT - fator de alongamento da huntingtina³, subunidade da proteína fosfatase 2A e a quinaseTor1
HDL – Doenças semelhantes à doença de Huntington (Huntington DiseaseLike)
HTT – gene da Huntingtina
HTT – proteína Huntingtina
kb – kilobase
kDa – kilodalton
JPH3 - gene da Junctofilina-3
mM – milimolar
NASA - Administração Nacional do Espaço e da Aeronáutica
(nationalaeronauticsandspaceadministration)
NES - sinalização de exportação nuclear
ng – nanogramas
PCR – reação da cadeia em polimerase
pMols – picomoles
PoliP – região de prolinas
PoliQ - região de glutaminas
PRNP - gene da proteína priônica
SCA – Ataxia Espinocerebelar
SNC – Sistema Nervoso Central
SNPs – polimorfismo de nucleotídeo único
TBP – gene da proteína de ligação a região TATA
TBP – proteína de ligação a região TATA
TOR - proteína alvo da rapamicina
uL- microlitros
uM – micromolar
UTR – região não traduzida

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 | Mutações dinâmicas e repetições nucleotídicas | 15 |
| 1.2 | Doença de Huntington | 22 |
| 1.2.1 | Breve histórico da doença de Huntington | 23 |
| 1.2.2 | Aspectos genéticos gerais da doença de Huntington..... | 25 |
| 1.2.3 | Huntingtina e a neuropatogênese da doença de Huntington..... | 27 |
| 1.2.4 | Sintomas, tratamentos e perspectivas | 29 |
| 1.3 | Modificadores genéticos da idade de início doença de Huntington e o gene <i>TBP</i> como modificador | 32 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 | Objetivo geral | 34 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 34 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | Coleta de sangue | 35 |
| 3.2 | Extração de DNA..... | 36 |
| 3.3 | PCR..... | 37 |
| 3.3.1 | Amplificação da região CAG do gene <i>HTT</i> | 37 |
| 3.3.2 | Amplificação da região CAG/CAA do gene <i>TBP</i> | 37 |
| 3.4 | Detecção dos fragmentos (<i>amplicons</i>) produzidos pela PCR | 38 |
| 3.5 | Cálculo do número de repetições trinucleotídicas..... | 39 |
| 3.5.1 | Cálculo do número de repetições CAG do gene <i>HTT</i> | 39 |
| 3.5.2 | Cálculo da região CAG/CAA do gene <i>TBP</i> | 40 |
| 3.6 | Análise estatística..... | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 42 |
| 4.1 | Indivíduos investigados | 42 |
| 4.2 | Investigação dos alelos <i>HTT</i> | 42 |
| 4.2.1 | Teste molecular de DH nos indivíduos da amostra..... | 42 |
| 4.2.2 | Alelos CAG do gene <i>HTT</i> de indivíduos molecularmente negativos para DH . | 43 |
| 4.2.3 | Alelos CAG do gene <i>HTT</i> de indivíduos molecularmente positivos para DH.... | 44 |
| 4.2.4 | Influência das repetições CAG do gene <i>HTT</i> na idade de início da DH | 45 |
| 4.3 | Investigação dos alelos <i>TBP</i> | 46 |
| 4.3.1 | Análise dos <i>primers</i> e da PCR..... | 46 |
| 4.3.2 | Alelos <i>TBP</i> de indivíduos molecularmente negativos e positivos para DH | 48 |
| 4.3.3 | Influência das repetições CAG/CAA do gene <i>TBP</i> na idade de início da DH .. | 50 |
| 4.3.4 | Genótipos <i>TBP</i> | 52 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.4 | Correlação entre o número de repetições CAG dos alelos <i>HTT</i> e CAG/CAA dos alelos <i>TBP</i> e a idade de início da DH..... | 53 |
| 4.4.1 | Regressão múltipla..... | 53 |
| 4.4.2 | Genótipos <i>HTT</i> e <i>TBP</i> associados..... | 54 |
| 4.5 | Análises intra e intergeracional das repetições CAG dos alelos <i>HTT</i> e CAG/CAA dos alelos <i>TBP</i> | 57 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 74 |
| 5.1 | Investigação do número de repetições dos alelos <i>HTT</i> e sua influência na idade de início da DH..... | 74 |
| 5.2 | Investigação do número de repetições dos alelos <i>TBP</i> e sua influência na idade de início da DH..... | 76 |
| 5.3 | Análises inter e intrageracionais das repetições dos alelos <i>HTT</i> e <i>TBP</i> | 79 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 82 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |
| | APÊNDICE A - Resultados da análise de fragmentos <i>TBP</i> por eletroforese capilar (eletroferogramas) de cada indivíduo..... | 91 |
| | APÊNDICE B – Artigo publicado como co-autora em Julho de 2015..... | 134 |
| | APÊNDICE C – Trabalho apresentado no “Miami 2014 Winter Symposium - The Molecular Basis of Brain Disorders”..... | 141 |
| | APÊNDICE D – Questionário de coleta de dados para os indivíduos que participaram do estudo..... | 142 |
| | APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 143 |
| | ANEXO I – Carta de colaboração com ABH..... | 146 |
| | ANEXO II – Aprovação do comitê de ética..... | 147 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mutações dinâmicas e repetições nucleotídicas

Mutações dinâmicas são alterações no DNA caracterizadas por repetições de nucleotídeos altamente instáveis, que podem variar em número ao longo das gerações (RICHARDS E SUTHERLAND, 1992). As taxas de mutação associadas a essas repetições são geralmente de 10 a 100 mil vezes maior do que a média das taxas de mutações em outras partes do genoma humano (GEMAYEL et al., 2010).

A presença de estruturas incomuns nas regiões de repetições de nucleotídeos, como tríplex, tetraplex e grampos, é a principal causa da instabilidade associada a esse tipo de mutação (figura 1.1). Tais estruturas podem interferir nos eventos de replicação, transcrição, recombinação e reparo (MIRKIN, 2006; LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010; KIM E MIRKIN, 2013).

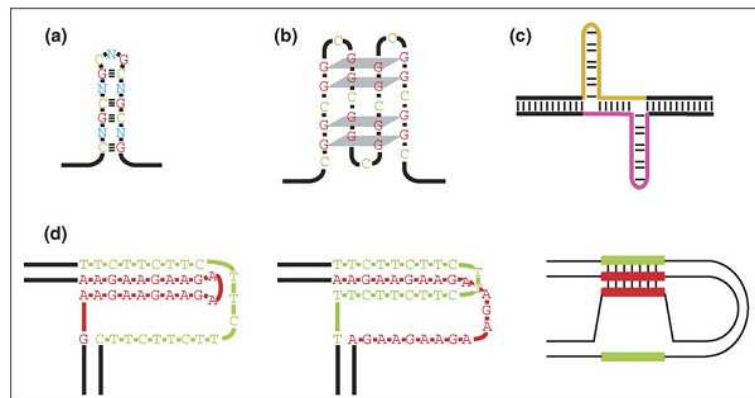


Figura 1.1: Estruturas associadas a regiões de repetições nucleotídicas (MIRKIN, 2006).

Legenda: a) Grampos imperfeitos compostos por repetições (CNG)_n; (b) tetraplex composto por repetições (CGG)_n; (c) Deslizamento do DNA ocasionado por formações de grampos; (d) tríplex formado por repetições (GAA)_n. Purinas são vermelhas e pirimidinas verdes. DNA que flanqueia região de repetição é mostrado em preto.

Um dos mecanismos que tentam explicar a ocorrência de expansões e contrações de repetições de nucleotídeos é o deslizamento do DNA que ocorre durante a replicação. O deslizamento na replicação se refere ao alinhamento errado das fitas de DNA durante a extensão da região repetitiva que está sendo copiada. No momento da dissociação entre as fitas, uma estrutura secundária (grampo) pode ser formada na nova fita sintetizada ou então na fita molde. Caso o grampo ocorra na fita filha, uma repetição será adicionada no próximo ciclo de replicação. Já a

ocorrência da estrutura de grampo na fita molde ocasionará a perda de uma repetição nucleotídica (Figura 1.2) (ELLEGREN, 2000; LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010; KIM E MIRKIN, 2013).

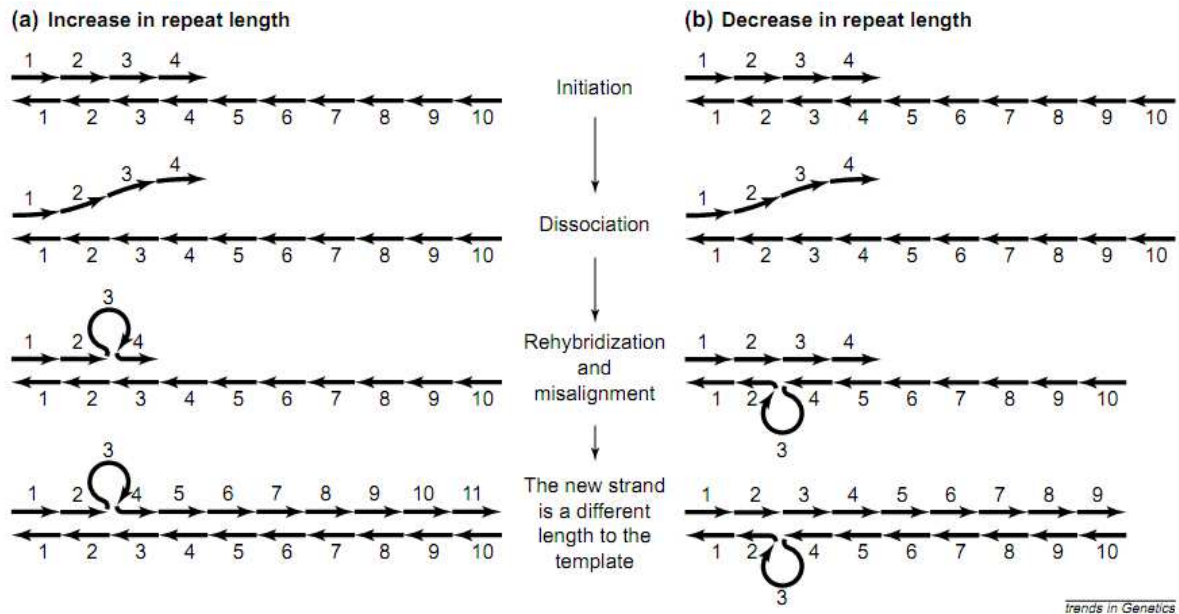


Figura 1.2: Modelo sugerido para o aparecimento de mutações dinâmicas: expansões ou contrações em regiões repetitivas pelo mecanismo de deslizamento do DNA (ELLEGREN, 2000).

O estudo de repetições de nucleotídeos tem grande importância devido ao grande número (>30) de doenças neurológicas e musculares associadas a este tipo de mutação (Tabela 1.1) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010).

As mutações dinâmicas responsáveis por causar essas doenças possuem as seguintes características: (1) envolvem uma mudança no número de repetições de nucleotídeos com a taxa de variação dependente do tamanho inicial da repetição; (2) as repetições sem interrupções têm uma maior probabilidade de sofrer contração ou expansão; (3) o número de repetições tem relação com a severidade e / ou com a idade de início da doença (VAN EYK E RICHARDS, 2012).

Tabela 1.1: Repetições de nucleotídeos e doenças humanas (Parte 1/4) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010)

| Disorder | Gene | Locus | Repeat | Interruptions | Repeat Size | | | Parent of Origin | Somatic Instability | Repl ^o Origin | Proximal CTCF | CpG Methylation | Bi-directional Transcription | Pathogenesis |
|--|---------|-------------|-----------------------|------------------|----------------|-------------|---------|------------------|---------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|--------------|
| | | | | | Normal | Premutation | Disease | | | | | | | |
| Coding repeats - Polyglutamine | | | | | | | | | | | | | | |
| SBMA: Spinal and Bulbar Muscular Atrophy | AR | Xq11-q12 | (CAG)n*(CTG)n | - | 9 - 36 | ND | 40-55 | ND | limited | Yes | ? | ? | Yes | GOF |
| HD: Huntington's disease | HTT | 4p16.3 | (CAG)n*(CTG)n | - | 10 - 34 | 29-35 | > 35 | Paternal | moderate | Yes | Upstream | Upstream ^{1,2} | Yes | GOF |
| DRPLA: Dentatorubral-pallidouysian atrophy | ATN1 | 12p13.31 | (CAG)n*(CTG)n | - | 7 - 25 | ND | 49-88 | Paternal | moderate | ? | Flanking | ? | Yes | GOF |
| SCA1: Spinocerebellar ataxia 1 | ATXN1 | 6p23 | (CAG)n*(CTG)n | CAT | 6 - 39 | ND | 39-81 | Paternal | moderate | ? | ? | ? | Yes | GOF |
| SCA2: Spinocerebellar ataxia 2 | ATXN2 | 12q24 | (CAG)n*(CTG)n | CAA | 13 - 33 | ND | > 34 | Paternal | moderate | ? | Upstream | ? | Yes | GOF |
| SCA3: Spinocerebellar ataxia 3 | ATXN3 | 14q24.3-q31 | (CAG)n*(CTG)n | CGG,GCC, CAG,CAA | 13 - 44 | ND | > 55 | Paternal | moderate | ? | ? | ? | Yes | GOF |
| SCA6: Spinocerebellar ataxia 6 | CACNA1A | 19p13 | (CAG)n*(CTG)n | - | 4 - 18 | ND | 20 - 29 | none | ND | ? | ? | ? | Yes | LOF |
| SCA7: Spinocerebellar ataxia 7 | ATXN7 | 3p21.1-p12 | (CAG)n*(CTG)n | - | 4 - 35 | ND | 37-306 | Paternal | moderate | Yes | Flanking | ? | Yes | GOF |
| SCA17: Spinocerebellar ataxia 17 | TBP | 6q27 | (CAG)n*(CTG)n | ? | 25 - 42 | ND | 47 - 63 | ND | ND | ? | ? | ? | ? | GOF |
| KCNN3: no disease association | KCNN3 | 1q21.3 | (CAG)n*(CTG)n | ? | 7 - 28 | ND | ND | ND | | ? | ? | ? | ? | ND |
| AIB-I: Increased prostate cancer risk | NCOA3 | 20q12 | (CAG/CAA)n*(CTG/TTG)n | - | 29/29 or 28/29 | <29/29 | <29/<29 | ND | limited | ? | ? | ? | ? | GOF |
| Coding repeats - Polyalanine | | | | | | | | | | | | | | |
| HOXD13: Synpolydactyly | HOXD13 | 2q31-q32 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT, GCC | 15 | ND | 22 - 29 | na | none | ? | ? | ? | Yes | GOF |
| OPMD: Oculopharyngeal Muscular Dystrophy | PABPN1 | 14q11.2-q13 | (GCG)n*(CGC)n | GCA | 10 | ND | 12 - 17 | na | none | ? | ? | ? | No | GOF |

Tabela 1.1: Repetições de nucleotídeos e doenças humanas (Parte 2/4) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010)

| Disorder | Gene | Locus | Repeat | Interruptions | Repeat Size | | | Parent of Origin | Somatic Instability | Repl ¹ Origin | Proximal CTCF | CpG Methylation | Bi-directional Transcription ² | Pathogenesis |
|---|-----------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|---------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|---|--------------|
| | | | | | Normal | Premutation | Disease | | | | | | | |
| CBFA1:cleidocranial dysplasia | RUNX2 | 6p21 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT | 17 | ND | 27 | na | none | ? | ? | ? | Yes | LOF |
| ZIC2:holoprosencephaly | ZIC2 | 13q32 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT, GCC | 15 | ND | 25 | na | none | ? | ? | ? | ? | LOF |
| HOXA13: Hand-Foot-Genital Syndrome | HOXA13 | 7p15-p14.2 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT, GCC | 18 | ND | 24 - 26 | na | none | ? | ? | ? | Yes | GOF ? |
| FOXL2:Blepharophimosis/Ptosis/ Epicanthus inversus syndrome type II | FOXL2 | 3q23 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT, GCC | 14 | ND | 22 - 24 | na | none | ? | ? | ? | No | LOF |
| ARX: infantile spasm syndrome | ARX | Xp22.13 | (GCG)n*(CGC)n | GCA,GCT, GCC | 10-16 | ND | 17-23 | na | none | ? | ? | ? | Yes | LOF |
| Coding repeats - Polyaspartic | | | | | | | | | | | | | | |
| COMP: Multiple Skeletal dysplasias | COMP | 19p13.1 | (GAC)n*(GTC)n | - | 5 | ND | 4,6,7 | ND | | ? | ? | ? | No | LOF |
| Non-coding repeats | | | | | | | | | | | | | | |
| CTG18.1: no confirmed disease association | TCF4 | 18q21.1 | (CTG)n*(CAG)n | - | 10 - 37 | 53 - 250 | 800 - 2100 | ND | ND | ? | ? | ? | Yes | ND |
| DM1: myotonic dystrophy type 1 | DMPK/ DMPKas | 19q13.2- q13.3 | (CTG)n*(CAG)n ³ | CGG,CTC | 5 - 37 | 34-90 | > 90 - 6500 | Maternal | extensive | Yes | Flanking | Flanking ^{4,5} | Yes ⁶ | RNA |
| FRDA: Friedreich's ataxia | FXN | 9q13 | (GAA)n*(TTC)n | GAG,GGAA, AA | 6 - 32 | 40-200 | > 200 | Maternal | moderate | ? | ? | Upstream ⁷⁻⁹ | Yes | LOF |
| SCA8: Spinocerebellar ataxia 8 | ATXN8/ ATXN8O S | 13q21 | (CTG)n*(CAG)n | CCG,TTG,CT A,CCA,GTC, CTT | 2 > 130 | 45 - 109 | > 110 | Exp: Mat Cnt: Pat | ND | ? | ? | ? | Yes ¹⁰ | unknown |
| SCA12: Spinocerebellar ataxia 12 | PPP2R2B | 5q31-q33 | (CAG)n*(CTG)n | - | 7 - 45 | ND | 55 - 78 | ND | ND | ? | ? | ? | Yes | ND |
| SCA31: Spinocerebellar ataxia 31 | TK2/ BEAN | 16q22 | (TGGAA)n*(TT CCA) | ? | 0 | ND | 110 | ? | ? | ? | ? | ? | Yes | RNA |
| HDL2: Huntington's disease-like 2 | JPH3 | 16q24.3 | (CAG)n*(CTG)n | ? | 6 - 27 | ND | 51 - 57 | ND | ND | ? | ? | ? | Yes | RNA |

Tabela 1.1: Repetições de nucleotídeos e doenças humanas (Parte 3/4) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010)

| Disorder | Gene | Locus | Repeat | Interruptions | Repeat Size | | | Parent of Origin | Somatic Instability | Repl ^f Origin | Proximal CTCF | CpG Methylation | Bi-directional Transcription* | Pathogenesis |
|--|---------------|------------|--|-------------------------|-------------|-------------|--------------|----------------------|---------------------|--------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------|
| | | | | | Normal | Premutation | Disease | | | | | | | |
| MAB21L1: no confirmed disease association | MAB21L1 | 13q13 | (CAG) _n •(CTG) _n | ? | 6 - 31 | ND | > 50 | ND | limited | ? | ? | ? | No | ND |
| DM2: myotonic dystrophy type 2 | ZNF9 | 3q13.3-q24 | (CCTG) _n •(CAGG) _n | TCTG,GCTG | 104 - 176 | ND | 75 - 11,000 | ND | extensive | ? | ? | ? | No | RNA |
| SCA10: Spinocerebellar ataxia 10 | ATXN10 | 22q13 | (AATCT) _n •(AGATT) _n | ATGCT,ATTCTAT | 10 - 22 | ND | 800 - 4500 | Paternal | moderate | Yes | ? | ? | No | LOF |
| EPM1: epilepsy progressive myoclonic | CSTB | 21q22.3 | (CCCCGCCCCGCG) _n | - | 2 - 3 | 12 - 17 | 30 - 75 | ND | ND | ? | ? | ? | ? | LOF |
| IRDN: Increased risk of diabetes | INS | 11p15.5 | (ACAGGGGT(G/C)(T/C)GGGG) _n | ? | 110 - 150 | 45 - 109 | 30 - 44 | Maternal | ND | ? | ? | ? | Yes | unknown |
| h-Ras: increased risk of ovarian cancer | HRAS | 11p15.5 | 28-bp VNTR | - | 5 alleles | ND | rare alleles | ND | ND | ? | ? | ? | ? | unknown |
| FSHD: Facioscapulohumeral muscular dystrophy | FSHMD1A | 4q35 | 3.3 kb D4Z4repeat | Sequence variation | 11-150 | ND | <11 | ND | moderate | ? | ? | Yes ^{20,21} | Yes | unknown |
| SMYD3: Cancer risk factor | SMYD3 | 1q44 | (CCGCC) _n /(GGCGG) _n | ? | 3 | ND | 2 | ? | ? | ? | ? | ? | Yes | GOF |
| RELN: Risk of Autism | RELN | 7q22 | (CGG) _n /(GCC) _n | ? | 8-10 | ND | 12-13 | No | ? | ? | ? | ? | ? | LOF |
| Fragile site-associated repeats- Folate-Sensitive Sites | | | | | | | | | | | | | | |
| FRAXA: fragile X syndrome | FMR1/ FMR4 | Xq27.3 | (CGG) _n •(CCG) _n | AGG | 6 - 52 | 59 - 230 | 230 - 2000 | Exp: Mat Cnt: Pat | limited | Yes | Flanking | Upstream + repeat ¹¹⁻¹⁵ | Yes ¹⁶ | LOF, RNA ? |
| FXTAS: fragile X tremor/ataxia syndrome | FMR1 | Xq27.3 | (CGG) _n •(CCG) _n | AGG | 6 - 52 | | 59 - 230 | Exp: Mat Cnt: Pat | limited | Yes | Flanking | No | Yes | GOF, RNA |
| FRAXE: fragile X syndrome | FMR2 | Xq28 | (CCG) _n •(CGG) _n | ? | 4 - 39 | (31-61) | 200-900 | Exp: Mat Cnt: Pat | ND | Yes | ? | Upstream + repeat ¹⁷ | ? | LOF |
| FRAXF: No confirmed disease association | FAM11A | Xq28 | (CGG) _n •(CCG) _n | (GCCGTC) ₃₋₄ | 7 - 40 | ND | 306-1008 | ND | ND | ? | ? | Repeat ^{18,19} | ? | ND |

Tabela 1.1: Repetições de nucleotídeos e doenças humanas (Parte 4/4) (LOPEZ CASTEL, CLEARY E PEARSON, 2010)

| Disorder | Gene | Locus | Repeat | Interruptions | Repeat Size | | | Parent of Origin | Somatic Instability | Repl ^o Origin | Proximal CTCF | CpG Methylation | Bi-directional Transcription* | Pathogenesis |
|--|----------|--------------|---------------------|----------------------------------|-------------|-------------|------------|------------------|---------------------|--------------------------|---------------|-------------------|-------------------------------|--------------|
| | | | | | Normal | Premutation | Disease | | | | | | | |
| FRA10A: No confirmed disease association | FRA10AC1 | 10q23.33 | (CCG)n•(CGG)n | ? | 8 - 14 | ND | > 200 | ND | ND | ? | ? | Upstream + repeat | ? | ND |
| FRA11B: Jacobsen syndrome | CBL2 | 11q23.3 | (CCG)n•(CGG)n | - | 11 | 80 | 100-1000 | ND | ND | ? | ? | Upstream + repeat | No | LOF |
| FRA16A: No confirmed disease association | — | 16q22 | (CCG)n•(CGG)n | CCT,CTG,CC TCCA | 16 - 49 | ND | 1000-1900 | Maternal | ND | ? | ? | Upstream + repeat | - | ND |
| Fragile site-associated repeats - <i>Distamycin A</i>-inducible | | | | | | | | | | | | | | |
| FRA16B: No confirmed disease association | — | 16q22.1 | 33-bp AT-rich VNTR | Sequence variations | 7-12 | ND | up to 2000 | ND | limited | ? | ? | Upstream + Repeat | - | ND |
| Fragile site-associated repeats - <i>BrdU</i> inducible | | | | | | | | | | | | | | |
| FRA10B: No confirmed disease association | — | 10q25 | ~42-bp AT-rich VNTR | Considerable sequence variations | 1-74 | ND | > 75 | ND | limited | ? | ? | Upstream + Repeat | - | ND |

As repetições nucleotídicas podem estar presentes nos exons, introns, regiões 3'UTR ou 5'UTR. Podem ainda ser causadas por repetições tri, tetra ou pentanucleotídicas (figura 1.3) (VAN EYK E RICHARDS, 2012).

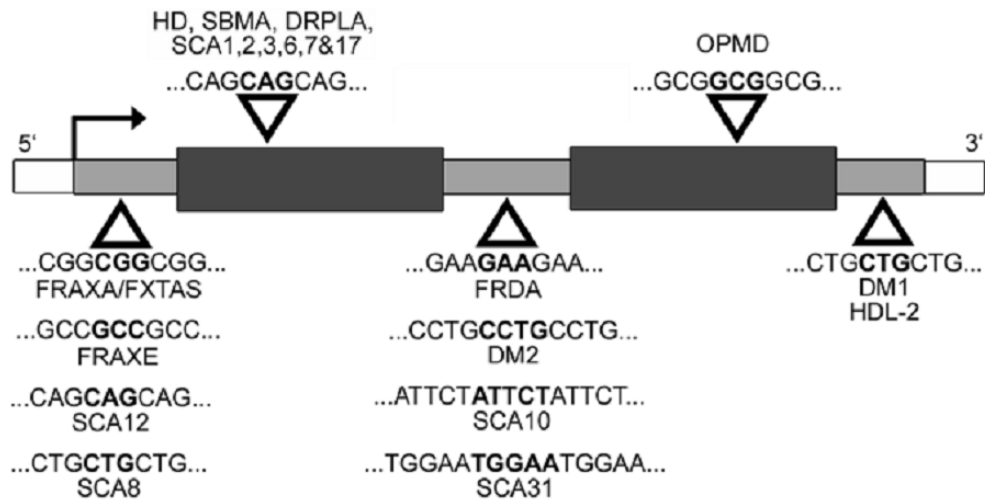


Figura 1.3: Esquema de localização de repetições nucleotídicas de algumas doenças humanas (VAN EYK E RICHARDS, 2012).

Legenda: Repetições abaixo das setas estão localizadas em regiões não traduzidas. Repetições acima das setas estão localizadas em regiões traduzidas.

As doenças causadas por expansão de trinucleotídeos começaram a ser identificadas em 1991, com a clonagem do gene e identificação da repetição CCG(n) responsável pela síndrome do X-frágil (KREMER et al., 1991). Além disso, no mesmo ano, foi descoberta como causa da atrofia muscular bulboespinal (doença de Kennedy), a repetição CAG(n) (LA SPADA et al., 1991).

Tais doenças causadas por repetições trinucleotídicas podem ser separadas em dois grupos: doenças causadas por repetições não codificantes de glutamina e doenças causadas por repetições codificantes de glutamina. No caso das repetições não codificantes de poliglutamina, a alteração genética pode afetar diversos sistemas e causar degeneração ou perda de função em vários tecidos. No caso das doenças codificantes de poliglutamina, todas possuem em comum a neurodegeneração progressiva, tendo início geralmente na idade adulta. Nesse grupo de doenças causadas por repetições trinucleotídicas codificantes de poliglutamina se insere a doença de Huntington (CUMMINGS E ZOGHBI, 2000; FAN et al., 2014).

1.2 Doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma doença genética, neurodegenerativa rara, progressiva, caracterizada por distúrbios motores, perdas cognitivas e distúrbios comportamentais. Na maior parte dos casos, os sintomas surgem já na idade adulta (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993).

Os sintomas resultam da perda seletiva de neurônios espinhosos médios, principalmente do núcleo caudado e putâmen, e não existe atualmente nenhum tratamento eficaz que impeça o desenvolvimento da doença (POTTER, 2004; BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014).

Na Europa a prevalência é de 5-10 casos para 100.000 indivíduos. Na China e Japão, a prevalência estimada é de 0,1-0,5/ 100.000(figura 1.4)(WARBY et al., 2011). No Brasil ainda não existe prevalência geral estimada da DH. Entretanto, nosso grupo estimou a prevalência mínima da cidade de Ervália, MG, cujo valor encontrado foi de 7,2 casos para 10.000 indivíduos (AGOSTINHO et al., 2015).

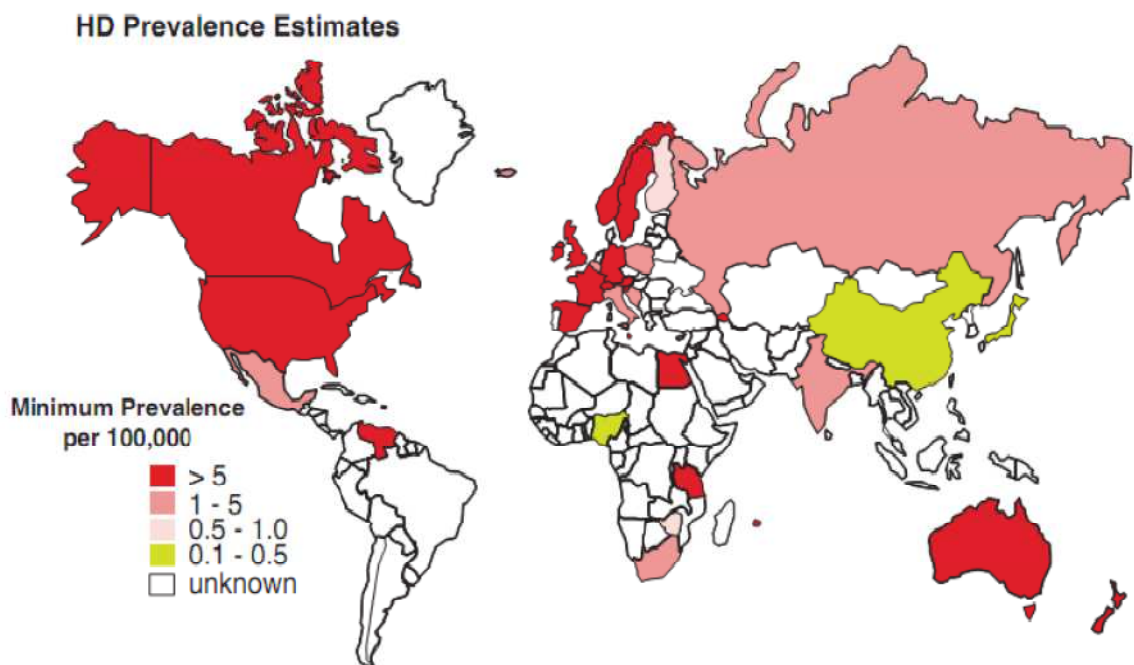


Figura 1.4: Prevalência estimada em alguns países (WARBY et al., 2011).

1.2.1 Breve histórico da doença de Huntington

A doença de Huntington se tornou conhecida, principalmente, após a descrição dos sintomas realizada por George Huntington em 1872. Porém, antes disso, algumas características sobre a doença já haviam sido divulgadas. O conhecimento compartilhado possibilitou aos pesquisadores a busca por mais informações sobre a doença, o que resultou em descobertas de grande importância para o melhor entendimento da DH.

Em 1841, Charles Water, em uma carta, faz uma definição bem clara da coreia, caracterizada pelo movimento involuntário dos músculos, um dos principais sintomas da doença, assim como sua natureza hereditária (WATER, 1842 apud IMARISIO et al., 2008). Em uma tradução, Water informa que:

“Consiste essencialmente em uma ação espasmódica de todos os músculos voluntários, involuntário e mais ou menos movimentos irregulares das extremidades, face e tronco...a transmissão da doença é marcadamente hereditária...Os primeiros indícios de sua aparência são espasmos das extremidades, geralmente dos dedos que gradualmente se estendem e envolvem todos os músculos involuntários. Esta perturbação da ação muscular é de modo uniforme; em alguns casos, existe em maior, em outros, em menor extensão, mas em todos os casos gradualmente induz um estado de demência. Quando se fala da natureza, talvez eu deva ter observado que nunca tive conhecimento de um caso de que ela ocorra num paciente, cujo um ou ambos antepassados não eram doentes na terceira geração mais distante, o tema desta doença angustiante...” (WATER, 1842 apud IMARISIO et al., 2008).

Em 1860, o físico norueguês, Johan Christian Lund, publicou um trabalho com a descrição da doença de Huntington, contemplando principalmente o padrão clássico de sintomas e sua hereditariedade. Apesar de ter sido o primeiro trabalho de fato publicado, o trabalho não foi traduzido para o inglês até 1959, o que dificultou o compartilhamento deste conhecimento com outros estudiosos (LUND, 1860 apud HARPER, 2005).

Em 1872, George Huntington publicou seu trabalho denominado “OnChorea” (Figura 1.5), que foi bem aceito pela comunidade médica. Nesse trabalho Huntington

descreveu as características da doença manifestadas na forma adulta (HUNTINGTON, 1872).

Logo no começo de sua descrição, Huntington trata de um dos sintomas mais característico da doença, a coreia: “trata-se de um espasmo que afeta os músculos voluntários”. Além disso, Huntington tratou sobre do caráter hereditário da doença, ressaltando que se um ou os dois progenitores possuíam manifestações da doença, um ou mais descendentes poderiam apresentar a doença caso atingisse(m) a idade adulta (HUNTINGTON, 1872).

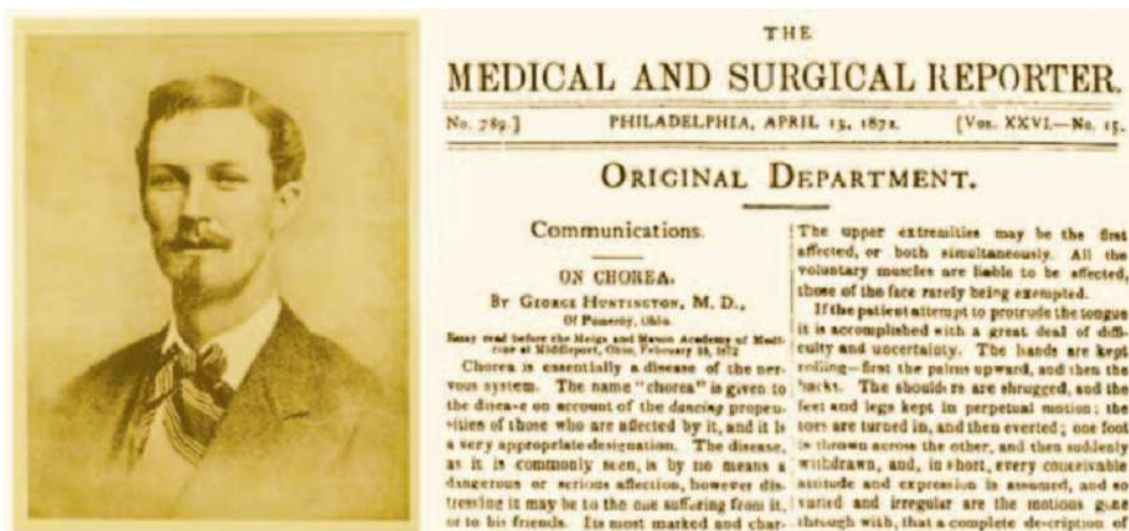


Figura 1.5: Artigo Original “OnChorea” de George Huntington (HUNTINGTON, 1872).

Em 1888, Hoffman descreveu a forma juvenil da doença, denominada variante de Westphal. Essa forma é definida como manifestação encontrada antes dos 21 anos de idade. Em um estudo familiar com três gerações, foram identificadas duas meninas com idade de início da doença de 4 e 10 anos (HOFFMAN, 1888 apud BATES, 2005).

Em 1955, foi descrito o primeiro caso de DH no Lago Maracaibo, na Venezuela (NEGRETE, 1955 apud WALKER, 2007). Já em 1979, a bióloga e psicóloga Nancy Wexler liderou um grupo de pesquisadores nessa mesma região, e o estudo contou com uma grande amostragem que correspondia a uma grande família de pelo menos 9000 membros (WEXLER, A, 1995 apud BATES, 2005).

Em 1983, Gusella e seus colaboradores conseguiram localizar o gene responsável pela doença, o gene *IT15* (atualmente denominado *HTT*) localizado no cromossomo 4 humano (GUSELLA et al., 1983).

No ano de 1993, com o isolamento do gene *HTT* pelo *Huntington Disease Collaborative Research Group*, foi possível a localização das repetições de trinucleotídeos CAG no *HTT*, que quando expandidas são responsáveis por causar a DH (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993).

Em 1997, foi criado o primeiro modelo de camundongo com DH (DAVIES, 1997 apud BATES, 2005). No mesmo ano ocorreu a descoberta de agregados da proteína huntingtina no cérebro de camundongos e de humanos com DH (DAVIES, 1997; DiFIGLIA, 1997 apud BATES, 2005).

1.2.2 Aspectos genéticos gerais da doença de Huntington

A DH é causada por repetições expandidas de trinucleotídeos CAG presentes no exon1 do gene *HTT*, localizado no cromossomo 4p16.3 (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993).

O gene afetado na DH abrange mais de 170 kb e contém 67 exons. A proteína codificada por esse gene, a huntingtina, consiste de 3144 resíduos de aminoácidos e tem uma massa molecular de 350 kDa. Quando ocorre a expansão das repetições trinucleotídicas CAG a proteína é traduzida com uma cauda expandida de poliglutamina (PoliQ) em sua região amino terminal (BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014).

A DH é uma doença de herança autossômica dominante (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993; POTTER, 2004; BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014).

A classificação dos alelos é realizada de acordo com seu tamanho de repetições CAG. Alelos com 26 repetições ou menos são denominados normais. Alelos com 27 a 35 repetições são denominados alelos normais mutáveis (ou intermediários). Alelos com 36 a 39 repetições são considerados alelos de penetrância reduzida. Repetições acima de 39 indicam alelo com penetrância completa (Figura 1.6). Para efeito de diagnóstico são considerados alelos

expandidos (positivos para DH) aqueles com 36 ou mais repetições (POTTER, 2004; BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014). Já os portadores de alelos intermediários (normais mutáveis) são considerados potenciais transmissores.

O número de repetições CAG além de um limiar normal (> 26 unidades) afeta a estabilidade genética do gene *HTT* durante a meiose. Os alelos normais (≤ 26 CAG) são segregados de forma estável em $>99\%$ casos. Alelos intermediários, alelos de penetrância reduzida e os de penetrância completa podem ser instáveis durante meiose (BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014). Apesar de a instabilidade poder ocorrer tanto na meiose materna quanto na paterna, é mais comum na paterna (DUYAO et al., 1993; TELENIUS et al., 1993).

A tendência de expansão de origem paterna é atribuída ao maior número de divisões mitóticas que precedem a meiose na gametogênese masculina, porém, outros estágios da espermatogênese, como estágios específicos que possuem alterações dos níveis e atividade de várias proteínas de reparo, também podem contribuir (PEARSON et al., 2005).

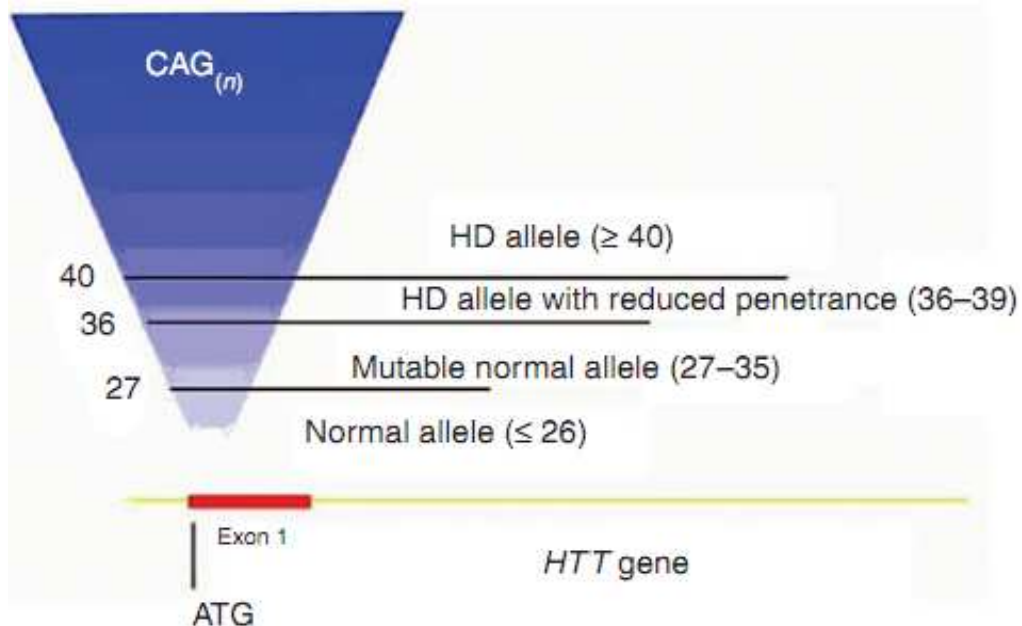


Figura 1.6: Diagrama das repetições CAG, localizadas no exon 1 do gene HTT (BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014)

1.2.3 Huntingtina e a neuropatogênese da doença de Huntington

A huntingtina é uma proteína humana grande que compreende mais de 3000 aminoácidos. A região de glutamina (PoliQ) normalmente contém de 11-35 resíduos de glutamina. Em indivíduos afetados pela DH, se expande acima de 35 glutaminas (LI E LI, 2004). A região PoliQ é seguida por uma região de prolina (PoliP) que provavelmente atua na solubilidade da proteína (CATTANEO et al, 2005).

Além dessas regiões (figura 1.7), pode-se encontrar a região de motivos HEAT (este motivo está presente no fator de alongamento (*elongation*) da *huntingtina3*, na subunidade da proteína fosfatase 2A e na quinase TOR1), geralmente envolvidos em interações do tipo proteína-proteína e também estão presentes em proteínas que desempenham papel no transporte intracelular, na dinâmica dos microtúbulos e na segregação cromossômica. Além disso, a proteína contém uma região carboxiterminal funcionalmente ativa que atua na sinalização de exportação nuclear (NES), o que indica que a proteína, ou pelo menos parte dela, está envolvida no transporte de moléculas do núcleo para o citoplasma (IMARISIO et al., 2008). Estão presentes também sítios de clivagem por proteases e caspases. A huntingtina sofre modificações pós-traducionais, como ubiquitinação e fosforilação em serinas (CATTANEO et al., 2005).

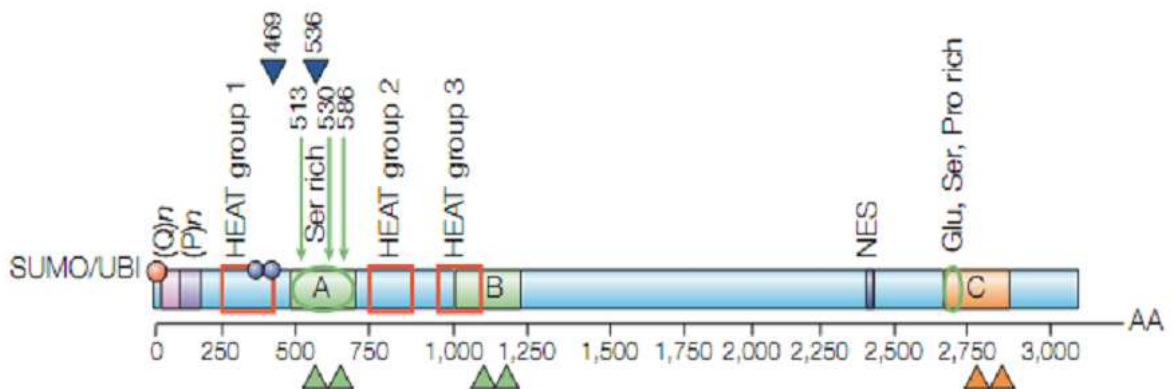


Figura 1.7: Representação das regiões da proteína huntingtina (CATTANEO, 2005).

Legenda: Qn – região de poliglutamina; Pn - região de poliprolina. Quadrado vermelho – regiões HEAT; Triângulos verdes e laranjas: regiões de clivagem por caspases. B: região clivada preferencialmente no córtex. C: região clivada preferencialmente no estriado. A: região clivada em ambas as regiões. Triângulos azuis: regiões de clivagem por calpaínas. Bolinhas azuis e vermelhas: região de modificações pós traducionais. Círculo verde: Regiões ricas em serina, ácido glutâmico e prolina. (CATTANEO, 2005).

Apesar dos seus resíduos de aminoácidos e regiões serem bem descritas, ainda não se conseguiu cristalizar a proteína huntingtina, devido principalmente ao seu tamanho. Assim não conhecemos de fato sua conformação no estado selvagem ou mutado. Um projeto recente (*CASIS PCG HDPCG-1*) em conjunto entre a *NASA* e *The BjorkmanGroup* busca a cristalização da proteína utilizando microgravidade em uma estação espacial internacional (NASA, 2014).

A huntingtina selvagem é expressa na maior parte das células do corpo, sendo mais expressa no cérebro, predominantemente nos neurônios médios espinhosos. Dentro das células é encontrada principalmente no citoplasma, associada às mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas e componentes do citoesqueleto e uma menor quantidade pode ser encontrada no núcleo (LANDLES E BATES, 2004; YOUNG, 2003).

O papel molecular preciso da proteína selvagem permanece incerto. Apesar disso, diversos experimentos com camundongos sugerem que proteína seja essencial para o desenvolvimento embrionário, desenvolvimento e sobrevivência neuronal, podendo exercer papéis também no tráfico de proteínas, transporte de vesículas, ancoramento do citoesqueleto, endocitose mediada por clatrin, sinalização pós-sináptica, regulação transcricional, metabolismo energético e apoptose (REINER et al., 2003; CATTANEO et al., 2005; KROBITSCHA E KAZANTSEVA, 2011; NGUYEN et al., 2013; LEE et al., 2013; ISMAILOGLU et al., 2014).

Os mecanismos moleculares desencadeados pela proteína HTT mutante e a forma como esses mecanismos se relacionam permanecem desconhecidos. Diversos mecanismos vêm sendo propostos para tentar explicar como a HTT mutante atua na patogênese da DH (DUAN, JIANG E JIN, 2014).

Um dos mecanismos sugere que a proteína mutada sofre proteólise por caspases liberando fragmentos tóxicos que pode levar à ativação de outras caspases e conseqüentemente morte celular (GOLDBERG et al., 1996).

Outro mecanismo proposto relata a capacidade que a HTT mutante tem de formar agregados protéicos com outras moléculas. Estes agregados seriam tóxicos para célula (DiFIGLIA et al., 1997; YANG et al., 2002). Por outro lado, alguns estudos sugerem que tais agregados seriam uma tentativa da célula de unir fragmentos solúveis tóxicos da proteína mutada e que, além disso, tais fragmentos induziriam a autofagia de células que possuem esses agregados, o que poderia

indicar um papel de neuroproteção (KUEMMERLE et al., 1999; VENTRUTI E CUERVO, 2007).

Outro estudo diz que a proteína mutante atua de forma a reduzir a quantidade do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Tal fator é responsável pela sobrevivência e plasticidade neuronal (ZUCCATO et al., 2001). Além disso, a HTT mutante pode causar um excesso de ativação do receptor de glutamato (um dos principais neurotransmissores do SNC), o que caracteriza um processo de excitotoxicidade (ZUCCATO E CATTANEO, 2010). Os agregados de HTT mutante são capazes de sequestrar diversas proteínas, entre elas a proteína TOR, importante reguladora negativa do processo autofágico (RAVIKUMAR et al., 2004).

Um dos mecanismos mais discutidos atualmente é o mecanismo pela qual a HTT mutante altera o metabolismo energético por meio de estresse oxidativo, *déficit* de ATP, não armazenamento de cálcio e depleção mitocondrial (DUAN, JIANG E JIN, 2014).

A DH causa atrofia gradual do estriado (núcleo caudado e putâmen). Conforme evolução da doença poderá ser observada também perda neuronal em outras regiões como: no córtex cerebral (volume global), no *globuspallidus*, no tálamo, no núcleo talâmico, na substância negra e branca, além do cerebelo (VONSATTEL, 1985; VONSATTEL E DIFIGLIA, 1998 apud MOHAPEL E REGO, 2011). Os neurônios mais afetados no estriado são os neurônios espinhosos médios, que correspondem a cerca de 95% do número total de neurônios estriatais (ALBIN et al., 1989; JOEL E WEINER 1997 apud MOHAPEL E REGO, 2011).

1.2.4 Sintomas, tratamentos e perspectivas

A maior incidência da doença ocorre em indivíduos adultos com idade entre 35-50 anos. Apenas 10% dos pacientes desenvolvem a doença antes dos 20 anos, o que caracteriza a forma juvenil da doença (ZUCCATO et al., 2010). A forma juvenil está normalmente associada a uma expansão de trinucleotídeos CAG maior que 60 unidades (ANDRESEN et al., 2006).

A tríade clínica clássica de sintomas na DH envolve: desordem motora progressiva; perda cognitiva progressiva e distúrbios psiquiátricos (DAYALU E ALBIN, 2015).

Apesar de não ser a única disfunção motora, o movimento involuntário dos músculos (coreia) é a característica motora mais evidente da DH. A coreia se inicia como movimentos aleatórios nas extremidades distais dos músculos (face e pontas dos dedos, por exemplo) e, com evolução da doença, esses movimentos acometem uma maior parte dos músculos e tornam-se mais severos (HUNTINGTON, 1872; ROOS, 2010; DAYALU E ALBIN, 2015).

Outras disfunções motoras incluem a disartria (dificuldade na fala, já que os músculos utilizados podem ser afetados), ataxia (falta de coordenação nos movimentos), bradicinesia (movimento dos músculos voluntário de forma lenta), distonia (contração prolongada e rigidez dos músculos) e disfagia (dificuldade na deglutição). Disfunções motoras são uma das principais complicações em estágios finais da doença. Quedas e ferimentos graves se tornam cada vez mais comum, enquanto a disfagia contribui com a perda de peso e aspiração (DAYALU E ALBIN, 2015). O paciente passa a depender de cuidadores para a execução de atividades da rotina diária.

As funções cognitivas também são afetadas. A progressiva demência causa no paciente a perda da capacidade de julgamento, planejamento do futuro, compreensão e memorização (ROOS, 2010; ROSENBLATT 2007).

Os distúrbios psiquiátricos podem incluir depressão, ansiedade, apatia, comportamentos obsessivo-compulsivos, vícios, e, ocasionalmente, psicose (DAYALU E ALBIN, 2015).

Os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com DH são semelhantes ao de diversas doenças de origem genética, como as ataxias espinocerebelares. Dessa forma o diagnóstico molecular é de grande importância para confirmação do diagnóstico clínico (SCHNEIDER, WALKER E BHATIA, 2007).

O diagnóstico diferencial para DH é necessário quando um paciente apresenta a combinação de distúrbios do movimento, declínio cognitivo e alterações comportamentais e tem resultado negativo para mutação do gene *HTT*. A realização do diagnóstico molecular auxilia no correto aconselhamento genético (MARTINO et al., 2013).

Doenças com quadros clínicos semelhantes à DH vêm sendo descritas e são conhecidas como *Huntington'sdiseaselike*(HDL). Atualmente são descritas a HDL1, HDL2, HDL3 e HDL4 (SCA17) ocasionada por mutações, respectivamente nos genes *PRNP*, *JPH3* e *TBP*. A causa da HDL3 ainda é desconhecida. Além das

doenças descritas acima, existem outras que remetem ao quadro clínico da DH como a atrofia dentatorubropalidosusiana (DRPLA), coreia acantocitose e as ataxias espinocerebelares (GOVERT E SCHNEIDER, 2013).

A média de duração da DH é de 15-20 anos em adultos (MARGOLIS e ROSS, 2003; ROSENBLATT, 2007). Enquanto nos casos de DH juvenil, de 7-10 anos. Pacientes com a variante de Westphal apresentam os sintomas citados de forma mais severa (PETERSÉN et. al, 1999).

O óbito dos pacientes se dá principalmente pela ocorrência de pneumonia por aspiração (ZUCCATO, 2010).

Atualmente não existe cura ou tratamentos que retardem o início da doença. O tratamento atual é paliativo e visa diminuir os sintomas motores e psiquiátricos, principalmente. Os sintomas cognitivos são os menos responsivos aos medicamentos. Os medicamentos mais utilizados para coreia são Tetrabenazina (que pacientes no Brasil ainda não têm acesso) e Amantadina. Levodopa é utilizado geralmente nos casos de DH juvenil. Antidepressivos e antipsicóticos são utilizados para os distúrbios psiquiátricos. Além dos medicamentos, é indicado aos pacientes com DH acompanhamento por neurologista, geneticista, fonoaudiologia, fisioterapia e nutricionista (DAYALU E ALBIN, 2015; KUMAR et al., 2015).

O silenciamento gênico é uma potencial estratégia de tratamento da DH. Um estudo de 2009 revelou que pacientes europeus com DH exibem um conjunto específico de SNPs na expansão CAG e esse conjunto de SNPs poderiam ser alvos para silenciamento genético através de oligonucleotídeos antisense (WARBY et al., 2009).

Em 2014, um estudo com camundongos avaliou diversos oligonucleotídeos que tinham como alvo o conjunto de SNPs presentes na expansão CAG (SOUTHWELL et al, 2014).

Teve início em julho de 2015, a primeira fase do ensaio clínico para teste da droga ISIS-HTTRx (um oligonucleotídeo antisense) em pacientes europeus e canadenses caso vá para fase II o ensaio incluirá a população dos EUA. Essa droga foi desenhada para bloqueio da expressão proteína HTT (ISIS PHARMACEUTICAL, 2015).

1.3 Modificadores genéticos da idade de início doença de Huntington e o gene *TBP* como modificador

Embora todos aqueles com DH tenham o mesmo tipo de mutação, dois indivíduos com exatamente o mesmo número de repetições CAG podem apresentar variação na idade de início da doença, além da variada sintomatologia, por isso, é pouco provável que apresentem a mesma progressão da doença ou então venham a óbito após duração igual da DH (GUSELLA E MACDONALD, 2009).

O determinante mais crítico da idade de início da DH é o número de repetições CAG no gene *HTT*. O número de repetições trinucleotídicas CAG explica aproximadamente 70% da idade de início da doença (RUBINSZTEIN et al., 1997; DJOUSSÉ et al., 2003; WEXLER et al., 2004). Os outros 30% são atribuídos a genes modificadores ou fatores ambientais (RUBINSZTEIN et al., 1997).

Uma análise realizada no Brasil mostrou resultados em que a idade de início e o número de repetições CAG estão correlacionados negativamente em 84% na amostra brasileira estudada (AGOSTINHO et al., 2012).

Um estudo demonstrou que as variações na idade de início da doença não explicadas pelas repetições CAG do *HTT*, podem ser atribuídas em 40% a outros genes e 60% ao ambiente (WEXLER et al., 2004).

Diferentes modificadores genéticos podem atuar em diferentes estágios da vida e em diferentes fenótipos da doença (GUSELLA E MACDONALD, 2009).

Um dos primeiros estudos que investigou o efeito modificador na idade de início da DH provocado por um gene localizado em cromossomo diferente do gene *HTT* mostrou que o gene *GRIK2*, responsável por codificar uma das subunidades do receptor de glutamato, poderia influenciar em 13% a idade de início não explicada pelo número de repetições CAG do gene *HTT* (RUBINSZTEIN et al., 1997). Mais tarde, um estudo com 258 pacientes revelou que a região polimórfica TAA localizada em 3'UTR de *GRIK2* apresentando 16 repetições estaria relacionada com a antecipação da doença em cinco anos em relação àqueles que possuíam um número de repetições TAA diferente (MACDONALD et al., 1999).

Em 2003, LI et al. realizaram um estudo de associação do genoma (*GenomewideScan*) para verificar possíveis variações em comum nos pacientes com DH. O estudo sugeriu como possíveis modificadores genes localizados em 4p16, 6p21-23 e 6q24-26. Outro estudo de associação de genoma utilizando metodologia

e populações diferentes indicaram como possíveis modificadores genes localizado em 2p25, 2q35, 6q22, 5p14 e 5q32 (GAYÁN et al, 2008).

O gene *TBP*, localizado no cromossomo 6q27 humano, codifica a proteína de ligação à região TATA Box (*TATA Box Binding Protein*), um fator transcricional necessário para início da transcrição pelas RNA polimerase I, II e III (REID et al, 2009).

O domínio N-terminal da TBP é bem conservado, sendo caracterizado por uma região de repetição de glutamina, codificadas no DNA pelas repetições CAG/CAA. Em humanos, esta região está sujeita a variação alélica em que os indivíduos normais possuem até 42 resíduos de glutamina. No entanto, em raros indivíduos, expansões acima de 42 resíduos de glutamina levam ao desenvolvimento da doença conhecida como Ataxia Espinocerebelar 17 ou HDL4 (NAKAMURA et al., 2001), que pode ser utilizada para diagnóstico diferencial da DH.

A proteína TBP normal já foi encontrada em maiores níveis no cérebro de pacientes com DH juntamente com a huntingtinamutada quando comparados ao cérebro de pacientes do grupo controle, o que sugere que essa proteína pode exercer um papel no processo da doença (VAN ROON-MOM et al., 2002).

OHI et al. (2009) forneceram evidências de que variações no número de repetições CAG/CAA do gene *TBP* estão associadas com risco de esquizofrenia, idade de início e função pré-frontal do cérebro.

MONTCEL et al. (2014) propuseram que a idade de início de diferentes tipos de ataxias espinocerebelares (SCA), causadas por expansões de glutamina (CAG), poderiam ser influenciadas pelo número normal de glutaminas codificadas por outros genes. Esse estudo revelou que o número de repetições do gene *TBP* influencia na idade de início da ataxia espinocerebelar7 (SCA7).

A busca por modificadores genéticos pode auxiliar no entendimento da patogênese da DH e oferecer informações para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, o conhecimento de modificadores genéticos e a forma como eles alteram a idade de início da doença permitem um melhor aconselhamento genético (GUSELLA et al, 2014).

Dessa forma, se torna imprescindível a busca por modificadores genéticos da doença que contribuiriam para a variação não somente da idade de início dos sintomas motores como também de outras características fenotípicas da DH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as repetições trinucleotídicas dos genes *HTT* e *TBP*, assim como, relacionar as repetições CAG do gene *HTT* e CAG/CAA do gene *TBP* com a idade relatada de início da doença de Huntington em uma coorte brasileira.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o número de repetições CAG do gene *HTT* para o diagnóstico da doença.
- Padronizar técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região CAG/CAA do gene *TBP*.
- Determinar o número de repetições CAG/CAA do gene *TBP*.
- Relacionar os dados referentes às repetições CAG do gene *HTT* com os referentes às repetições CAG/CAA do gene *TBP* e a idade de início da doença.
- Realizar análise intra e intergeracional das repetições CAG do *HTT* e das repetições CAG/CAA do *TBP*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os pacientes foram provenientes de atendimentos no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário Gaffrée Guinle (UNIRIO) e de famílias cadastradas na Associação Brasil Huntington, residentes no Estado do Rio de Janeiro, além daqueles residentes no Estado de Minas Gerais, principalmente da cidade de Ervália.

Os indivíduos foram selecionados segundo os seguintes critérios: idade maior ou igual a 18 anos, quadro clínico semelhante à DH e/ou histórico familiar da doença.

Os pacientes sem histórico familiar que possuem o quadro clínico característico não foram excluídos, e os indivíduos com histórico familiar e sem o quadro clínico puderam participar quando expressaram tal desejo, com o devido apoio psicoterapêutico, ou só doaram amostra para pesquisa. Os indivíduos que foram testados trouxeram uma solicitação médica para a realização do exame molecular para DH. Menores de 18 anos, indivíduos de nacionalidade estrangeira e adotados por suas famílias não fizeram parte deste estudo.

Os pacientes que fizeram parte do estudo assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” concordando com os termos da pesquisa. Além disso, durante atendimento foram obtidas e tabuladas as informações sobre histórico familiar, idade de início da doença e sintomas.

Os heredogramas de cada família foram construídos utilizando a versão gratuita do programa GenoPro 2007.

A idade de início considerada foi aquela relatada pelo paciente (ou seu cuidador) como sendo o início da manifestação de sintomas sugestivos de DH notado pelo próprio paciente ou familiar. Este projeto foi aprovado pelo CEP HUGG sob número 03/2009, segundo MEMO CEP-HUGG 15/2009.

3.1 Coleta de sangue

Foram coletados de 1-3 mL de sangue periférico (tubo com EDTA) ou *swab* proveniente de raspados da mucosa oral para a análise molecular. O material

biológico foi armazenado em geladeira a 4°C até a extração de DNA. Cada paciente forneceu material em duplicata.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo do *Kit illustrabloodgenomicPrep Mini Spin, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra*. Pelo menos duas extrações de DNA de pacientes, em dias distintos, foram realizadas.

O método utilizado fez uso de agente capaz de romper as membranas celulares, havendo posterior ligação da molécula de DNA à membrana de sílica do tubo do Kit.

A proteinase K foi utilizada para digestão das proteínas das amostras, sendo tal enzima ativa na presença de EDTA e detergentes. Contaminantes foram removidos por lavagem da membrana de sílica com uma solução contendo etanol. Finalmente, ao DNA foi adicionado tampão de baixa força iônica que rompe a ligação com a sílica, permitindo a eluição do DNA para posterior utilização.

As etapas da extração podem ser observadas na figura abaixo:








| Step | Comments | Component |
|------------------------|---|--|
| 1. Blood Cell Lysis | Blood cells are lysed by a chaotropic salt in Lysis buffer type 10, in the presence of Proteinase K | Lysis buffer type 10  Proteinase K  |
| 2. Genomic DNA Binding | The chaotropic salt in Lysis buffer type 10 promotes selective binding of genomic DNA to the silica membrane. Denatured proteins are collected in the flowthrough | illustra blood mini column & Collection tube  Lysis buffer type 10  |
| 3. Wash | Lysis buffer type 10, containing a chaotropic salt, removes protein and other contaminants from membrane-bound genomic DNA | Lysis buffer type 10  |
| 4. Wash & Dry | Wash buffer type 6 containing Ethanol removes residual salts and other contaminants. | Wash buffer type 6  |
| 5. Elution | Genomic DNA is eluted in a low ionic strength buffer | Elution buffer type 5  |

Figura 3.1: Etapas da extração de DNA. (*Kit BloodGenomicPrep Spin, GE Healthcare*)

3.3 PCR

As regiões genéticas alvo deste estudo foram amplificadas pela técnica de PCR, utilizando *primers* específicos.

3.3.1 Amplificação da região CAG do gene *HTT*

A determinação do número de repetições CAG do gene *HTT* foi feita segundo protocolo proposto por Agostinho et al (2012), e confirmado por Chris Kay, do laboratório do Dr. Hayden - Huntington Disease Research Group, Centre for Molecular Medicine and Therapeutics (University of British Columbia, Vancouver, Canada), utilizando protocolo descrito em Andrew et al. (1994).

Em relação às reações de PCR realizadas em nosso laboratório, a primeira PCR teve o objetivo de amplificar a região CAG do gene *HTT*. Os *primers* utilizados foram o HD1-6FAM (senso) e HD3 (antissenso) na concentração de 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ cada (tabela 3.1), além da enzima *GoTaq® Green Master Mix*, Promega, Wisconsin, EUA, contendo 1,5 mM de MgCl_2 e 200 μM de cada dNTP, e 20-100 ng de DNA. As temperaturas utilizadas foram: 1 ciclo 94°C por 5 min, 35 ciclos 94°C por 1 min, 59,1°C por 1 min e 72°C por 2 min, um ciclo final de 72°C por 50 min (AGOSTINHO et al., 2012).

3.3.2 Amplificação da região CAG/CAA do gene *TBP*

Para amplificar a região CAG/CAA do gene *TBP* foi utilizada o segundo tipo de PCR. Os *primers* (tabela 3.1) utilizados foram provenientes do estudo de KOIDE et al. (1999) e o ciclo utilizado descrito em OHI et al. (2009). Os *primers* utilizados foram o TBP-F (senso) e TBP-R (antissenso) na concentração de 5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ cada (tabela 3.2), além da enzima *GoTaq® Green Master Mix*, Promega, Wisconsin, EUA, contendo 1,5 mM de MgCl_2 e 200 μM de cada dNTP, e 10-50 ng de DNA.

Tabela 3.1: Primers utilizados para amplificação da região CAG/CAA do gene TBP

| <i>Primer</i> | Sequência do primer | Tamanho do primer (pb) |
|---------------|----------------------------|-------------------------------|
| TBP-F | 5' GACCCACAGCCTATTCAGA 3' | 20 |
| TBP-R | 5' TTGACTGCTGAACGGCTGCA 3' | 20 |

As temperaturas utilizadas foram: 1 ciclo 94°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e um ciclo final de 72°C por 10 min.

Antes de realizar a reação de PCR para amplificação de região de interesse do gene *TBP*, foram analisados alguns parâmetros dos *primers* descritos pelo programa [online \(OligoCalc: http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html\)](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html): como percentual GC, temperatura de hibridização, possível formação de dímeros e grampos.

Posteriormente, foi realizada a PCR *in silico* no site *UCSCGenomeBioinformatics*(<https://genome.ucsc.edu/>) para verificação da região amplificada pelos *primers*.

Vale ressaltar que as condições iniciais do experimento foram testadas *in vitro*, tais como: concentrações de *primer* e DNA, até se chegar à condição ideal de 5µmols/µL de cada primer e aproximadamente 10-20 ng de DNA.

3.4 Detecção dos fragmentos (*amplicons*) produzidos pela PCR

Após a PCR, os produtos de amplificação (*amplicons*) foram detectados por eletroforese capilar por meio da análise de fragmentos no aparelho *ABI 3500 da Life Technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*.

Os picos dos *amplicons* obtidos por meio da eletroforese capilar foram analisados pelo programa *GeneMapper SW V4.1* do analisador genético *ABI 3500*. Os picos de ambas as reações foram selecionados manualmente (figura 3.2) de acordo com alguns critérios:

- O pico principal é acompanhado de 1-5 picos anteriores denominados *stutters*.
- O pico principal é aquele que apresenta uma maior intensidade de fluorescência;

- A diferença de tamanho em pares de base (pb), entre os *stutters* e os picos principais observados, é de 3pb;
- Foram considerados fragmentos inespecíficos amplificados aqueles sem a ocorrência de *stutters*.
- No caso de heterozigose, o menor alelo (aquele que apresenta um menor número de pares de base), geralmente, possui uma maior intensidade de fluorescência quando comparado ao segundo alelo da mesma amostra devido à facilidade em se amplificar fragmentos com menor número de repetições trinucleotídicas.

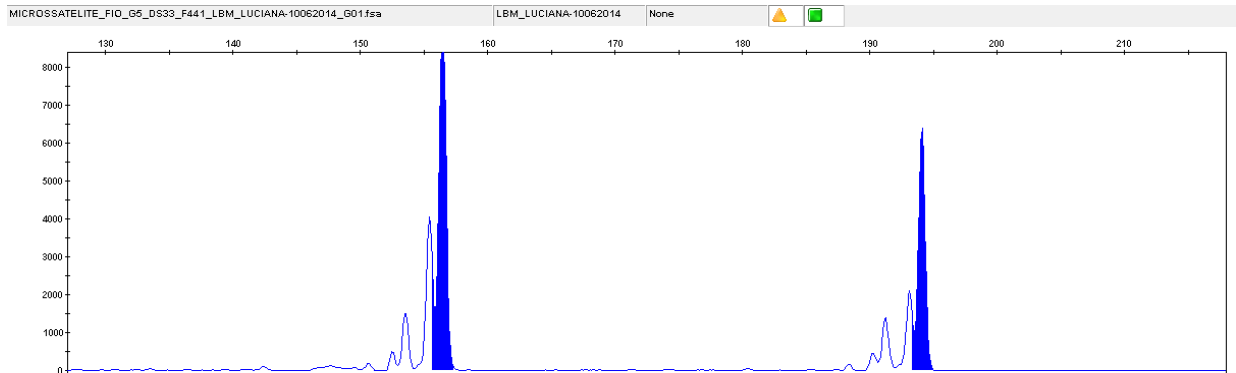


Figura 3.2: Eletoferograma fornecido pelo software *GeneMapper*.

Legenda: Eixo X: tamanho em pb. Eixo Y: unidades de fluorescência (UF). Picos azuis vazios: *Stutters*. Picos azuis cheios: picos principais (alelos específicos da PCR).

3.5 Cálculo do número de repetições trinucleotídicas

3.5.1 Cálculo do número de repetições CAG do gene *HTT*

O cálculo do número de repetições CAG do gene *HTT* foi realizado como anteriormente citado em Agostinho et al. (2012) e confirmado por Chris Kay, do laboratório do Dr. Hayden - Huntington Disease Research Group, Centre for Molecular Medicine and Therapeutics (University of British Columbia, Vancouver, Canada), utilizando protocolo descrito em Andrew et al. (1994).

000000000000000000

3.5.2 Cálculo da região CAG/CAA do gene *TBP*

Em cada um dos dois alelos do gene *TBP*, o tamanho embp do *amplicon* incluiu a repetição trinucleotídica polimórfica, mais duas regiões de hibridação dos *primers* e região não polimórfica do gene *TBP* (Figura 3.3).

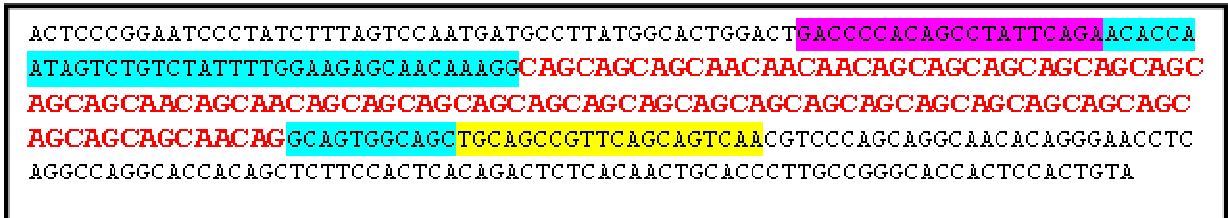


Figura 3.3: Regiões do produto de PCR do gene *TBP*.

Legenda: Região rosa: hibridação do primer TBP-F (20 pb). Região azul claro: região não polimórfica (49 pb). Pares de base representados em letras vermelhas em negrito: repetições trinucleotídicas CAG/CAA (variável). Região amarela: hibridação do primer TBP-R (20 pb).

O número de repetições trinucleotídicas em cada *amplicon* foi determinado por meio da subtração do número total de pb detectado (A), menos o número de pb das regiões não polimórficas (B), menos o número de pb da região de hibridação do primer TBP-F (C) e do primer TBP-R (D). O total da subtração foi dividido por 3 (tabela 3.4). Se o resultado era um número decimal este foi aproximado para uma unidade acima se maior ou igual a 0,50, e para uma unidade abaixo quando menor que 0,50.

O número de repetições final pode variar ± 1 devido à instabilidade da região de repetições trinucleotídicas no momento da replicação. Além disso, a variação pode ocorrer devido a matriz utilizada na análise de fragmento.

Tabela 3.2: Cálculo realizado para determinação do número de repetições trinucleotídicas CAG/CAA do gene *TBP*.

Fórmula: $(A) - [(B) + (C) + (D)] / 3 =$ Número de repetições CAG/CAA.

| Total do amplicon detectado (pb) (A) | Região não polimórfica (B) | Região de hibridação do primer TBP-F (pb) (C) | Região de hibridação do primer TBP-R (pb) (D) | Resultado de $A - (B + C + D) / 3$ | Número de repetições CAG/CAA |
|--------------------------------------|----------------------------|---|---|------------------------------------|------------------------------|
| 203 | 49 | 20 | 20 | 114/3 | 38 |

3.6 Análise estatística

Foram utilizados os programas GraphPadPrism6 e SPSS.

A normalidade dos dados foi analisada por meio dos testes Shapiro-Wilke D'Agostino & Pearson.

Foi realizada correlação de Pearson e regressão linear (simples e múltipla) para análise da influência do número de repetições (variáveis independentes) na idade de início dos sintomas motores (variável dependente). Anova foi utilizada para verificar a influência das variáveis independentes na variável dependente no modelo de regressão múltipla.

Comparação entre grupos foi realizada através do teste t de Student quando dados eram paramétricos e teste Mann–Whitney U para dados não paramétricos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Indivíduos investigados

Foram coletadas amostras de sangue periférico e/ou mucosa oral de 104 indivíduos, maiores de 18 anos, residentes no estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Dentre eles, 50 eram naturais do Estado do Rio de Janeiro, 40 do Estado de Minas Gerais, nove de Espírito Santo, dois do Estado de São Paulo, um da Bahia, um do Maranhão e um do Pará.

Dentre o total de indivíduos, 51 eram do sexo feminino e 53 do masculino.

Dos testados molecularmente para *HTT* e *TBP*, 67 apresentavam sintomas sugestivos de DH (coreia, dificuldade na fala, dificuldade na marcha e/ou rigidez muscular acompanhado ou não de emagrecimento de aproximadamente 10 kg, episódios de sociofobia) e 37 eram assintomáticos.

4.2 Investigação dos alelos *HTT*

4.2.1 Teste molecular de DH nos indivíduos da amostra

Dos 104 indivíduos testados, em relação ao gene *HTT*, 72 apresentaram o resultado molecular positivo para DH (≥ 36 repetições CAG) e 32 apresentaram o resultado molecular negativo (< 36 repetições CAG) (gráfico 4.1).

Teste Molecular para DH

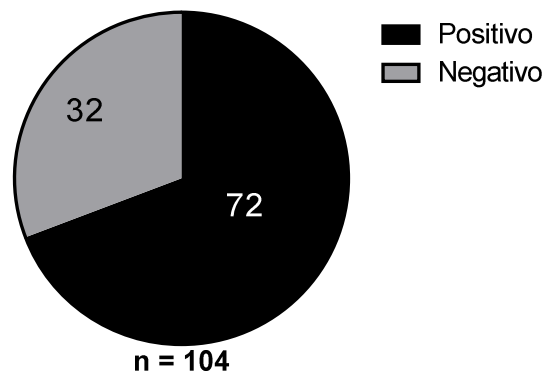


Gráfico 4.1: Resultado do teste molecular para diagnóstico de DH.

4.2.2 Alelos CAG do gene *HTT* de indivíduos molecularmente negativos para DH

Entre os 32 indivíduos diagnosticados como molecularmente negativos para DH, 29 eram assintomáticos e três tinham sintomas semelhantes à DH.

Vinte e seis indivíduos eram heterozigotos e 6 homozigotos. Todos os homozigotos apresentaram 17 repetições CAG em cada alelo.

O número de repetições CAG em indivíduos molecularmente negativos para expansões CAG no *HTT* variou de 12 a 30 repetições com uma média de 19 ± 4 repetições (mediana de 17). O alelo de maior frequência entre os normais foi aquele que apresentava 17 repetições CAG.

Em relação à classificação dos alelos, 94% (60 alelos) foram classificados como normais e 6% (4 alelos) como normais mutáveis (ou alelos intermediários).

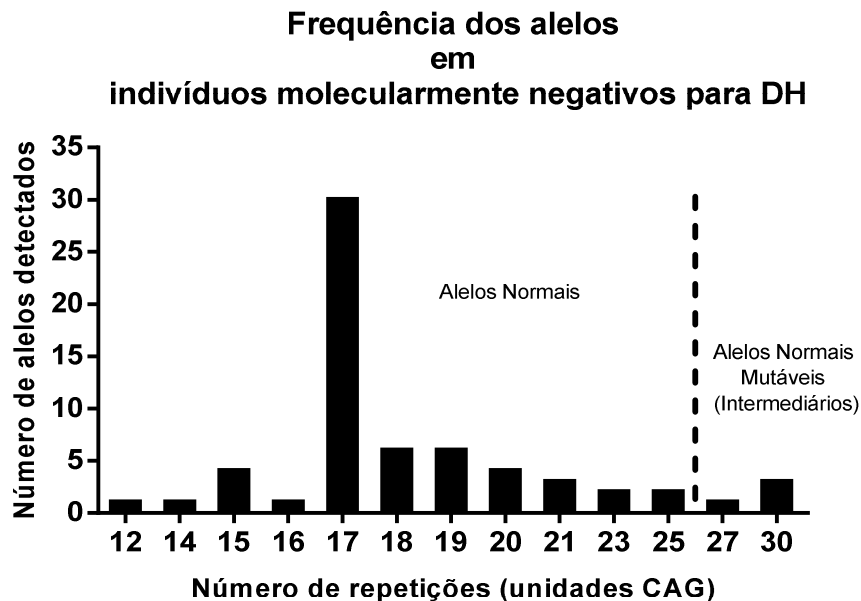


Gráfico 4.2: Número de alelos *HTT* detectados em indivíduos genotipicamente negativos para expansões CAG (n = 64 alelos)

4.2.3 Alelos CAG do gene *HTT* de indivíduos molecularmente positivos para DH

Entre os 72 indivíduos diagnosticados molecularmente como positivos para DH, 64 eram sintomáticos e 8 assintomáticos.

Todos os indivíduos com resultados de testes moleculares positivos para DH eram heterozigotos, apresentando um alelo expandido (≥ 36 repetições CAG) e outro não expandido (< 36 repetições CAG).

O número de repetições CAG dos alelos não expandidos (cromossomos normais) em indivíduos molecularmente positivos para DH variou de 14 a 30 repetições, com uma média de 19 ± 4 e mediana de 17. O alelo normal com maior frequência apresentou 17 repetições.

As repetições CAG nos alelos expandidos variaram de 39 a 62 repetições, (média 45 ± 4 , mediana 44). Os alelos expandidos com maior frequência apresentaram 44 repetições CAG.

Em relação à classificação dos alelos não expandidos, 94% (68 alelos) foram classificados como normais e 6% (4 alelos) como normais mutáveis (intermediários). Já entre os expandidos, 1% (1 alelo) foi classificado como alelo de penetrância reduzida e 99% (71 alelos) como de penetrância completa.

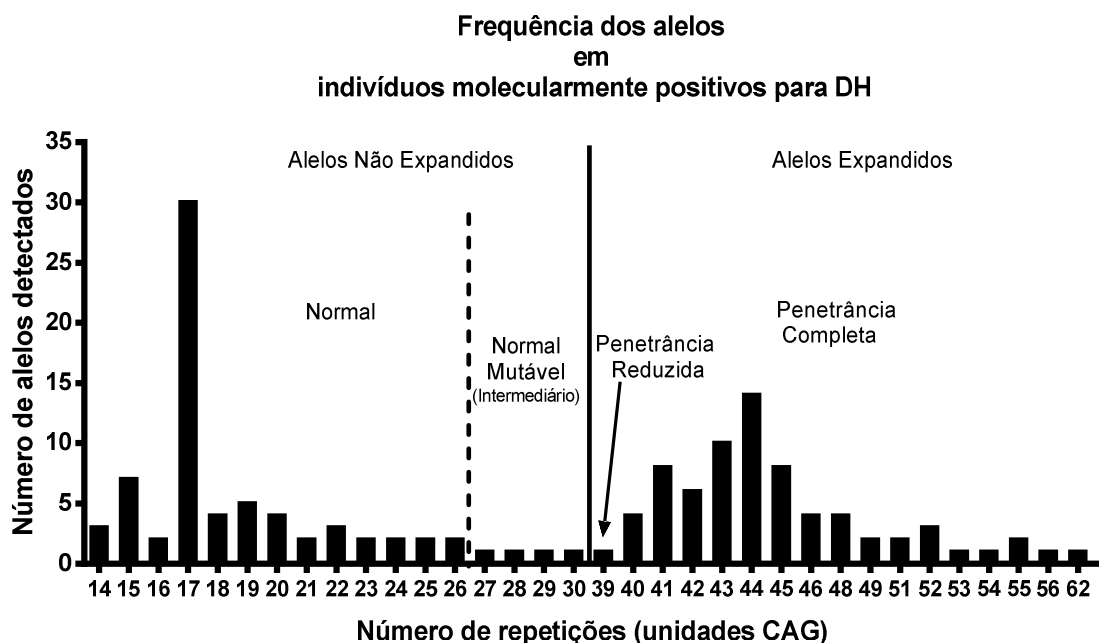


Gráfico 4.3: Número de alelos *HTT* detectados em indivíduos genotipicamente positivos para expansões CAG (n =144 alelos; 72 normais e 72 expandidos).

Em relação a suspeita de transmissão do alelo expandido, dos 72 indivíduos diagnosticados molecularmente como positivos, cinco indivíduos não souberam informar qual progenitor (pai ou mãe) era afetado, pois não tinham esta informação devido ao óbito precoce dos pais; 31 indivíduos informaram ser o alelo mutado de origem materna e outros 36, de origem paterna (gráfico 4.4).

Transmissão relatada do alelo expandido

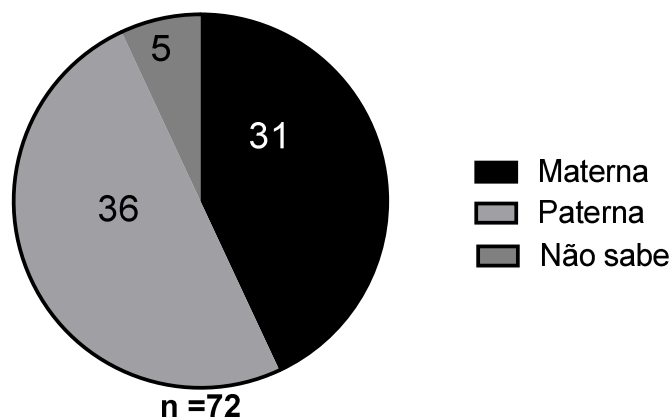


Gráfico 4.4: Transmissão relatada do alelo expandido.

4.2.4 Influência das repetições CAG do gene *HTT* na idade de início da DH

Dentre os 72 indivíduos diagnosticados molecularmente com DH, 64 eram sintomáticos e tiveram a idade de início relatada. Essa idade variou de 18 a 67 anos, com uma média de 42 ± 10 anos.

A correlação encontrada entre o tamanho dos alelos CAG e a idade de início da DH foi estatisticamente significativa, sugerindo correlação forte e negativa entre as variáveis (r de Pearson = - 0,81; $p < 0,0001$). Além disso, o número de repetições CAG em nossa amostra explica 66% ($R^2 = 0,66$; $p < 0,0001$) da variação na idade de início (gráfico 4.5).

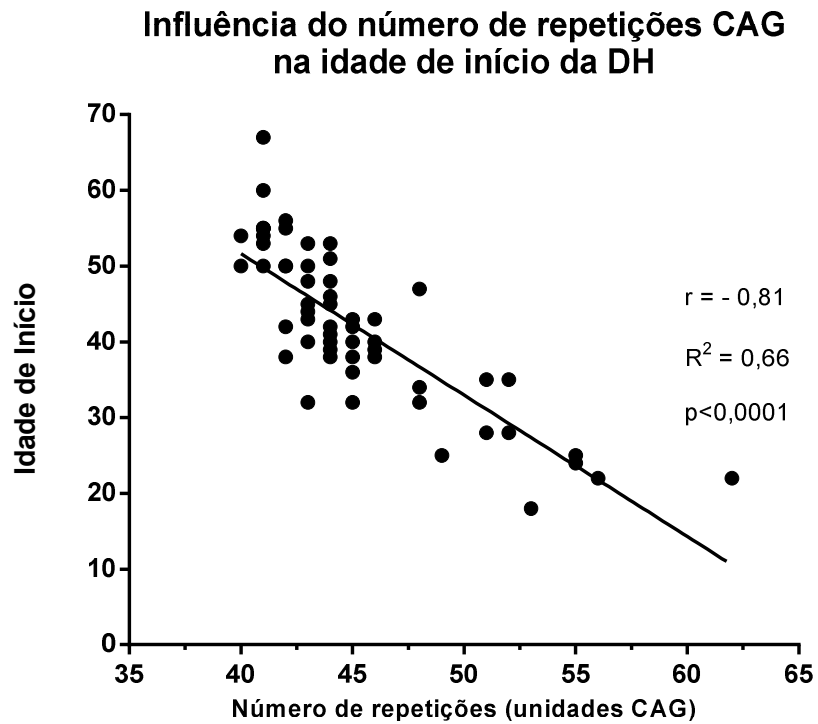


Gráfico 4.5: Influência do número de repetições CAG expandidas do gene *HTT* na idade de início da doença (n=64).

4.3 Investigação dos alelos *TBP*

4.3.1 Análise dos *primers* da PCR

A análise dos dois *primers* propostos por Koide et al. (1999) revelou que ambos possuíam um percentual GC de 55% e temperatura de hibridização de 60.5°C. Além disso, nenhum dos *primers* possuía potencial para formação de estruturas secundárias como os dímeros e *hairpins* (figuras 4.1 e 4.2).

Na primeira PCR utilizou-se o ciclo já descrito na seção 3.3.2 com 10 pmols/uL de *primer* e 20-100 ng/uL de DNA aproximadamente. Sob essas condições os eletroferogramas apresentaram picos com “estouro de sinal”. Com isso, foram realizadas algumas variações na concentração de DNA e *primer*. De tais variações, a que determinou melhor resultado foi a reação em que utilizamos 5pmols/uL de primer e aproximadamente 10-50 ng/uL de DNA aproximadamente (figura 4.4)

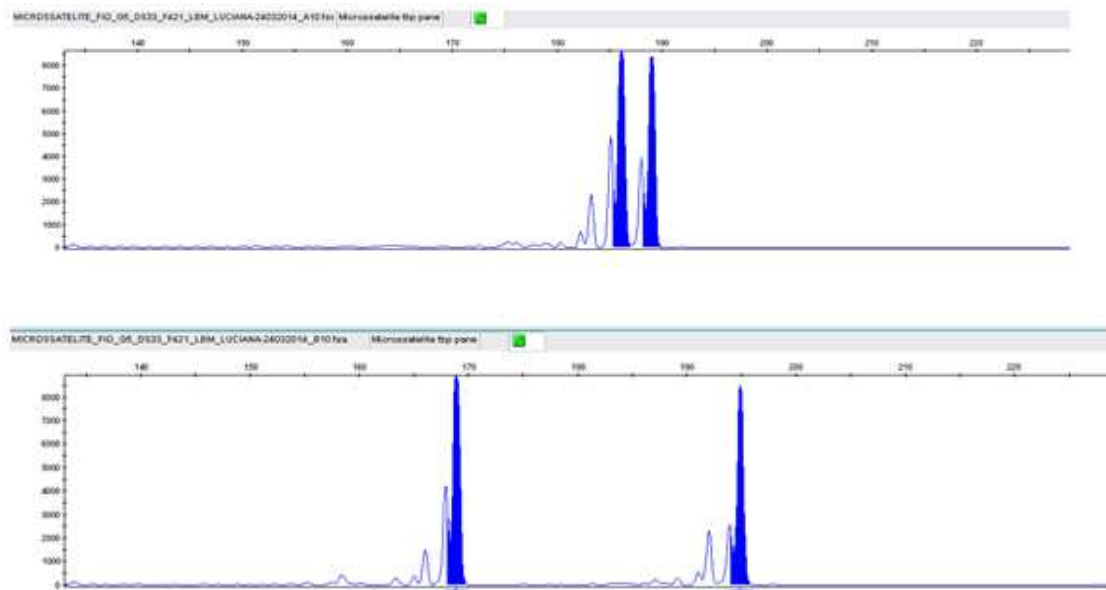


Figura 4.4: Eletroferogramas dos *amplicons* referentes às regiões polimórficas CAG/CAA do gene *TBP*.

Legenda: Os picos principais estão marcados em azul.

4.3.2 Alelos *TBP* de indivíduos molecularmente negativos e positivos para DH

Os alelos *TBP* de indivíduos molecularmente negativos para DH, em relação às repetições CAG/CAA variaram de 27 a 37 repetições, com um valor médio de 33 ± 2 repetições (mediana 34). Sendo o alelo mais frequente aquele com 34 repetições CAG/CAA (gráfico 4.6).

A maioria dos indivíduos molecularmente negativos para DH (84%) é heterozigota para os alelos do gene *TBP*.

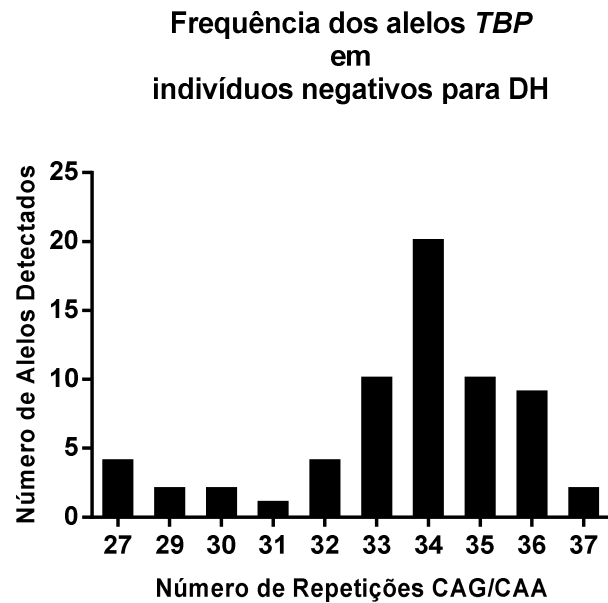


Gráfico 4.6: Número de alelos *TBP* detectados em indivíduos genotipicamente negativos para DH (n = 64 alelos).

Os alelos *TBP* de indivíduos molecularmente positivos para DH possuíam de 23 a 38 repetições, com um valor médio de 34 ± 2 repetições e mediana de 34. O alelo mais frequente mostrou 36 repetições CAG/CAA (gráfico 4.7).

A maioria dos indivíduos molecularmente positivos (81%) era heterozigota para o alelo *TBP*.

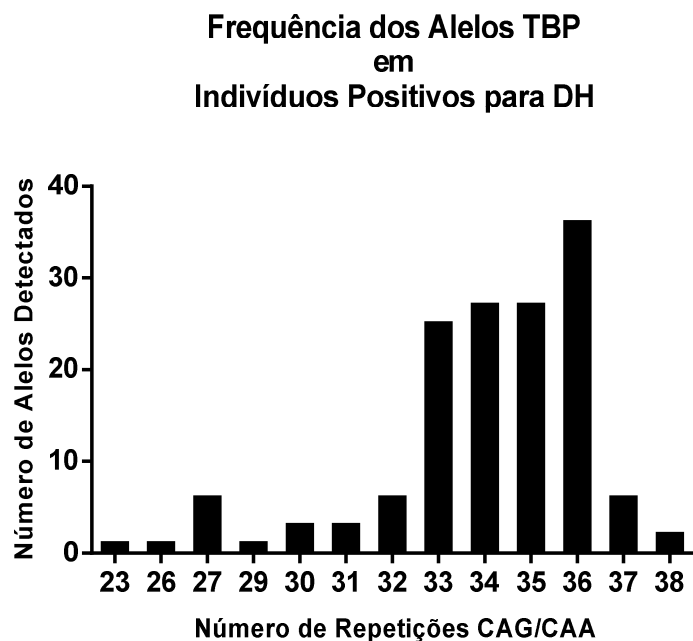


Gráfico 4.7: Número de alelos *TBP* detectados em indivíduos genotipicamente positivos para DH (n=144).

A comparação entre os grupos de indivíduos molecularmente positivos e negativos para DH mostrou que não existe diferença significativa entre o número de repetições CAG/CAA dos alelos *TBP* entre os grupos estudados ($p>0,05$) (gráfico 4.8).

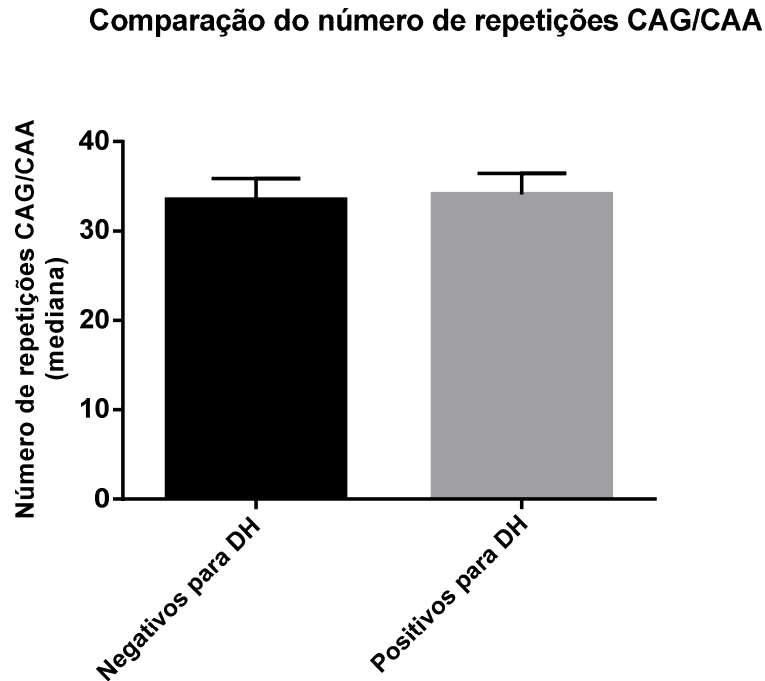


Gráfico 4.8: Comparação das medianas dos números de repetições CAG/CAA dos alelos *TBP* entre indivíduos diagnosticados molecularmente como negativos e positivos para DH.
($p>0,05$) (n=144 alelos positivos, n=64 alelos negativos)

4.3.3 Influência das repetições CAG/CAA do gene *TBP* na idade de início da DH

A correlação entre o maior número de repetições CAG/CAA do alelo *TBP* e a idade de início da DH relatada por 64 indivíduos diagnosticados molecularmente como positivos para DH, revelou que não existe associação e nem influência significativa ($p>0,05$) do alelo *TBP* com maior número de repetições CAG/CAA na idade de início da doença (gráfico 4.9).

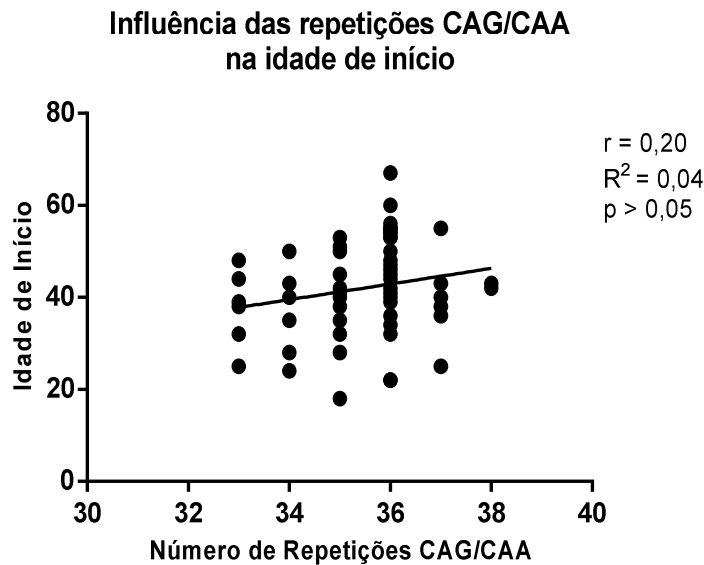


Gráfico 4.9: Influência do número de repetições CAG/CAA do maior alelo *TBP* na idade de início da DH(n=64).

A comparação, entre idade de início da DH em indivíduos que possuem pelo menos um dos alelos com ≤ 35 repetições CAG/CAA, com a idade de início da DH em indivíduos com alelos que somente possuem >35 repetições (gráfico 4.10), revelou que indivíduos com >35 repetições possuem uma tendência a uma idade de início mais tardia apesar dessa tendência não ser estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

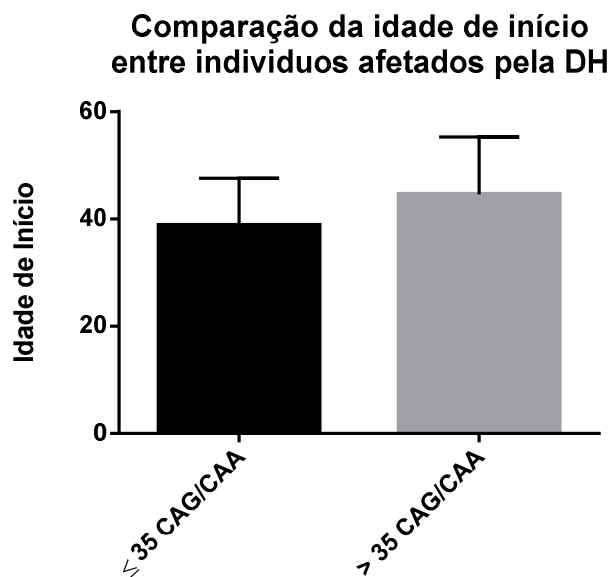


Gráfico 4.10: Comparação entre idade de início de indivíduos afetados pela DH que possuem pelos menos um dos alelos com ≤ 35 repetições CAG/CAA e indivíduos com >35 repetições CAG/CAA em seus dois alelos. ($p > 0,05$, n de indivíduos com ≤ 35 repetições = 31; n de indivíduos com >35 repetições = 33)

4.3.4 Genótipos *TBP*

Em relação aos genótipos *TBP* de indivíduos molecularmente negativos para DH, foram identificados 18 genótipos diferentes (Tabela 4.1). Os genótipos mais frequentes nesses indivíduos, sendo apresentados por quatro indivíduos cada, foram $(CAG/CAA)_{33} / (CAG/CAA)_{34}$ e $(CAG/CAA)_{34} / (CAG/CAA)_{36}$. A frequência relativa desses genótipos representa 26% do total.

Entre os molecularmente positivos para DH, foram identificados 29 genótipos diferentes (tabela 4.2). Sendo o mais frequente o genótipo $(CAG/CAA)_{34} / (CAG/CAA)_{35}$, sendo apresentado por nove indivíduos, representando 13% dos genótipos totais.

Indivíduos molecularmente positivos para DH, com mesmo genótipo *TBP* e com idade de início relatada, apresentaram variação entre si na idade de início da DH (tabela 4.2).

Tabela 4.1: Frequência de genótipos dos alelos *TBP* de indivíduos molecularmente negativos para DH

| Genótipo | Frequência Absoluta | Frequência Relativa (%) |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|
| $(CAG/CAA)_{27} / (CAG/CAA)_{32}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{27} / (CAG/CAA)_{34}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{27} / (CAG/CAA)_{36}$ | 2 | 6 |
| $(CAG/CAA)_{29} / (CAG/CAA)_{30}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{29} / (CAG/CAA)_{37}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{30} / (CAG/CAA)_{36}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{31} / (CAG/CAA)_{33}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{32} / (CAG/CAA)_{33}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{32} / (CAG/CAA)_{34}$ | 2 | 6 |
| $(CAG/CAA)_{33} / (CAG/CAA)_{33}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{33} / (CAG/CAA)_{34}$ | 4 | 13 |
| $(CAG/CAA)_{33} / (CAG/CAA)_{35}$ | 2 | 6 |
| $(CAG/CAA)_{34} / (CAG/CAA)_{34}$ | 3 | 9 |
| $(CAG/CAA)_{34} / (CAG/CAA)_{35}$ | 3 | 9 |
| $(CAG/CAA)_{34} / (CAG/CAA)_{36}$ | 4 | 13 |
| $(CAG/CAA)_{35} / (CAG/CAA)_{35}$ | 1 | 3 |
| $(CAG/CAA)_{35} / (CAG/CAA)_{36}$ | 2 | 6 |
| $(CAG/CAA)_{35} / (CAG/CAA)_{37}$ | 1 | 3 |
| Total | 32 | 100% |

Tabela 4.2: Frequência de genótipos dos alelos *TBP* de indivíduos molecularmente positivos para DH e a idade de início para cada genótipo

| Genótipo | Frequência Absoluta | Frequência Relativa (%) | Idade de Início da DH | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|-------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1) (CAG/CAA) ₂₃ /(CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 47 | | | | | | | | | | | | |
| 2) (CAG/CAA) ₂₆ /(CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 40 | | | | | | | | | | | | |
| 3) (CAG/CAA) ₂₇ /(CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 44 | | | | | | | | | | | | |
| 4) (CAG/CAA) ₂₇ /(CAG/CAA) ₃₄ | 2 | 3 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | |
| 5) (CAG/CAA) ₂₇ /(CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 54 | | | | | | | | | | | | |
| 6) (CAG/CAA) ₂₉ /(CAG/CAA) ₃₀ | 1 | 1 | - | | | | | | | | | | | | |
| 7) (CAG/CAA) ₃₀ /(CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 50 | | | | | | | | | | | | |
| 8) (CAG/CAA) ₃₀ /(CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 54 | | | | | | | | | | | | |
| 9) (CAG/CAA) ₃₁ /(CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 40 | | | | | | | | | | | | |
| 10) (CAG/CAA) ₃₁ /(CAG/CAA) ₃₅ | 2 | 3 | 35 | 38 | | | | | | | | | | | |
| 11) (CAG/CAA) ₃₂ /(CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 38 | | | | | | | | | | | | |
| 12) (CAG/CAA) ₃₂ /(CAG/CAA) ₃₄ | 2 | 3 | 35 | 43 | | | | | | | | | | | |
| 13) (CAG/CAA) ₃₂ /(CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 42 | | | | | | | | | | | | |
| 14) (CAG/CAA) ₃₂ /(CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 38 | | | | | | | | | | | | |
| 15) (CAG/CAA) ₃₂ /(CAG/CAA) ₃₈ | 1 | 1 | 43 | | | | | | | | | | | | |
| 16) (CAG/CAA) ₃₃ /(CAG/CAA) ₃₃ | 5 | 7 | - | 25 | 32 | | | | | | | | | | |
| 17) (CAG/CAA) ₃₃ /(CAG/CAA) ₃₄ | 3 | 4 | 24 | 28 | 40 | | | | | | | | | | |
| 18) (CAG/CAA) ₃₃ /(CAG/CAA) ₃₅ | 5 | 7 | - | 35 | 38 | 50 | 53 | | | | | | | | |
| 19) (CAG/CAA) ₃₃ /(CAG/CAA) ₃₆ | 6 | 8 | - | 32 | 39 | 36 | 50 | 56 | | | | | | | |
| 20) (CAG/CAA) ₃₃ /(CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 55 | | | | | | | | | | | | |
| 21) (CAG/CAA) ₃₄ /(CAG/CAA) ₃₅ | 9 | 13 | - | - | - | 28 | 32 | 40 | 41 | 45 | 51 | | | | |
| 22) (CAG/CAA) ₃₄ /(CAG/CAA) ₃₆ | 8 | 11 | 22 | 40 | 41 | 42 | 44 | 45 | 55 | 67 | | | | | |
| 23) (CAG/CAA) ₃₄ /(CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 40 | | | | | | | | | | | | |
| 24) (CAG/CAA) ₃₅ /(CAG/CAA) ₃₅ | 2 | 3 | 18 | 32 | | | | | | | | | | | |
| 25) (CAG/CAA) ₃₅ /(CAG/CAA) ₃₆ | 3 | 4 | 22 | 53 | 60 | | | | | | | | | | |
| 26) (CAG/CAA) ₃₅ /(CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 25 | | | | | | | | | | | | |
| 27) (CAG/CAA) ₃₅ /(CAG/CAA) ₃₈ | 1 | 1 | 42 | | | | | | | | | | | | |
| 28) (CAG/CAA) ₃₆ /(CAG/CAA) ₃₆ | 7 | 10 | - | 34 | 46 | 48 | 53 | 46 | 55 | | | | | | |
| 29) (CAG/CAA) ₃₆ /(CAG/CAA) ₃₇ | 2 | 3 | 36 | 43 | | | | | | | | | | | |
| Total | 72 | 100% | | | | | | | | | | | | | |

Tabela 4.2 : (-) indivíduos assintomáticos ou que não souberam relatar a idade de início dos sintomas, com diagnóstico molecular positivo para DH.

4.4 Correlação entre o número de repetições CAG dos alelos *HTT* e a idade de início da DH

4.4.1 Regressão múltipla

Quando adicionamos a um modelo de regressão múltipla as variáveis independentes *htt_maior* (maior alelo *HTT*), *htt_menor* (menor alelo *HTT*), *tbp_menor* (menor alelo *TBP*) e *tbp_maior* (maior alelo *TBP*), sendo a variável

dependente a idade de início da doença relatada pelo paciente ou cuidador, observamos que o modelo com as variáveis adicionadas para regressão explica 66% da idade de início da Doença de Huntington ($R^2 = 0,66; p < 0,0001$) (tabela 4.3). Apesar disso, a única variável significativa ($p < 0,0001$) para o modelo foi a *htt_maior* (maior alelo *HTT*) (tabela 4.4).

Tabela 4.3: Valores obtidos pelo modelo de regressão

| R^2 | R^2 ajustado | F | Significância |
|-------|----------------|-------|---------------|
| 0,68 | 0,66 | 31,50 | < 0,0001 |

Tabela 4.4: Coeficientes de regressão e nível de significância.

| Variável Independente | B | t | Significância (p valor) |
|-----------------------|--------|---------|-------------------------|
| <i>htt_menor</i> | -0,275 | -1,224 | 0,226 |
| <i>htt_maior</i> | -1,787 | -10,256 | <0,0001 |
| <i>tbp_menor</i> | -0,208 | -0,638 | 0,526 |
| <i>tbp_maior</i> | 0,667 | 0,961 | 0,341 |

4.4.2 Genótipos *HTT* e *TBP* associados

Quando associamos os alelos do gene *HTT* com os alelos do gene *TBP*, de indivíduos molecularmente negativos para DH, foram encontrados 31 genótipos diferentes (tabela 4.5). O genótipo $(CAG)_{17}(CAG)_{19}HTT/(CAG/CAA)_{27}(CAG/CAA)_{36}TBP$ foi apresentado por dois indivíduos, todos os outros genótipos com outras combinações de alelos *HTT* e *TBP* foram apresentados por apenas um indivíduo molecularmente negativo.

Tabela 4.5: Frequência de genótipos dos alelos *HTT* e alelos *TBP* associados, em indivíduos molecularmente negativos para DH

| Genótipo <i>HTT</i> | Genótipo <i>TBP</i> | Frequência Absoluta | Frequência Relativa (%) |
|---|---|---------------------|-------------------------|
| (CAG) ₁₂ / (CAG) ₁₇ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₄ / (CAG) ₂₁ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₁₇ | (CAG/CAA) ₃₁ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₁₉ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₂₅ | (CAG/CAA) ₂₉ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₆ / (CAG) ₃₀ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₁₇ | (CAG/CAA) ₂₉ / (CAG/CAA) ₃₀ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₀ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₁₈ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₁₉ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₆ | 2 | 6 |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₂₀ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₂ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₂₁ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 3 |
| | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₂₃ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₂₇ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₃₀ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₈ / (CAG) ₁₉ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₈ / (CAG) ₃₀ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₂₀ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 3 |
| (CAG) ₂₃ / (CAG) ₂₅ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 3 |
| Total | | 32 | 100 |

Entre os indivíduos positivos molecularmente para DH, com relação aos alelos dos genes *HTT* e *TBP* analisados em conjunto, foram encontrados 67 genótipos diferentes (tabela 4.6), sendo o mais frequente o genótipo (CAG)₁₇(CAG)₄₁ / (CAG/CAA)₃₆(CAG/CAA)₃₆ apresentado por três indivíduos. O segundo genótipo mais frequente foram os genótipos (CAG)₁₇(CAG)₄₂ / (CAG/CAA)₃₃(CAG/CAA)₃₆, (CAG)₁₇(CAG)₄₄ / (CAG/CAA)₃₄(CAG/CAA)₃₅ e (CAG)₂₀(CAG)₄₃ / (CAG/CAA)₃₄(CAG/CAA)₃₆ apresentados por dois indivíduos cada.

Tabela 4.6: Frequência dos genótipos dos alelos *TBP* e *HTT* associados, em indivíduos molecularmente positivos para DH e idade de início

| Genótipo HTT | Genótipo TBP | Frequência Absoluta | Frequência Relativa (%) | Idade de Início da DH | | |
|---|---|---------------------|-------------------------|-----------------------|----|----|
| | | | | | | |
| (CAG) ₁₄ / (CAG) ₄₁ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 54 | | |
| (CAG) ₁₄ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 41 | | |
| (CAG) ₁₄ / (CAG) ₅₂ | (CAG/CAA) ₃₁ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 35 | | |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₂₆ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 40 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 40 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 53 | | |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₄₆ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 38 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₈ | 1 | 1 | 43 | | |
| (CAG) ₁₅ / (CAG) ₄₈ | (CAG/CAA) ₂₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 47 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 32 | | |
| (CAG) ₁₆ / (CAG) ₄₀ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₁₆ / (CAG) ₅₁ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 35 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₀ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 50 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₀ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 54 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₁ | (CAG/CAA) ₃₀ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 50 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 55 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 60 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₆ | 3 | 4 | 53 | 55 | 55 |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₂ | (CAG/CAA) ₃₁ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 38 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 50 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 2 | 3 | 50 | 56 | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 55 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 42 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₃ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 50 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 43 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 45 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 40 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 53 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 38 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 39 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 2 | 3 | 41 | 45 | |
| | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 36 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 43 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₈ | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 34 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₄₉ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 25 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₅₅ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 24 | | |
| (CAG) ₁₇ / (CAG) ₅₆ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 22 | | |
| (CAG) ₁₈ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 48 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₁ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 40 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 39 | | |
| (CAG) ₁₈ / (CAG) ₅₂ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 35 | | |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₄₁ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 67 | | |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₄₃ | (CAG/CAA) ₂₇ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 44 | | |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 42 | | |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₈ | 1 | 1 | 42 | | |
| (CAG) ₁₉ / (CAG) ₅₃ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 18 | | |
| (CAG) ₂₀ / (CAG) ₄₃ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₆ | 2 | 3 | 40 | 44 | |
| (CAG) ₂₀ / (CAG) ₄₉ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₂₀ / (CAG) ₅₄ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₂₁ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | - | | |

| | | | | | | |
|---|---|----|-----|----|--|--|
| (CAG) ₂₁ / (CAG) ₅₂ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 28 | | |
| (CAG) ₂₂ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 46 | | |
| (CAG) ₂₂ / (CAG) ₅₅ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 25 | | |
| (CAG) ₂₂ / (CAG) ₆₂ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 22 | | |
| (CAG) ₂₃ / (CAG) ₄₃ | (CAG/CAA) ₃₅ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 32 | | |
| (CAG) ₂₃ / (CAG) ₄₄ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 51 | | |
| (CAG) ₂₄ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₂₄ / (CAG) ₄₈ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 32 | | |
| (CAG) ₂₅ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 32 | | |
| | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₇ | 1 | 1 | 36 | | |
| (CAG) ₂₆ / (CAG) ₃₉ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₂₆ / (CAG) ₄₀ | (CAG/CAA) ₂₉ / (CAG/CAA) ₃₀ | 1 | 1 | - | | |
| (CAG) ₂₇ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₂ / (CAG/CAA) ₃₃ | 1 | 1 | 38 | | |
| (CAG) ₂₈ / (CAG) ₄₃ | (CAG/CAA) ₃₆ / (CAG/CAA) ₃₆ | 1 | 1 | 48 | | |
| (CAG) ₂₉ / (CAG) ₄₅ | (CAG/CAA) ₃₄ / (CAG/CAA) ₃₅ | 1 | 1 | 40 | | |
| (CAG) ₃₀ / (CAG) ₅₁ | (CAG/CAA) ₃₃ / (CAG/CAA) ₃₄ | 1 | 1 | 28 | | |
| Total | | 72 | 100 | | | |

Tabela 4.6 : (-) indivíduos assintomáticos ou que não souberam relatar a idade de início dos sintomas, com diagnóstico molecular positivo para DH.

4.5 Análises intra e intergeracional das repetições CAG dos alelos *HTT* e CAG/CAA dos alelos *TBP*

Com o intuito de realizar as análises intra e intergeracional dos alelos investigados, foram construídos dezenove heredogramas nos quais foram representados 79 indivíduos investigados (figuras 4.6 a 4.24). Só foram construídos heredogramas de interesse para análise inter e intrageracional. Dessa forma, se um indivíduo era o único investigado da sua família, tal indivíduo não teve um heredograma construído. As legendas para os símbolos dos heredogramas estão na figura 4.5 abaixo.

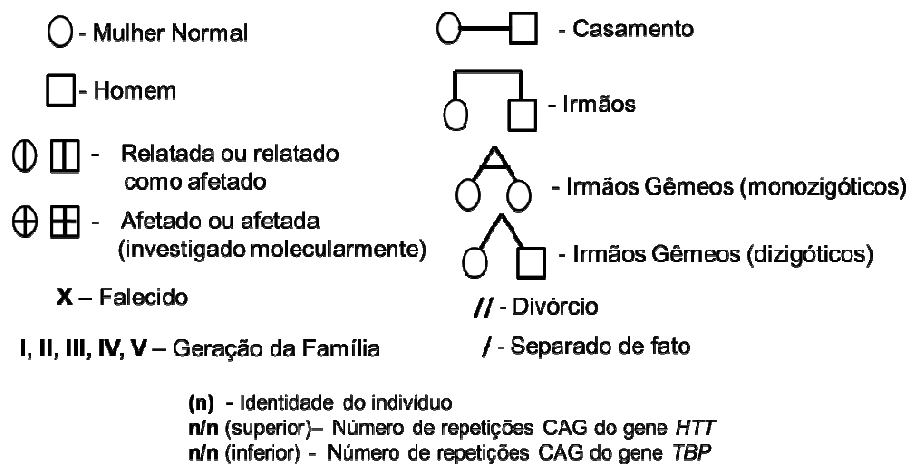


Figura 4.5: Legenda para os símbolos dos heredogramas.

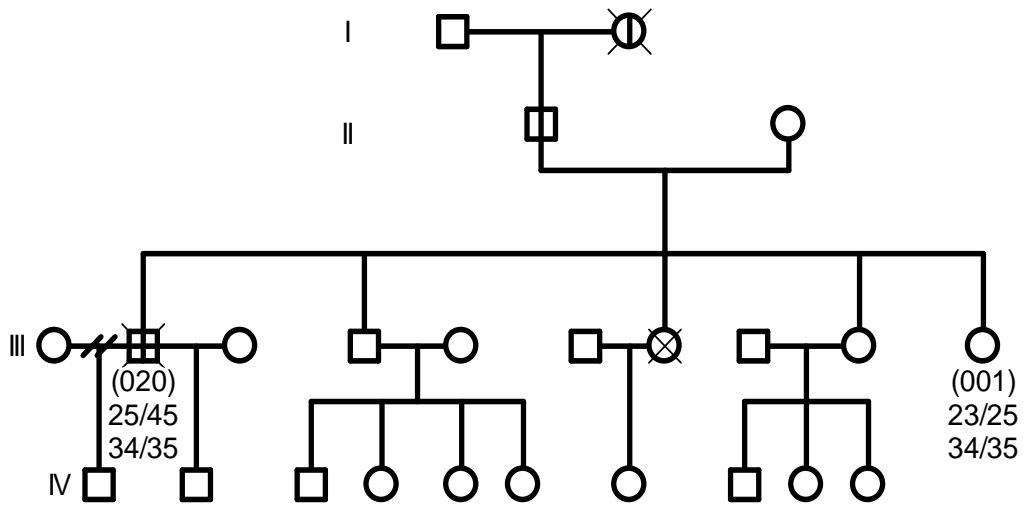


Figura 4.6: Heredograma dos indivíduos 001 e 020.

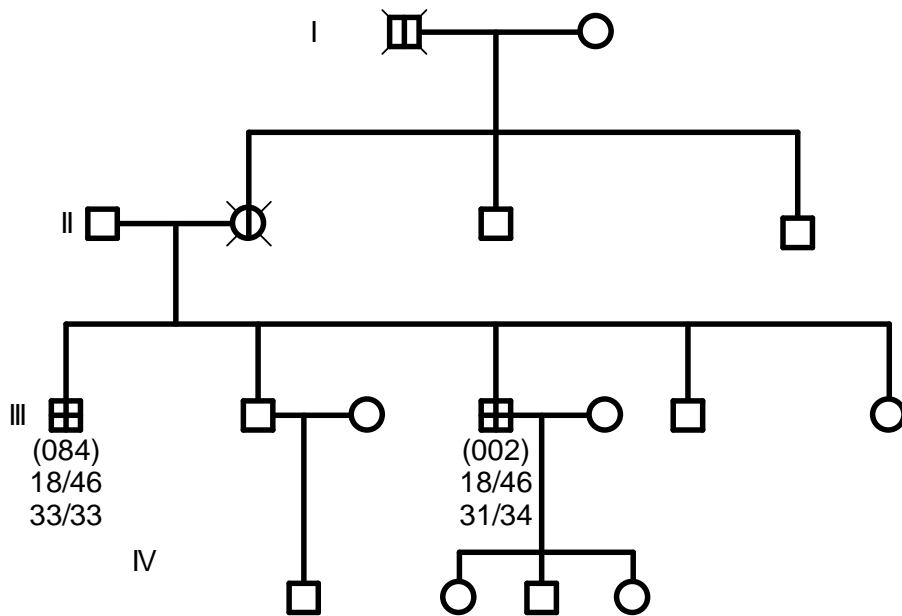


Figura 4.7.:Heredograma dos indivíduos 002 e 084

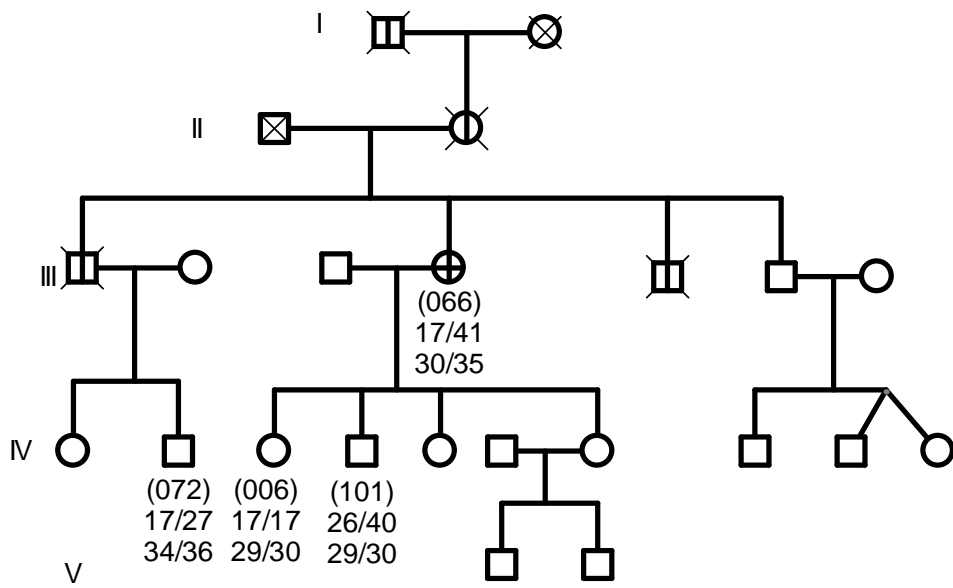


Figura 4.8: Heredograma Indivíduos 006, 066, 072 e 101

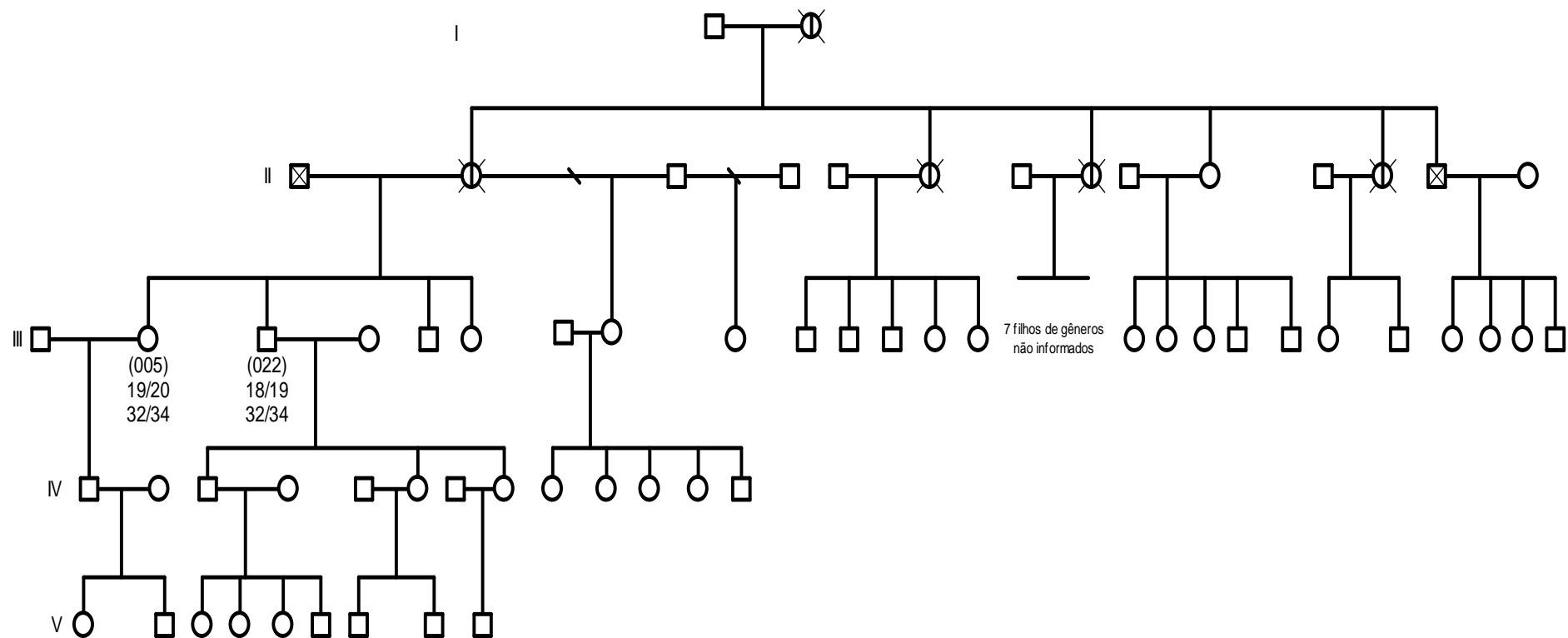


Figura 4.9: Heredograma dos indivíduos 005 e 022

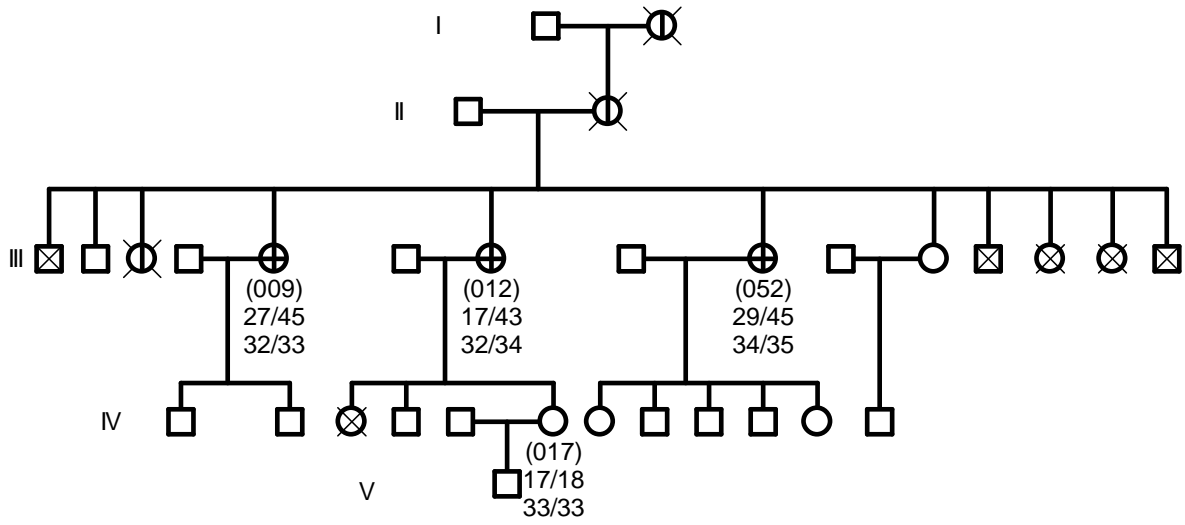


Figura 4.10: Heredograma dos indivíduos 009, 012, 017 e 052

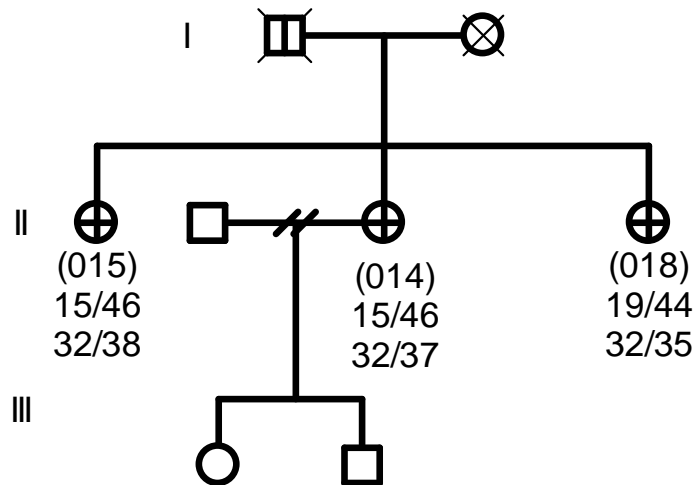


Figura 4.11: Heredograma dos indivíduos 014, 015 e 018

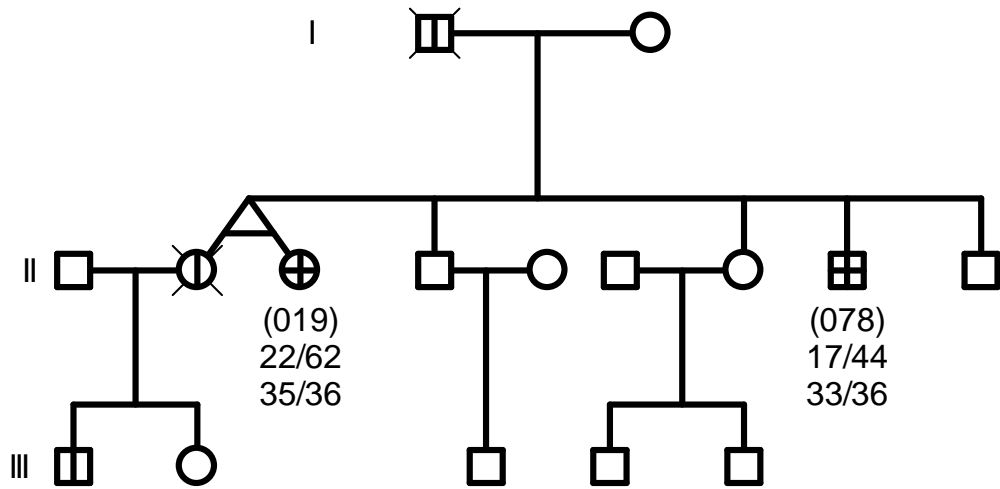


Figura 4.12: Heredograma dos indivíduos 019 e 078

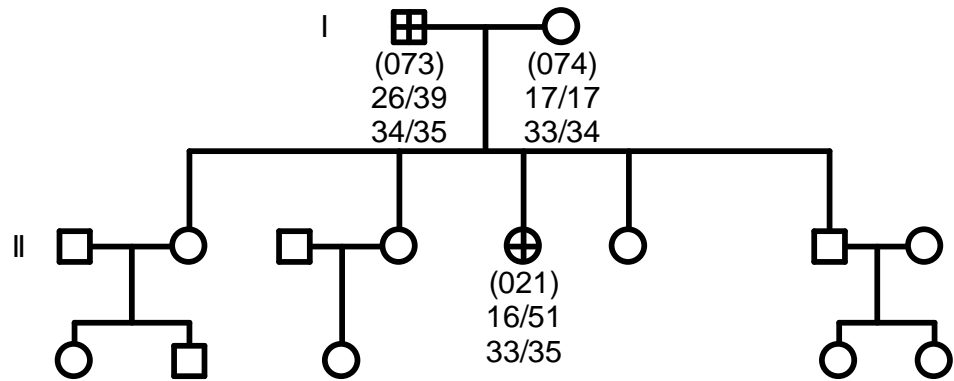


Figura 4.13: Heredograma dos indivíduos 021, 073 e 074

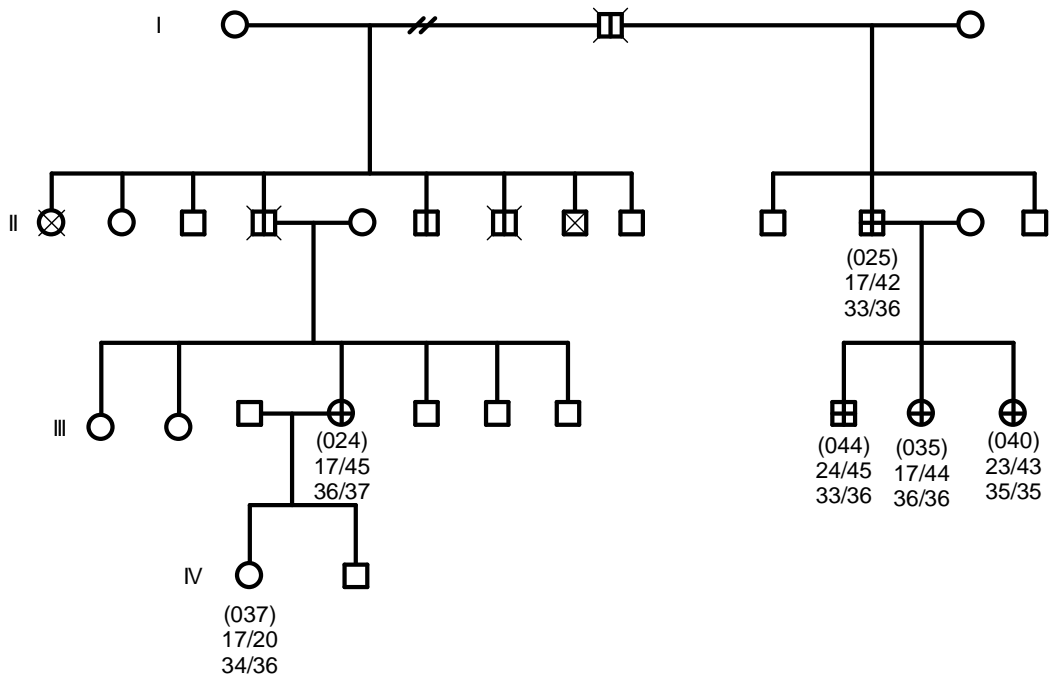


Figura 4.14: Heredograma dos indivíduos 024, 025, 035, 037, 040 e 044.

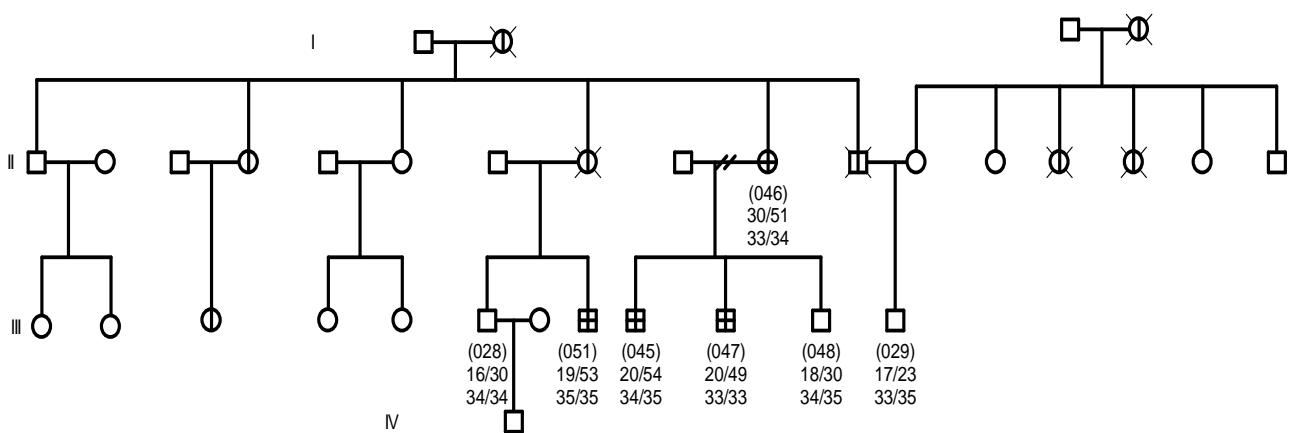


Figura 4.15: Heredograma dos indivíduos 028, 029, 045, 046, 047, 048 e 051

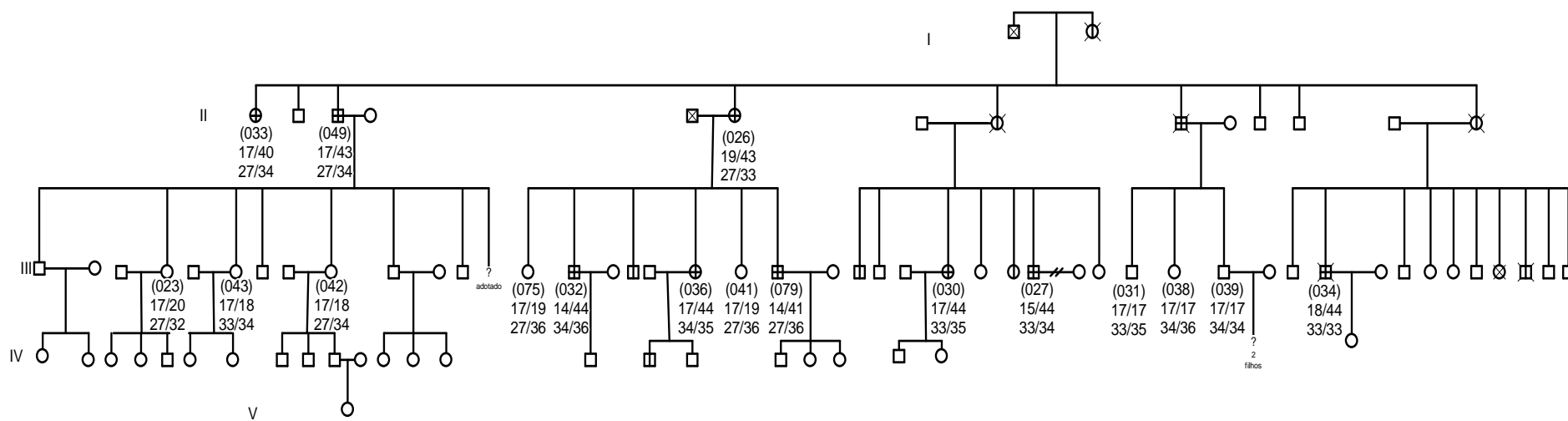


Figura 4.16: Heredograma dos indivíduos 23, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 41, 42, 43, 49, 75 e 79.

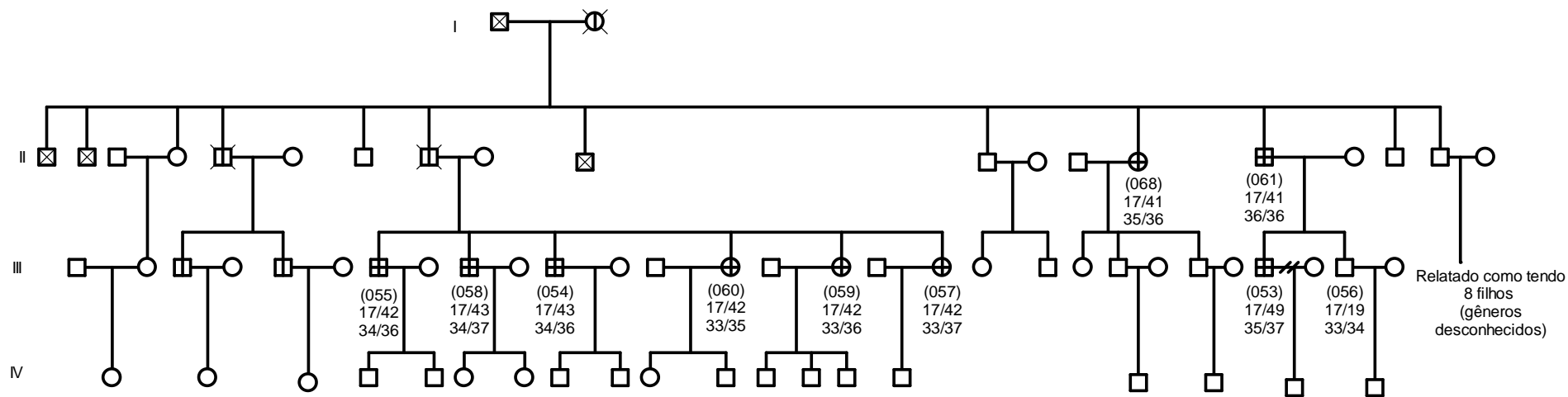


Figura 4.17: Heredograma dos indivíduos 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 e 68.

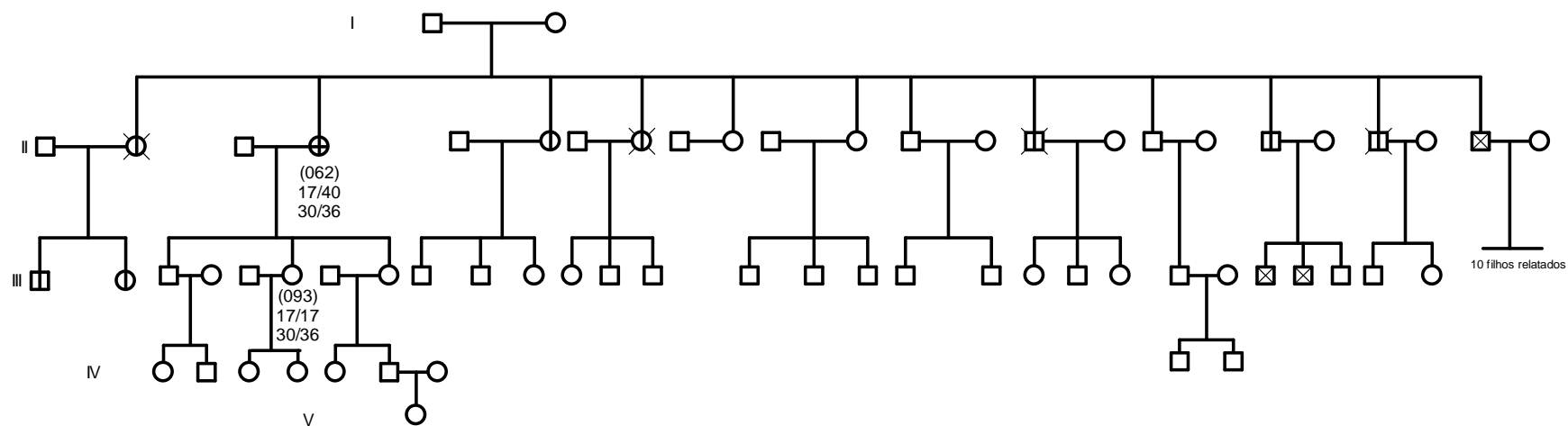


Figura 4.18: Heredograma dos indivíduos 62 e 93.

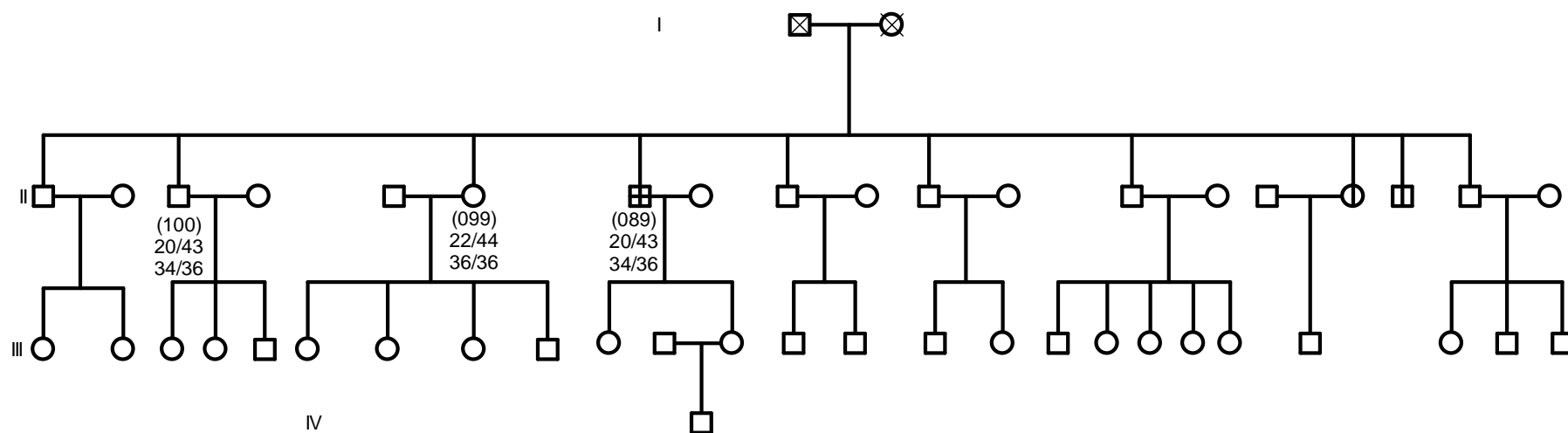


Figura 4.19: Heredograma dos indivíduos 89, 99 e 100

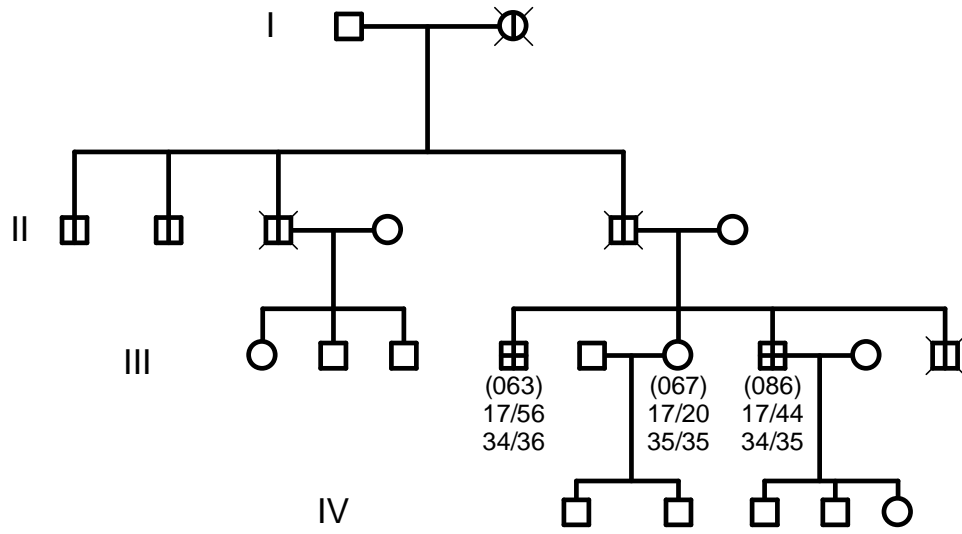


Figura 4.20: Heredograma dos indivíduos 63, 67 e 86

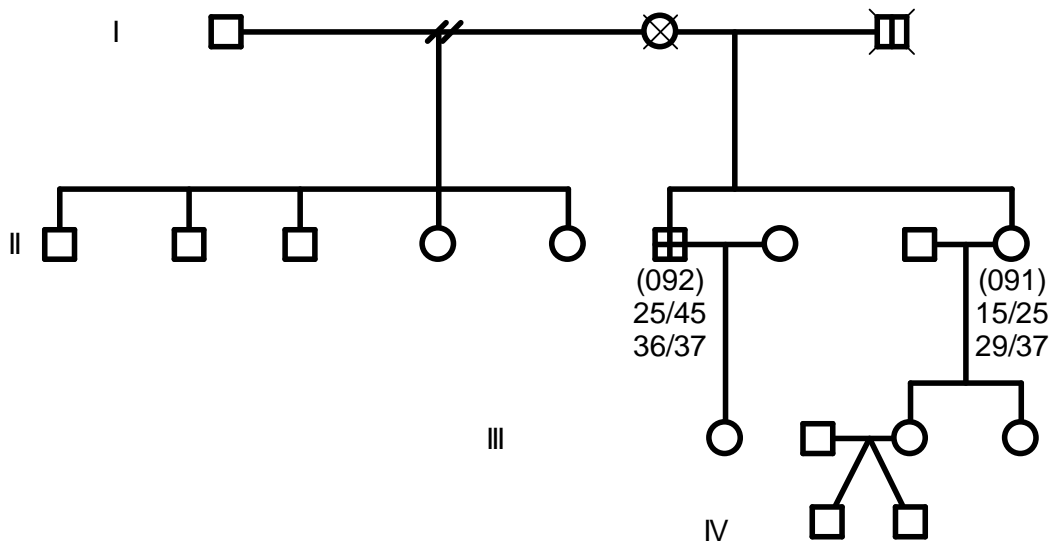


Figura 4.21: Heredograma dos indivíduos 91 e 92

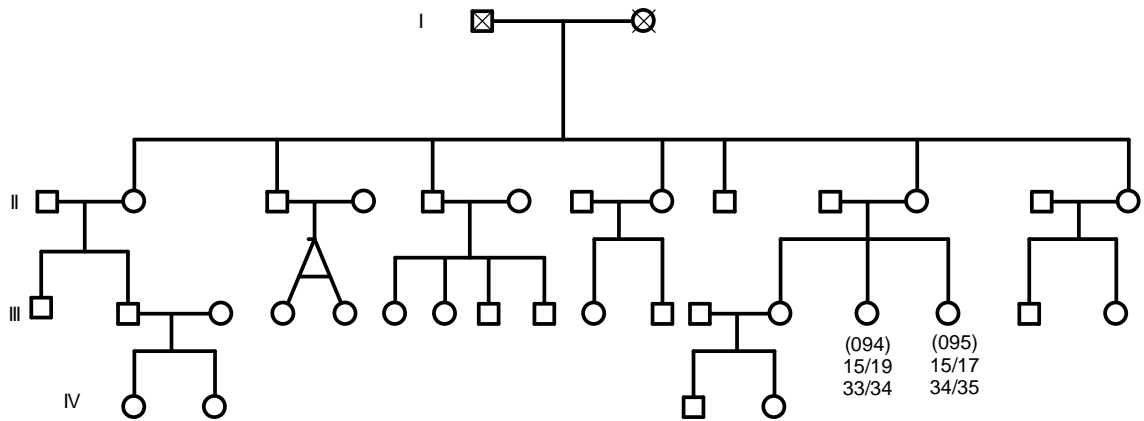


Figura 4.22: Heredograma dos indivíduos 94 e 95

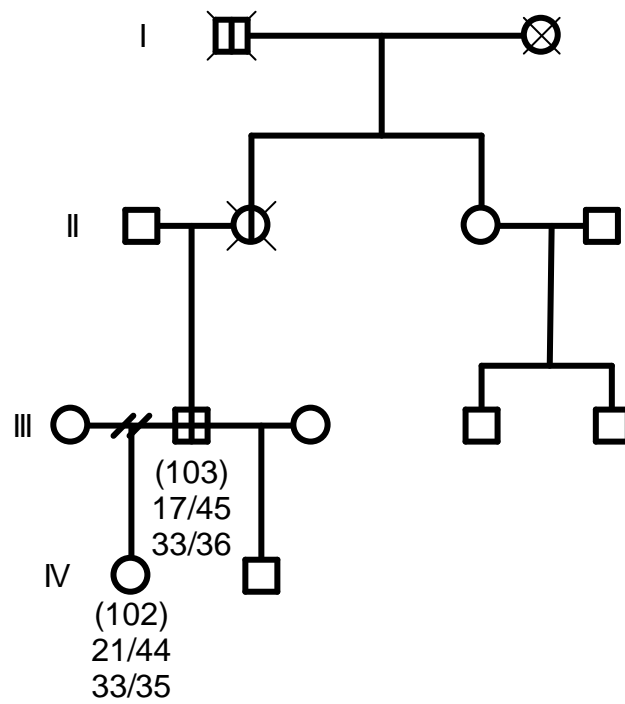


Figura 4.23: Heredograma dos Indivíduos 102 e 103

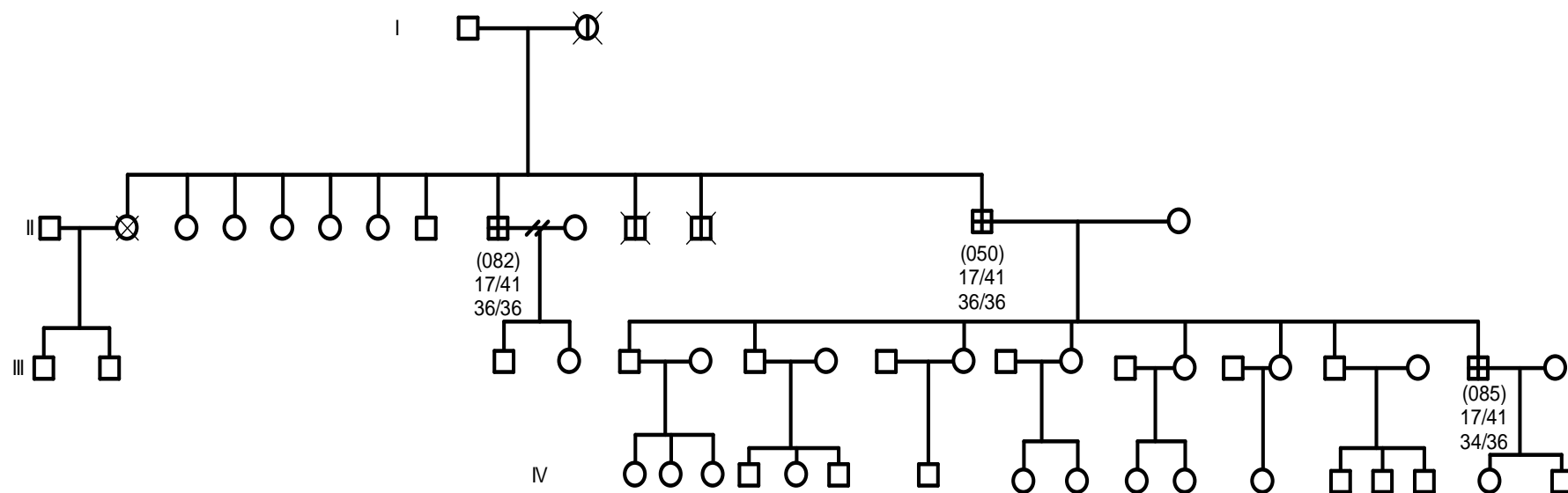


Figura 4.24: Heredograma dos Indivíduos 50, 82 e 85

A análise intergeracional (entre gerações) dos alelos *HTT* expandidos (≥ 36 CAG) (tabela 4.7) mostra que os casos de contração (-1 e -2) das expansões CAG ocorreram na maioria das vezes quando a transmissão era materna, enquanto os casos de maiores expansões (+8 e +12) entre gerações ocorreram quando a transmissão do alelo expandido foi de origem paterna.

Tabela 4.7: Análise intergeracional dos alelos *HTT* expandidos

| Heredograma | Transmissão | Alelo expandido (Pai/ Mãe) | Alelo expandido (Filho) | Alelo expandido (Filho) | Alelo expandido (Filho) | Diferença (pai/mãe para filho) |
|-------------|-------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Figura 4.8 | Materna | 41 | 40 | | | -1 |
| Figura 4.13 | Paterna | 39 | 51 | | | +12 |
| Figura 4.14 | Paterna | 42 | 45 | 44 | 43 | +1; +2 e +3 |
| Figura 4.15 | Materna | 51 | 54 | 49 | | - 2 e +3 |
| Figura 4.16 | Materna | 43 | 44 | 44 | 41 | -2 e +1 |
| Figura 4.17 | Paterna | 41 | 49 | | | +8 |
| Figura 4.23 | Paterna | 45 | 44 | | | -1 |
| Figura 4.24 | Paterna | 41 | 41 | | | 0 |

A análise intrageracional (entre irmãos) dos alelos *HTT* expandidos (≥ 36 CAG) (tabela 4.8) mostra que na maior parte dos casos o número de repetições entre irmãos apresentava uma variação de no máximo de 3 unidades CAG. Apenas em três casos da análise intergeracional essa diferença foi maior (5 CAG, 12 CAG e 18 CAG). Nesses últimos casos, a maior diferença entre irmãos (12 e 18 CAG) se deu quando a transmissão foi paterna.

Tabela 4.8: Análise intrageracional (entre irmãos) dos alelos *HTT* expandidos

| Heredograma | Suspeita de Transmissão | Alelo expandido (Irmão) | Alelo expandido (Irmão) | Alelo expandido (Irmão) | Alelo expandido (Irmão) | Alelo expandido (Irmão) | Alelo expandido (Irmão) | Diferença |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|
| Figura 4.7 | Paterna | 46 | 46 | | | | | 0 |
| Figura 4.10 | Paterna | 45 | 43 | 45 | | | | 0 ou 2 |
| Figura 4.11 | Paterna | 46 | 46 | 44 | | | | 0 ou 2 |
| Figura 4.12 | Paterna | 62 | 44 | | | | | 18 |
| Figura 4.14 | Paterna | 45 | 45 | 44 | 43 | | | 0, 1 ou 2 |
| Figura 4.15 | Materna | 54 | 49 | | | | | 5 |
| Figura 4.16 | Materna | 40 | 43 | 43 | | | | 0 ou 3 |
| Figura 4.16 | Materna | 44 | 44 | 41 | | | | 0 ou 3 |
| Figura 4.16 | Materna | 44 | 44 | | | | | 0 |
| Figura 4.17 | Paterna | 41 | 41 | | | | | 0 |
| Figura 4.17 | Paterna | 42 | 43 | 43 | 42 | 42 | 42 | 0 ou 1 |
| Figura 4.19 | Não sabe | 43 | 44 | 43 | | | | 0 ou 1 |
| Figura 4.20 | Paterna | 56 | 44 | | | | | 12 |
| Figura 4.24 | Materna | 41 | 41 | | | | | 0 |

Não foi possível realizar análise intergeracional dos alelos do gene *TBP*, já que nos casos apresentados para a análise não foi possível determinar de forma segura a origem do alelo (materna ou paterna) (tabela 4.9).

Tabela 4.9: Análise intergeracional dos alelos *TBP*

| Heredograma | Pai | | Mãe | | Filho 1 | | Filho 2 | | Filho 3 | | Filho 4 | | Filho 5 | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) | Alelo 1 (Menor) | Alelo 2 (Maior) |
| Figura 4.8 | | | 30 | 35 | 29 | 30 | 29 | 30 | | | | | | |
| Figura 4.10 | | | 32 | 34 | 33 | 33 | | | | | | | | |
| Figura 4.13 | 34 | 35 | 33 | 34 | 33 | 35 | | | | | | | | |
| Figura 4.14 | | | 36 | 37 | 34 | 36 | | | | | | | | |
| Figura 4.14 | 33 | 36 | | | 33 | 36 | 36 | 36 | 35 | 35 | | | | |
| Figura 4.15 | | | 33 | 34 | 34 | 35 | 33 | 33 | 34 | 35 | | | | |
| Figura 4.16 | 27 | 34 | | | 27 | 32 | 33 | 34 | 27 | 34 | | | | |
| Figura 4.16 | | | 27 | 33 | 27 | 36 | 34 | 36 | 34 | 35 | 27 | 36 | 27 | 36 |
| Figura 4.17 | 36 | 36 | | | 35 | 37 | 33 | 34 | | | | | | |
| Figura 4.18 | | | 30 | 36 | 30 | 36 | | | | | | | | |
| Figura 4.23 | 33 | 36 | | | 33 | 35 | | | | | | | | |
| Figura 4.24 | 36 | 36 | | | 34 | 36 | | | | | | | | |

A análise intrageracional dos alelos *TBP* mostra que na maioria dos casos o máximo de diferença entre os alelos *TBP* entre irmãos foi de 2 unidades de repetições CAG/CAA, mas a maior diferença encontrada foi de 7 repetições (tabela 4.10).

5 DISCUSSÃO

5.1 Investigação do número de repetições dos alelos *HTT* e sua influência na idade de início da DH

Os resultados envolvendo o número de repetições CAG do gene *HTT* de uma mesma população podem apresentar diferenças, o que pode ser explicado principalmente pelas diferentes técnicas utilizadas em cada laboratório. Uma possibilidade que pode explicar a variação na determinação do número de repetições CAG por análise de fragmentos é o uso de diferentes matrizes eletroforéticas (WILLIAMS et al., 1999). Um estudo publicado por QUARREL et al. (2012) mostrou que das 1326 amostras analisadas, houve discrepância no número de repetições CAG em 51% dos casos.

Não existe um consenso mundial da variação aceita na determinação do número de repetições CAG do *HTT*. *The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)* aceita variações de ± 1 para alelos com até 42 CAG e para os alelos maiores que 42 variações de ± 3 são aceitas (LOSEKOOT et al., 2013). Já o *American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines* aceita variações de ± 2 CAG para alelos com menos de 50 CAG, ± 3 CAG para alelos com repetições de 50 até 75 e ± 4 CAG para alelos com mais de 75 repetições CAG (BEAN E BAYRAK-TOYDEMIR, 2014).

Neste estudo, em indivíduos molecularmente negativos para DH, o número de repetições CAG do gene *HTT* variou de 12 a 30 repetições com uma média de 19 ± 4 repetições e mediana de 17. O alelo de maior frequência entre os normais foi aquele que apresentava 17 repetições CAG.

Raskin et al. (2000), em uma amostra da população brasileira, encontraram para indivíduos normais brasileiros de origem caucasiana uma variação de 7 a 33 CAG e uma média de 17,7. Já para indivíduos brasileiros normais de origem africana foi encontrada uma variação de 13 a 30 CAG e uma média de 17,9. Os alelos mais frequentes possuíam 17 (37% dos alelos normais) e 15 (28,6% dos alelos normais) repetições CAG. Silva et al (2000), em um estudo com diferente amostra brasileira, mostrou que indivíduos normais apresentaram uma variação de 16 a 33 CAG.

Em relação aos indivíduos diagnosticados molecularmente como positivos nossos resultados mostram que o número de repetições CAG dos alelos não

expandidos variou de 14 a 30 repetições, com uma média de 19 ± 4 e mediana de 17. O alelo normal com maior frequência apresentou 17 repetições. As repetições CAG nos alelos expandidos variaram de 39 a 62 repetições, com uma média de 45 ± 4 e mediana de 44. O alelo expandido com maior frequência apresentaram 44 repetições CAG.

Raskinet al. (2000), encontraram em alelos normais de indivíduos brasileiros positivos para DH uma variação de 14 a 30 CAG com uma média de 18 e mediana de 17. Já em alelos expandidos foi encontrada uma variação de 39 a 88 repetições CAG, média de 46,7 e mediana de 45.

Silva et al. (2000) encontraram para indivíduos brasileiros com DH uma variação de 18 a 26 repetições e uma média de 22 CAG para os alelos normais e uma variação de 43 a 73 repetições e média de 50,6 CAG para os alelos expandidos.

Castilhos et al. (2013) descreveram que em indivíduos brasileiros com DH os alelos expandidos variavam de 40 a 81, com mediana de 44.

Nesta dissertação, cinco indivíduos não souberam relatar se a sua doença era herdada de sua mãe ou pai. Algumas explicações são possíveis nesses casos: 1) o indivíduo pode não ter convivido com seu progenitor afetado por algum problema familiar e não sabia da existência da doença; 2) o progenitor afetado pode ter falecido de outra causa antes da manifestação dos sintomas da DH e 3) ocorrência de mutação *de novo*.

Na DH, mutações *de novo* estão associadas com a possível transmissão de alelos intermediários expandidos à prole, geralmente, a partir do progenitor masculino (HENDRICKS et al., 2009). Não se conhece a frequência de mutações *de novo* na população brasileira, nem a frequência dos alelos intermediários. Além disso, ainda não há prevalência total estimada da doença no Brasil (WARBY et al., 2011). Entretanto, a prevalência mínima foi estimada por nós para Ervália, MG. Nessa cidade brasileira, havia 7,2 casos para 10.000 pessoas, uma prevalência maior do que a encontrada para população da Europa, EUA e Canadá (AGOSTINHO et al, 2015).

Indivíduos que apresentam sintomas motores, cognitivos ou psicológicos semelhantes aos da DH, mas são portadores de alelos normais para o *HTT*, devem submeter-se a outros testes moleculares diferenciais para verificação da possível ocorrência de doenças, como por exemplo, as denominadas *Huntington Like*. Quatro

doenças desse tipo foram descritas: *Huntington disease-like1 (HDL1)*, *Huntington disease-like2 (HDL2)*, *Huntington disease-like 3 (HDL3)* e *Huntington disease-like 4 (HDL4* ou Ataxia Espinocerebelar 17). Tais doenças possuem em comum com a DH sintomas motores como a coreia, disartria e bradicinesia (SCHNEIDER et al., 2007). Outras doenças que não recebem a denominação de *HDL* apresentam também sintomas semelhantes à DH como por exemplo a atrofia dentatorubropalido-lusiana (DRPLA), coreia acantocitose e outras ataxias (GOVERT E SCHNEIDER, 2013).

Este estudo mostra que o número de repetições CAG do alelo expandido influencia na idade de início da DH em 66% ($p < 0,05$). Tal resultado já era esperado, pois já se sabe por mais de duas décadas que o determinante mais crítico da idade de início da DH é o número de repetições CAG no gene *HTT*. O número de repetições trinucleotídicas CAG explica aproximadamente 70% da idade de início da doença, e os outros 30% são atribuídos a genes modificadores ou a fatores ambientais (RUBINSZTEIN et al., 1993; RUBINSZTEIN et al., 1997; DJOUSSÉ et al., 2003; WEXLER et al., 2004; AGOSTINHO et al., 2012).

5.2 Investigação do número de repetições dos alelos *TBP* e sua influência na idade de início da DH

Embora o número de repetições CAG seja o principal determinante da idade de início da DH, outros fatores atuam conjuntamente. Esses fatores podem ser estocásticos, ambientais ou genéticos. Apesar de todos os três poderem estar envolvidos em algum grau na modulação da idade de início dos sintomas, os fatores genéticos podem ser mais facilmente estudados devido ao avanço das técnicas moleculares (GUSELLA et al., 2009).

Modificadores genéticos são aqueles capazes de alterar processos fisiológicos de uma forma que atrase ou acelere a progressão da doença (GUSELLA et al., 2014). Existem duas principais razões na busca por modificadores genéticos para DH. A primeira é fornecer alvos, validados em humanos, para intervenções terapêuticas. A segunda razão é permitir um melhor ensaio clínico na testagem de uma droga terapêutica candidata, já que através do conhecimento de modificadores genéticos pode ser selecionada uma população mais homogênea para o estudo (GUSELLA et al., 2014). Além disso, o conhecimento de modificadores genéticos e a

forma como eles atuam auxiliariam no melhor entendimento da doença e consequente aconselhamento genético ao paciente.

Vale ressaltar que a investigação do gene *TBP* possibilita o diagnóstico diferencial da DH, já que permite também o diagnóstico da HDL4 (SCA 17), uma doença mais rara que a DH, com uma prevalência estimada de 0,16/100.00 indivíduos na Inglaterra (CRAIG et al., 2005) e 0,47/1.000.000 indivíduos no Japão (MARUYAMA et al., 2002). O diagnóstico molecular positivo para SCA17 é confirmado caso sejam encontradas >42 repetições CAG/CAA no gene *TBP* (NAKAMURA et al., 2001).

Nosso estudo realizou a investigação do número de repetições CAG/CAA do gene *TBP* e sua influência na idade de início dos sintomas motores em 64 pacientes molecularmente positivos para DH que relataram a idade de início dos sintomas. Até o momento, não é de nosso conhecimento a existência de artigo científico publicado sobre as repetições CAG/CAA do gene *TBP*, candidato a modificador da idade de início da DH, em indivíduos brasileiros afetados por DH, como foi realizado neste estudo. Portanto, este estudo piloto é original e pioneiro no Brasil. Um gene pode ser modificador de uma doença se alterações na sua estrutura, ou em sua expressão, alteram a manifestação de fenótipos associados com a mutação primária que causa a doença. Uma das principais estratégias utilizadas para pesquisar genes modificadores tem sido a investigação de genes ligados às vias metabólicas ou processos moleculares supostamente envolvidos na DH (GUSELLA et al., 2009).

Um dos exemplos dessa estratégia é a investigação do gene *GRIK2*, responsável por codificar uma das subunidades do receptor de glutamato. Os receptores de glutamato parecem estar envolvidos na patogênese da doença e alterações no gene *GRIK2* podem influenciar em 13% a idade de início não explicada pelo número de repetições CAG do gene *HTT* (RUBINSZTEIN et al., 1997).

Mais tarde, um estudo revelou que a região polimórfica TAA localizada em 3'UTR de *GRIK2* apresentando 16 repetições estaria relacionada com a antecipação da idade de início da DH em cinco anos antes do que aqueles que possuíam um número diferente de repetições TAA (MACDONALD et al., 1999).

Outro exemplo, seguindo a mesma estratégia foi a investigação do gene *BNDF*, já que este fator neurotrófico derivado do cérebro já havia sido sugerido

como fazendo parte do processo de patogênese da doença. Mas não foi encontrada associação entre alterações desse gene e a idade de início (Di MARIA et al., 2006).

A proteína TBP já foi sugerida como fazendo parte do processo de patogênese da DH, pois a forma normal da TBP já foi encontrada juntamente com a Huntingtinamutada em maiores níveis no cérebro de pacientes com DH do que no grupo controle (VAN ROON-MOM et al., 2002).

Montcelet al. (2014) propuseram que o número normal de repetições de glutamina, codificadas por genes diferentes do causador primário da doença poliglutamínicas, pode influenciar na idade de início dessas doenças neurodegenerativas com PoliQ.

No presente estudo investigou-se justamente se o número normal de repetições CAG/CAA do gene *TBP* influenciava na idade de início dos sintomas motores da DH.

Em relação ao número de repetições dos alelos *TBP*, observamos que indivíduos normais possuíam de 27 a 37 repetições CAG/CAA, com um valor médio de 33 ± 2 repetições e mediana de 34. A maior frequência foi dos alelos com 34 repetições. Além disso, 84% dos normais eram heterozigotos.

Já os alelos *TBP* de indivíduos molecularmente positivos para DH possuíam de 23 a 38 repetições, valor médio de 34 ± 2 repetições e mediana de 34. O alelo mais frequente possuía 36 repetições CAG/CAA. E 81% dos indivíduos positivos molecularmente para DH eram heterozigotos.

Tomiuket al. (2007) descreveram uma taxa de heterozigose para os alelos *TBP* de 78,5%. Um dos primeiros estudos a investigar a frequência alélica das repetições CAG/CAA do gene *TBP*, verificou que argelinos possuíam uma variação entre 32-39 repetições, com uma maior frequência do alelo com 38 repetições. Sul-africanos negros e africanos subsaarianos possuíam variação entre 33-39 repetições, com maior frequência de 35 repetições. Indianos possuíam repetições CAG/CAA entre 27-39, com maior frequência de 18 repetições (RUBINSZTEIN et al., 1996).

Uma investigação do número de repetições do gene *TBP* em diferentes doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, diferentes ataxias e Esquizofrenia) revelou que no grupo de pacientes as repetições variaram entre 27-46, média de 36 ± 2 e mediana de 36. No grupo controle, as repetições variaram entre 30-43, média de 37 ± 1 e mediana de 36 (WU et al., 2005).

Nossa análise de correlação entre idade de início e repetições CAG/CAA do gene *TBP*, regressão múltipla e genótipos associados revelaram que tais repetições do *TBP* não influenciaram na idade de início da DH. Embora o aumento do n amostral possa contribuir para o definitivo esclarecimento dessa questão.

Segundo Brahimet al. (2014), 0,78% da variação da idade de início da DH em pacientes tunisianos pode ser explicada pelas repetições do gene *TBP*. Não encontramos influência das repetições do gene *TBP*. Talvez isso possa ser explicado pelo fato de que se trata de populações diferentes, que vivem em ambientes diferentes e estão expostas a diferentes mecanismos de seleção.

O número normal de repetições do *TBP* já foi descrito como modulador da idade de início da ataxia espinocerebelar7, de forma que o maior número de repetições ocasiona um decréscimo na idade de início da SCA7 (MONTCEL et al., 2014), uma ataxia causada por repetição de glutamina diferente da causada pelo gene *TBP*.

Genótipos *TBP* com mais de 35 repetições CAG/CAA foram associados com risco de esquizofrenia, idade de início da doença e função pré-frontal do córtex na população japonesa (OHI et al., 2009).

Realizamos comparação, quanto à idade de início da DH, entre indivíduos com pelo menos um alelo >35 e aqueles que possuíam somente alelos ≥ 35 e nossos resultados mostraram que não houve qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) nas respectivas idades de início motor da doença, talvez por se tratar de doenças de origem diferentes. .

5.3 Análises inter e intrageracionais das repetições dos alelos *HTT* e *TBP*

Em relação às análises intergeracionais do alelo *HTT* expandido, observamos que a maioria dos casos de contração das expansões CAG ocorreu quando a transmissão foi materna, enquanto os casos de maiores expansões (+8 e +12) entre gerações ocorreram quando a transmissão do alelo expandido foi de origem paterna.

Além disso, a comparação dos alelos expandidos *HTT* intrageracionalmente, (entre irmãos) mostrou que na maioria dos casos o número de repetições apresentava uma variação de no máximo 3 unidades CAG. Apenas em três casos

da análise intrageracional essa diferença foi maior (5, 12 e 18 CAG), sendo que nesses últimos as maiores diferenças entre irmãos (12 e 18 CAG) se deu quando a transmissão do alelo expandido foi paterna.

A instabilidade das repetições CAG durante a meiose pode ocorrer tanto na transmissão materna quanto na paterna. Apesar disso, na transmissão paterna da repetição CAG expandida, existe uma maior propensão para aumento adição dessas repetições. Na transmissão materna o número de repetições geralmente é mantido, podendo haver contração de 1-5 unidade de repetição (NANCE e MYERS, 2001).

A tendência de expansão paterna muitas vezes é atribuída ao maior número de divisões mitóticas na gametogênese masculina, porém, outros estágios da espermatogênese, como estágios específicos que possuem alterações dos níveis e atividade de várias proteínas de reparo, também podem contribuir para essa expansão (PEARSON et al., 2005).

Em relação à análise intergeracional, dos alelos TBP não foi possível saber o número de contrações ou expansões ocorridas de pai/mãe para filho(s). Já que todos os investigados possuíam repetições normais do alelo TBP (≤ 42 CAG/CAA) e, com exceção de um caso, todos os demais só possuíam a análise molecular de um dos progenitores. Não havendo assim o trio (pai, mãe e filho) para possibilitar a investigação da origem de cada alelo.

Além disso, no único trio completo, pai, mãe e filho possuíam número de repetições muito próximos que poderiam ter sofrido contração ou expansão, não sendo dessa forma possível se precisar a origem materna ou paterna dos alelos herdados pelo filho em questão.

Apesar disso, podemos observar que, aparentemente (já que não podemos afirmar a origem), o número de repetições do *TBP* entre pai/mãe e filho não varia muito quando comparados às repetições do *HTT*, o que pode implicar uma maior estabilidade das repetições dos alelos *TBP*.

A análise intrageracional do número de repetições CAG/CAA do *TBP* (tabela 4.10) mostrou que na maioria dos casos a diferença entre os alelos *TBP* entre irmãos foi de no máximo 2 unidades de repetições CAG/CAA. A maior diferença encontrada foi de 7 unidades de repetições CAG/CAA. Números menores do que aqueles encontrados para análise intrageracional do número de repetições CAG do *HTT*.

O gene TBP codifica a proteína de ligação à região TATA Box (TATA Box Binding Protein), um fator transcricional necessário para início da transcrição pelas RNA polimerase I, II e III (REID et al., 2009). Portanto, o gene TBP é de grande importância para o início correto da transcrição. Dessa forma não seria interessante, ao longo da evolução, que o número de expansões CAG desse gene fosse muito grande, pois resultaria em uma maior instabilidade na hora da replicação e consequentemente teria uma maior taxa de mutação (TOMIUK et al., 2007). De modo a evitar a instabilidade, podemos observar que o gene TBP apresenta entre repetições CAG interrupções compostas por repetições CAA, que também codificam para glutamina. Essas repetições CAA estabilizam a região de microssatélite, que foi selecionada positivamente, e têm sido mantidas por pelo menos 6 milhões de anos em diversos organismos (TOMIUK et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

A idade de início da DH foi influenciada em 66% pelo número de repetições CAG do gene *HTT*.

Este estudo mostrou que, para nossa amostra (n=64 afetados por DH com idade de início da DH relatada), o número de repetições CAG/CAA do gene *TBP* não influenciou na idade de início dos sintomas.

A região de repetições de CAG/CAA do gene *TBP* apresentou aparentemente maior estabilidade genética intergeracionalmente quando comparadas com as repetições CAG do gene *HTT*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIN, R.L.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neuroscience**, v.12, p.366-75, 1989.

ANDRESEN, J.M. et al. The Relationship Between CAG Repeat Length and Age of Onset Differs for Huntington's Disease Patients with Juvenile Onset or Adult Onset. **Annals of Human Genetics**, v.71, p.295-301, 2006

ANDREW et al. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. **Human molecular genetics**, v.3, p.65-67.1994.

AGOSTINHO et al. Haplotype analysis of the CAG and CCG repeats in 21 Brazilian families with Huntington's disease. **Journal of Human Genetics**, v.57, p.796-803, 2012.

AGOSTINHO et al. A study of a geographical cluster of Huntington's disease in a Brazilian town of Zona da Mata, Minas Gerais State. **European Neurology**, v.74, p.62-68, 2015.

BATES, G. P. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. **Nature Review Genetics**, v. 6, n. 10, p. 766-73, 2005.

BEAN, L.; BAYRAK-TOYDEMIR, P. American College of Medical Genetics and Genomics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2014 edition: technical standards and guidelines for Huntington disease. **Genetics in Medicine**, v. 16, 7p, 2014.

BRAHIM, D.H et al. Modulation at Age of Onset in Tunisian Huntington Disease Patients: Implication of New Modifier Genes. **Genetics Research International**, 5p, 2014.

CASTILHOS et al. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. **Clinical Genetics**, v.86, p.373-77, 2013.

CATTANEO, E., ZUCCATO, C., TARTARI, M. Normal Huntingtin function: an alternative approach to Huntington's Disease. **Nature Reviews: Neuroscience**, v.6. p.919-930, 2005.

CRAIG, K. et al. Minimum prevalence of spinocerebellar ataxia 17 in the north east of England. **Journal of the Neurological Science**, v.239, p.105-9. 2005

CUMMINGS, C. J.; ZOGHBI, H. Y. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.1, p. 281-328, 2000.

DAVIES, S. W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell**, v.90, p.537–548, 1997.

DAYALU, P.; ALBIN, R.L. Huntington Disease: Pathogenesis and Treatment. **Neurological Clinics**, v.33, p.101-114, 2015.

DIFIGLIA, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, v.277, p.1990–1993, 1997.

DI MARIA, E. et al. Evidence of association between BDNF gene variants and age-at-onset of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v.24, p.274-279, 2006.

DJOUSSÉ et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. **American Journal of Human Genetics**, v.119A, p.279-282, 2003.

DUAN, W.; JIANG, M.; JIN, J. Metabolism in HD: Still a Relevant Mechanism? **Movement Disorders**, v.29, p. 1366-1374, 2014.

DUYAO, M.P.; AMBROSE, C.M.; MYERS, R.H.; NOVELLETTO, A.; PERSICHETTI, F.; FRONTALI, M.; et al. Trinucleotide repeat length: instability and age of onset in Huntington's disease. **Nature Genetics**, v.4, p.387–392, 1993.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 12, p. 551-8, 2000.

FAN, H. C. et al. Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 4-5, p. 441-58, 2014.

GAYÁN et al. Genomewide Linkage Scan Reveals Novel Loci Modifying Age of Onset of Huntington's Disease in the Venezuelan HD Kindreds. **Genetic Epidemiology**, v.32, p.445–453, 2008.

GEMAYEL, R. et al. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 445-77, 2010.

GOLDBERG, Y.P. et al. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. **Nature Genetics**, v.13.p.442–449, 1996.

GOVERT, F.; SCHNEIDER, S.A. Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes: an overview. **Current opinion in neurology**, v.26, p.420-427, 2013.

GUSELLA, J. F. et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, v. 306, p.234–238, 1983.

GUSELLA, J.F.; MaCDONALD, M.E. Huntington's disease: the case for genetic modifiers. **Genome Medicine**, v.1, p.80.1-80.6, 2009.

GUSELLA, J.F.; MaCDONALD, M.E.; LEE, J.M. Genetic Modifiers of Huntington's Disease. **Movement Disorders**, v.29, p.1359-1365, 2014.

HARPER, B., Huntington disease. **Journal of the royal society of medicine**, v.98, p. 550, 2005.

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 (27–35 CAG). **American Journal of medical genetics**, v.149A. p.1375-1381, 2009.

HOFFMANN, J. Über Chorea chronica progressive (Huntingtonsche Chorea, Chorea hereditaria). **VirchowsArchiv**, v. A111, p.513–548, 1888 (in German).

HUNTINGTON, G. On Chorea. **Medical and Surgical Reporter**, v. 26, p.320–321, 1872.

IMARISIO, S. et al. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. **BiochemicalJournal**, v. 412, n. 2, p. 191-209, 2008.

ISIS PHARMACEUTICAL. Disponível em: <http://ir.isispharm.com/phoenix.zhtml?c=222170&p=irol-newsArticle&ID=2069397>
Acessado em 28/07/2015 as 22:49

ISMAILOGLU, I.; CHEN, Q.; POPOWSKI, M.; YANG, L.; GROSS, S.S.; BRIVANLOU, A.H. Huntingtin protein is essential for mitochondrial metabolism, bioenergetics and structure in murine embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v.391, p.230–240, 2014.

JOEL, D.; WEINER, I. The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. **Brain Research: Brain Research Review**, v.23, p.62-78, 1997.

KIM, J. C.; MIRKIN, S. M. The balancing act of DNA repeat expansions. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 3, p. 280-8, 2013.

KOIDE, R. et al. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA binding protein gene: a new polyglutamine disease? **Human Molecular Genetics**, v.8, p.2047-2053, 1999.

KREMER, E. J. et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1711-4, 1991.

KROBITSCHA, S.; KAZANTSEVA, A.G. Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.43, p.20-24, 2011.

KUEMMERLE, S. et al. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. **Annals of Neurology**, v,46, p.842–849, 1999.

KUMAR, A. et al. Huntington's disease: An update of therapeutic strategies. **Gene**, v.556, p.91-97, 2015.

LA SPADA, A. R. et al. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 77-9, 1991.

LANDLES, B., BATES, G.P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. **European Molecular Biology Organization Reports**.v.5.p.958-963, 2004.

LEE, C.Y.D.; CANTLE, J.P., YANG, X.L. Genetic manipulations of mutant huntingtin in mice: new insights into Huntington's disease pathogenesis. **The FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Journal**, v.280, p.4382-4394, 2013.

LI, S.H.; LI, X.J. Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. **Trends in genetics**.v.20.p.146-154, 2004

LOPEZ CASTEL, A.; CLEARY, J. D.; PEARSON, C. E. Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. **Natural Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 165-70, 2010.

LOSEKOOT, M. et al. EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. **European Journal of Human Genetics**, v.21, p.480-486, 2013.

LUND, J.C. Chorea StiViti I Stersdalen. **Uddrag af Distriktsoege J C Lunds Medicinalberetning for 1860**. [Beretning om Sundhedstilstanden m.m. i Norge i 1860: 137–8. English transcription. 1959] (LUND, J.C. Chorea St Vitus Dance in Saetersdalen. Report of health and medicine and medical conditions in Norway, p.137 (quoted in translation in Orbeck AL, 1959. An Early Description of Huntington's Chorea. Medical History, 165-168, 1959).

MACDONALD, M.E. et al. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. **Neurology**, v.53, p.1330-1332, 1999

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

MARTINO, D.; STAMELOU, M.; BHATIA, K.P. The differential diagnosis of Huntington's disease-like syndromes: 'red flags' for the clinician. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.84, p.650-656, 2013.

MARUYAMA, H. et al. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. **American Journal of Medical Genetics**, v.114, p.578–83, 2002.

MIRKIN, S. M. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. **Current opinion in structural biology**, v. 16, n. 3, p. 351-8, 2006.

MOHAPEL, J.M.G. REGO, A.C. Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. **Revista de Neurociências**, 2011, in press. Disponível em <http://www.revistaneurociencias.com.br/inpress/595%20inpress.pdf>. Acessado em 14/01/14 as 10:07

MONTCEL, S.T. Modulation of the age at onset in spinocerebellarataxia by CAG tracts in various genes. **Brain**, v.37, p.2444-2455, 2014.

NANCE, M.A., MYERS, R.H., Juvenile onset Huntington's disease – clinical and research perspectives. **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, v.7, p.153–157, 2001.

NAKAMURA et al. SCA17, a novel autossomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. **Human Molecular Genetics**.v.10, p.1441-1448, 2001.

NASA - National Aeronautics and Space Administration. Crystallization of Huntingtin Exon 1 Using Microgravity (CISIS PCG HDPCG-1). Disponível em: http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1308.html Acessado em 12/07/2015 as 09h28min

NEGRETE, A., **Corea de Huntington. Estudio de una sola familia a través de varias generaciones**, Maracaibo, 1955.

NGUYEN, G.D.; GOKHAN, S.; MOLERO, A.E.; MEHLER, M.F. Selective Roles of Normal and Mutant Huntingtin in Neural Induction and Early Neurogenesis. **Plos One**, v.8, 11p, 2013.

OHI, K. et al. TATA Box-Binding Protein gene is associated with risk for schizophrenia, age at onset and prefrontal function. **Genes, Brain and Behavior**, v.8, p.473–480, 2009.

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

PETÉRSSEN, A.; MANI, K.; BRUNDIN, P. Recent Advances on the Pathogenesis of Huntington's Disease. **Experimental Neurology**, v.157, p.1-18, 1999.

POTTER, N.T.; SPECTOR, E.B.; PRIOR, T.W. Technical Standards and Guidelines for Huntington Disease Testing. **Genetics in Medicine**, v.6, p.61-65, 2004.

QUARREL, W.O. et al. Discrepancies in reporting the CAG repeat lengths for Huntington's disease. **European Journal of Human Genetics**, v.20, p.20-26, 2012.

RASKIN, S. et al. Huntington disease: Dna analysis in brazilian population. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 977-985, 2000.

RAVIKUMAR, B. et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nature Genetics**, v.36. p585–595, 2004.

REID, S.J. et al. A splice variant of the TATA-box binding protein encoding the polyglutamine-containing N-terminal domain that accumulates in Alzheimer's disease. **Brain Research**,v.1268, p.190-9, 2009.

REINER, A.; DRAGATIS, I.; ZEITLIN, S.; GOLDOWITZ, D. Wild-Type Huntingtin Plays a Role in Brain Development and Neuronal Survival. **Molecular Biology**, v.18, p.259-275, 2003.

RICHARDS, R. I.; SUTHERLAND, G. R. Heritable unstable DNA sequences.**Nature Genetics**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 1992.

ROOS, R.A.C., Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v.5, 2010.

ROSENBLATT, A., Neuropsychiatry of Huntington's disease. **Dialogues in Clinical Neurosciences**, v. 9, p.191–197, 2007.

RUBINSZSTEIN, D.C et al. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. **Human Molecular Genetics**, v.2, p.1713-1715, 1993.

RUBINSZTEIN, D.C et al. Analysis of polyglutamine-coding repeats in the TATA-binding protein in different human populations and in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder.**American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)**, v.67, p.495-498, 1996.

RUBINSZTEIN, D.C. et al. Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.3872–3876, 1997.

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**, v.3, p.517-25. 2007.

SILVA, T.C.L et al. Molecular diagnosis of Huntington disease in brazilian patients. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.58, p.11-17, 2000.

SOUTHWELL, A.L. et al. In vivo evaluation of candidate allele-specific mutant huntingtin gene silencing antisense oligonucleotides. **Molecular Therapy**, v.22, p.2093-2106, 2014.

TELENIUS, H. et al. Molecular analysis of juvenile Huntington's disease: the major influence on(CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. **Human MolecularGenetics**, v. 2, p.1535–1540, 1993.

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**, v. 72, n. 6, p. 971-83, 1993.

TOMIUK, J. et al. Repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 17 alleles of the TATA-box binding protein gene: an evolutionary approach. **European Journal of Human Genetics**, v.15, p.81-87, 2007.

VAN EYK, C. L.; RICHARDS, R. I. Dynamic mutations: where are they now? **Advances in experimental medicine and biology**, v. 769, p. 55-77, 2012.

VAN ROON-MOM, W.M.C. et al. Insoluble TATA-binding protein accumulation in Huntington's disease cortex. **Molecular Brain Research**, v.109, p.1-10, 2002

VENTRUTI, A.; CUERVO, A.M. Autophagy and neurodegeneration. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.7, p.443– 451, 2007.

VONSATTEL, J.P. et al. Neuropathological classification of Huntington's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.44, p.559-77, 1985.

VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.57, p.369-84, 1998.

WALKER, F. O. Huntington's Disease. **Seminars in Neurology**, v. 27, n. 2, p. 143-50, 2007.

WARBY, S.C. et al. CAG Expansion in the Huntington Disease Gene Is Associated with a Specific and Targetable Predisposing Haplogroup. **The American Journal of Human Genetics**, v.84, p.351–366, 2009.

WARBY, S. C. et al. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. **European Journal of Human Genetics**, v.19, n. 5, p. 561-6, 2011.

WATER, C. O. **In Practice of Medicine**, vol. 2 (R. Dunglison, ed.), pp. 312, 1842.

WEXLER, A. Mapping Fate: A Memoir of Family, Risk, and Genetic Research, **Times Books**, New York, 1995.

WEXLER, N.S. et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.101, p.3498-3503, 2004.

WILLIAMS, L.C. et al. Comparative semi-automated analysis of (CAG) repeats in the Huntington disease gene: use of internal standards. **Molecular and Cell Probes**, v.13, p.283-289, 1999.

WU, Y.R. et al. Analysis of polyglutamine-coding repeats in the TATA-bindingprotein in different neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission**, v.112, p.539-546, 2005.

YANG W. et al. Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. **Human Molecular Genetics**, v.11. p.2905–2917, 2002.

YOUNG, A.B. Huntingtin in health and disease.**The Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.299-302, 2003.

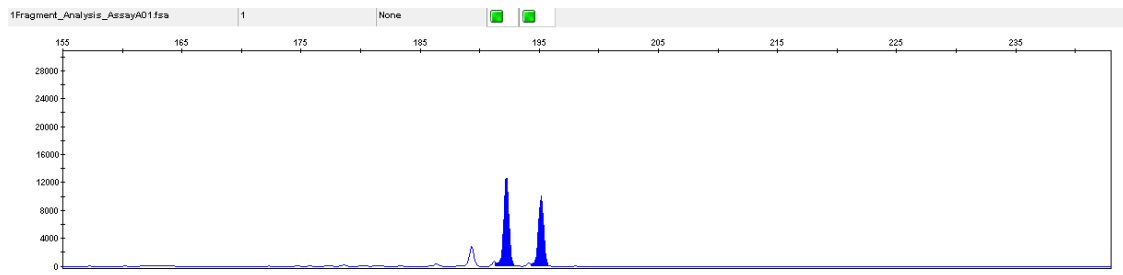
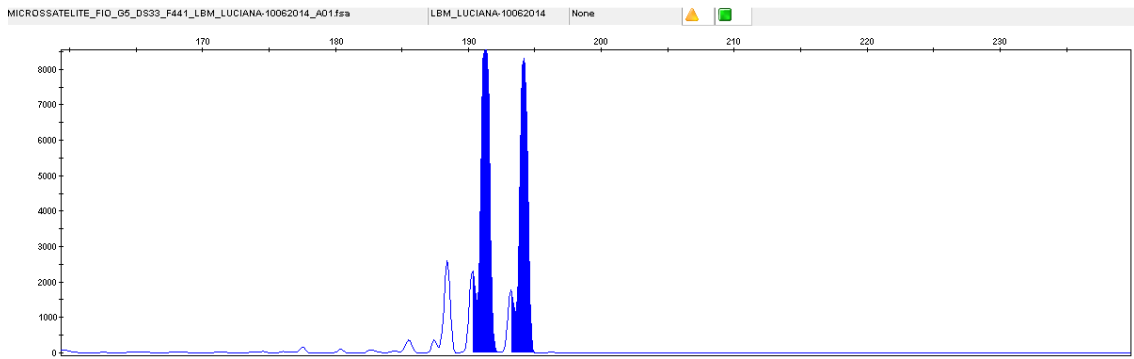
ZUCCATO, C. et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. **Science**, v.293.p.493-498. 2001

ZUCATTO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. **PhysiologicalReviews**, v.90, p. 905-981, 2010.

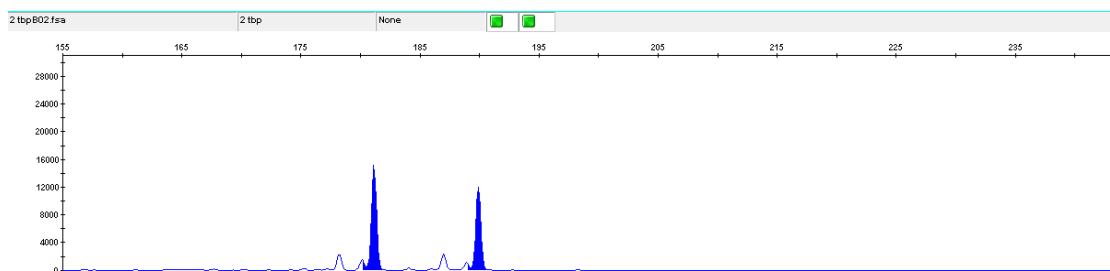
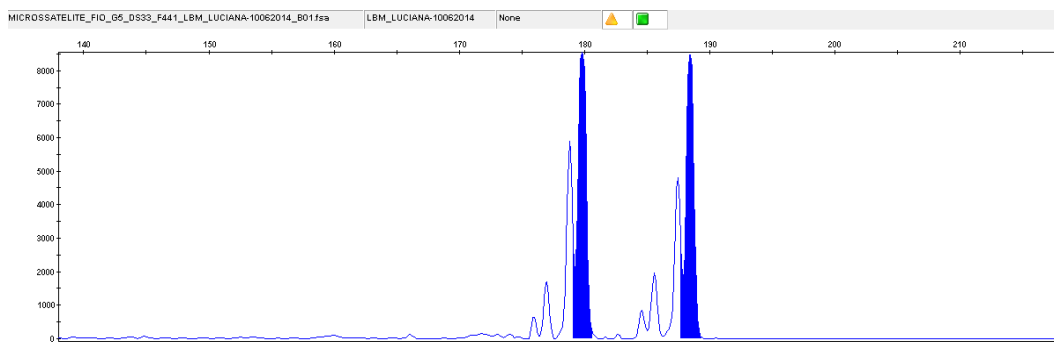
APÊNDICE A - Resultados da análise de fragmentos *TBP* por eletroforese capilar (eletroferogramas) de cada indivíduo

Legenda: Picos pretos cheios: alvos do estudo. Picos pretos vazios: stutters

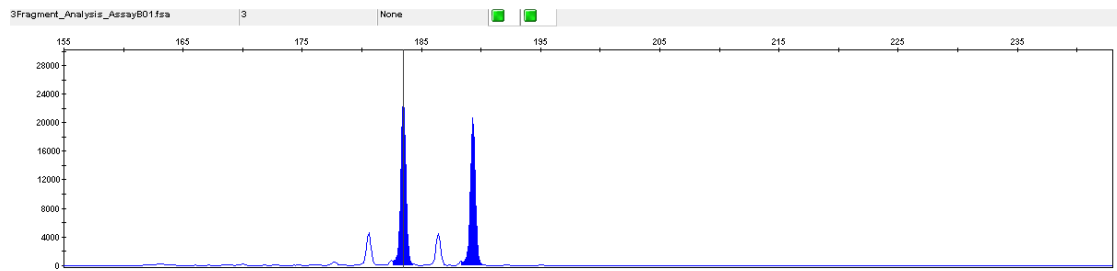
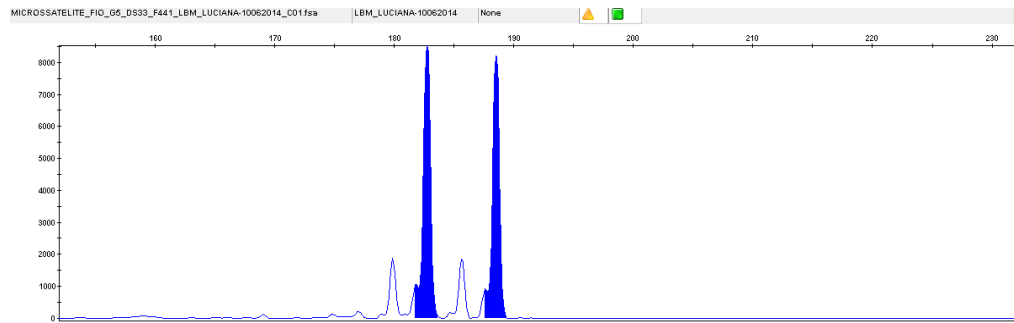
Indivíduo1



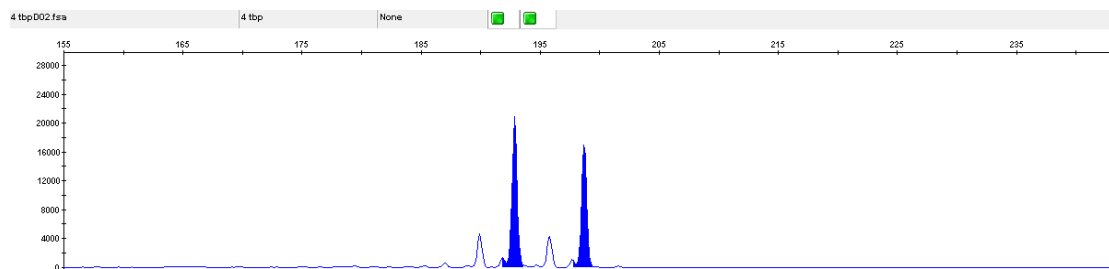
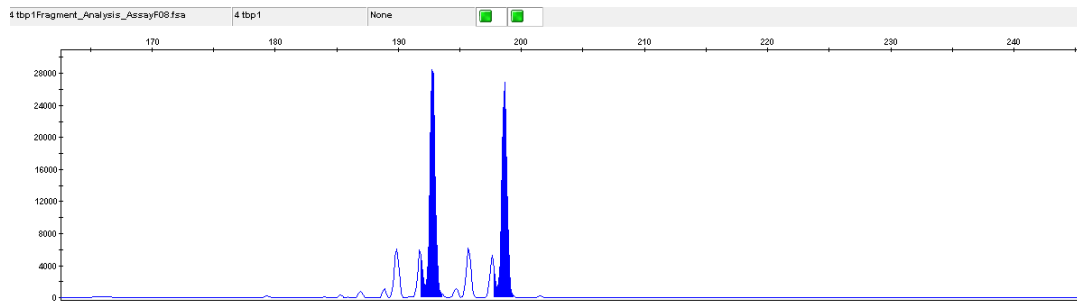
Indivíduo2



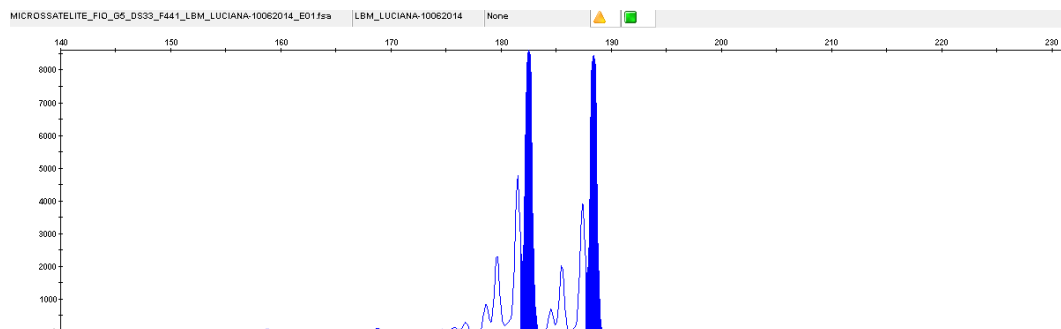
Indivíduo3

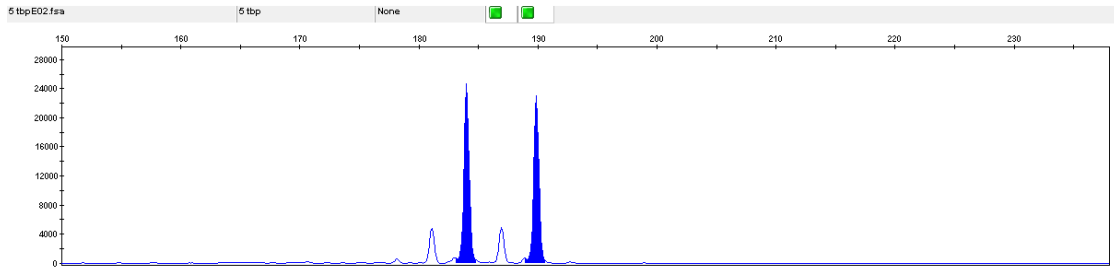


Indivíduo4

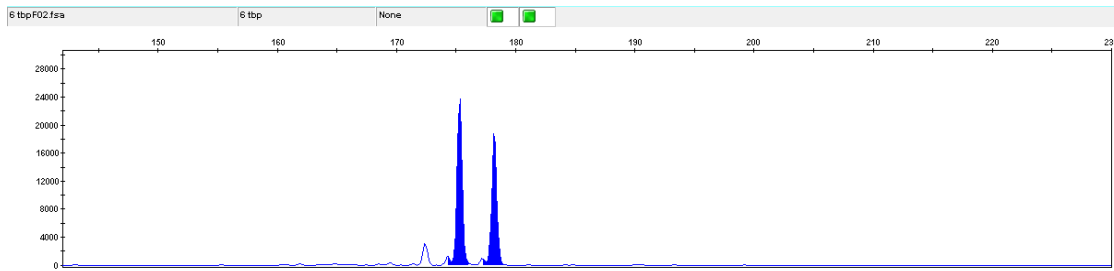
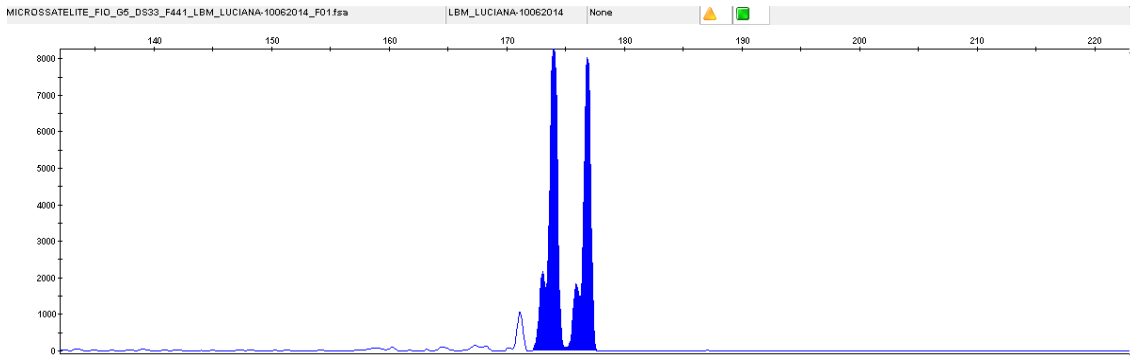


Indivíduo5

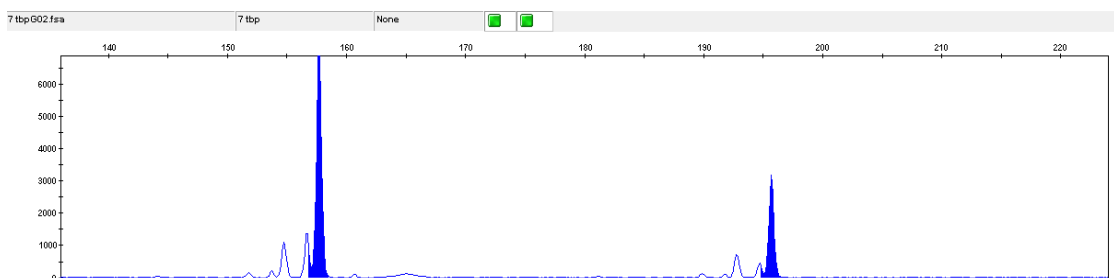
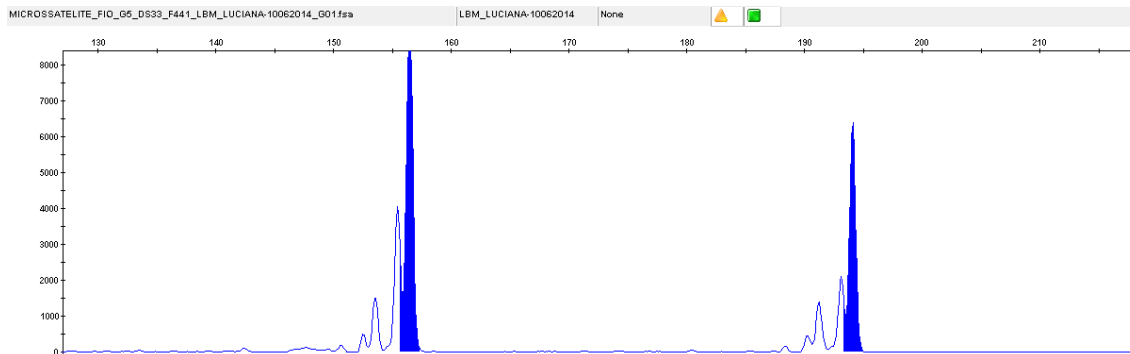




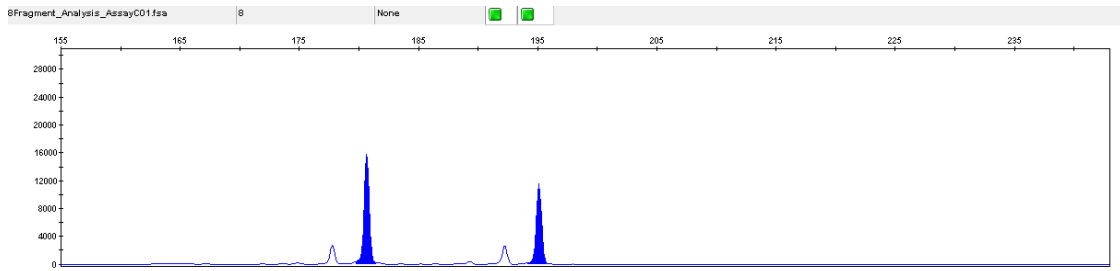
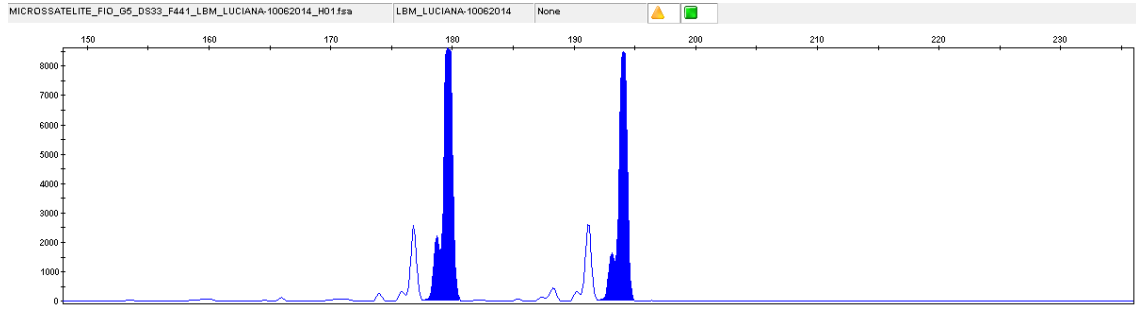
Indivíduo6



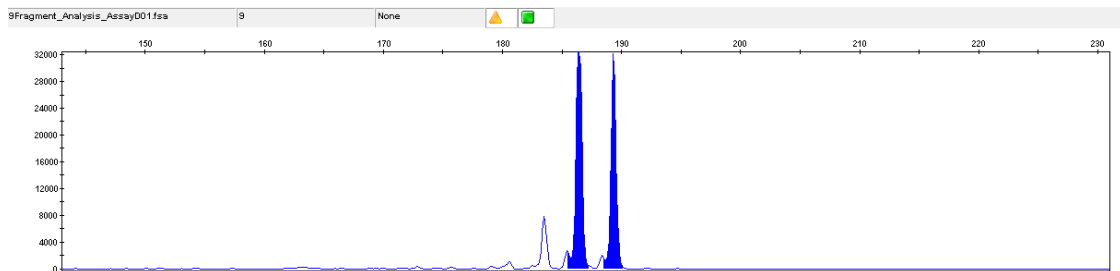
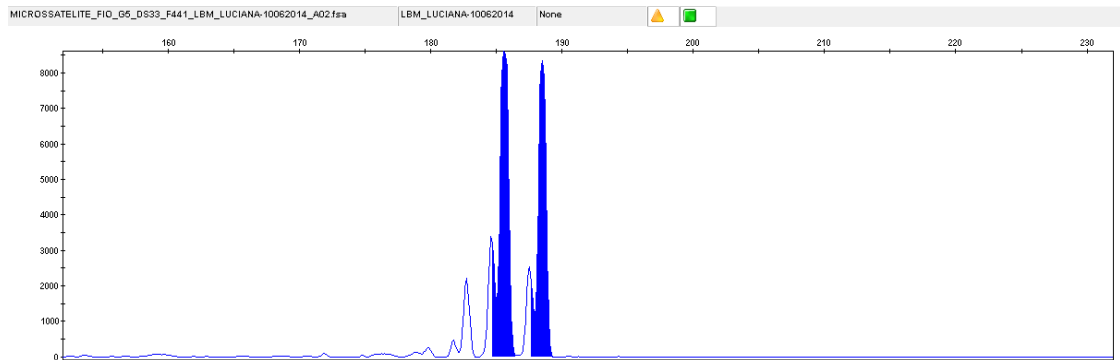
Indivíduo7



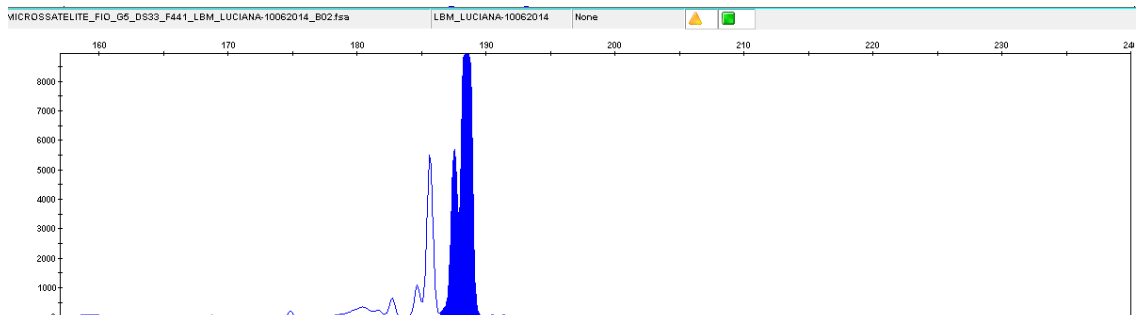
Indivíduo8

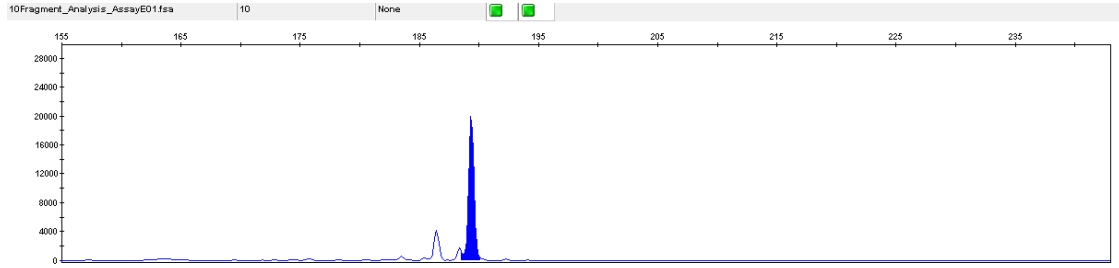


Indivíduo9

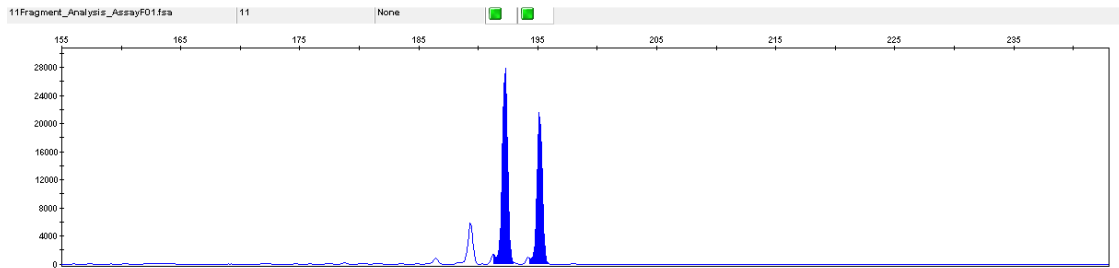
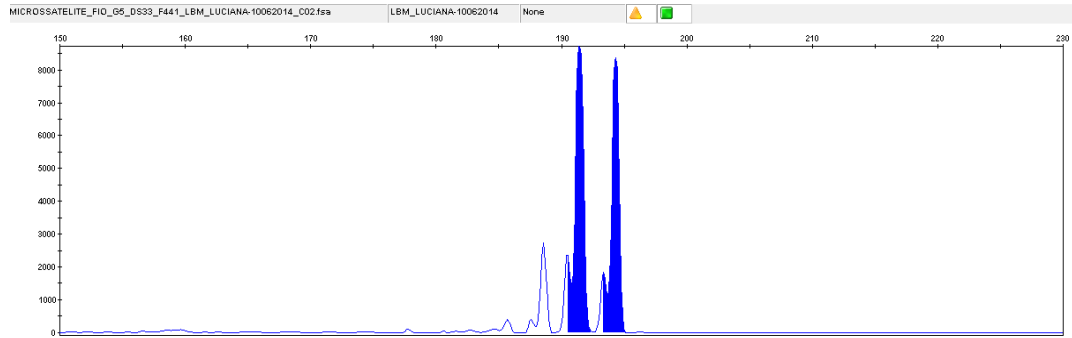


Indivíduo 10

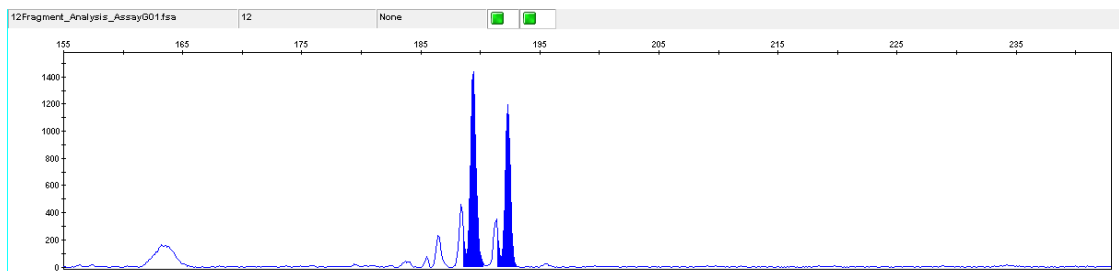
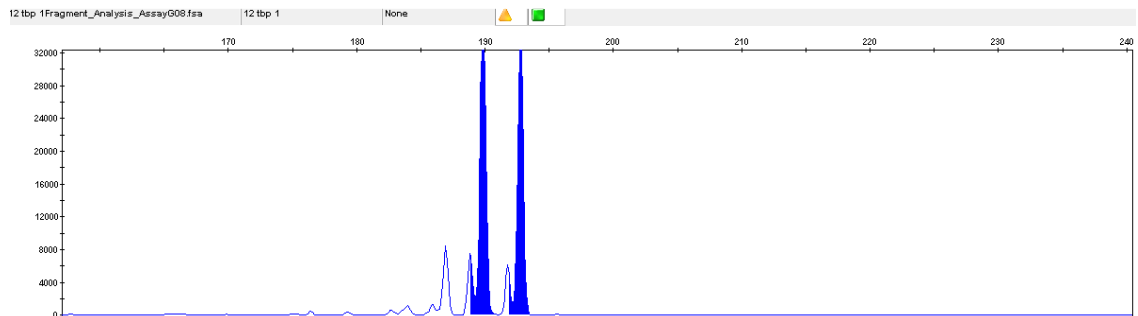




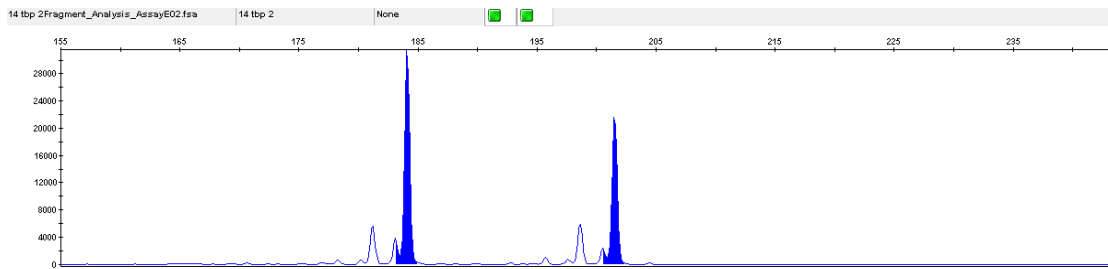
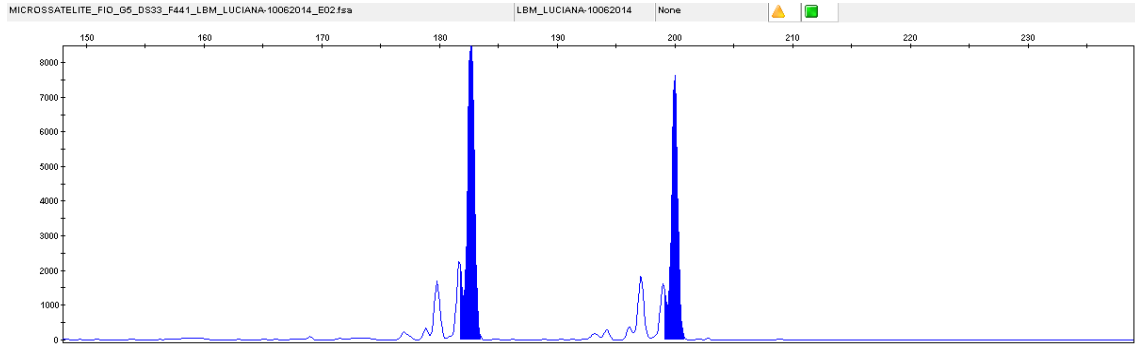
Indivíduo 11



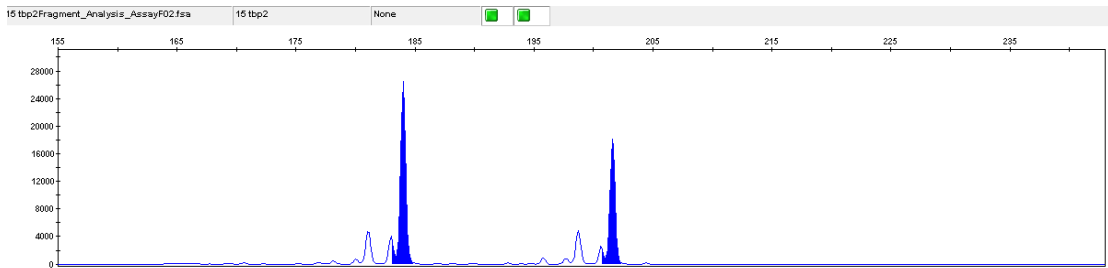
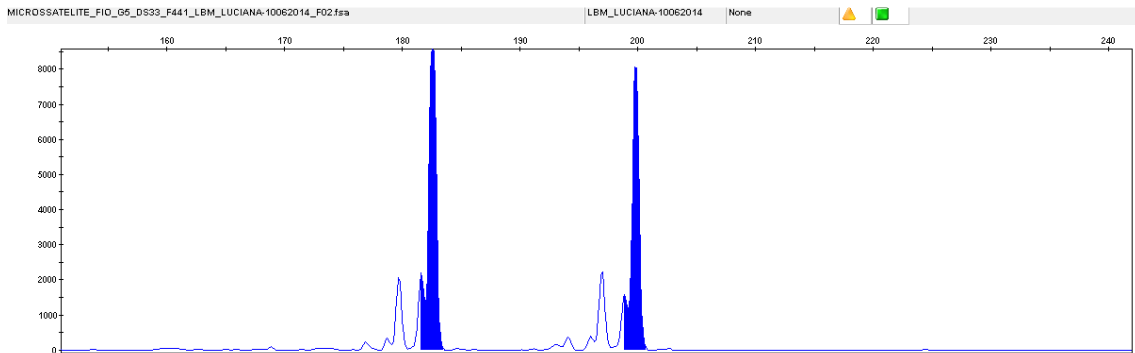
Indivíduo 12



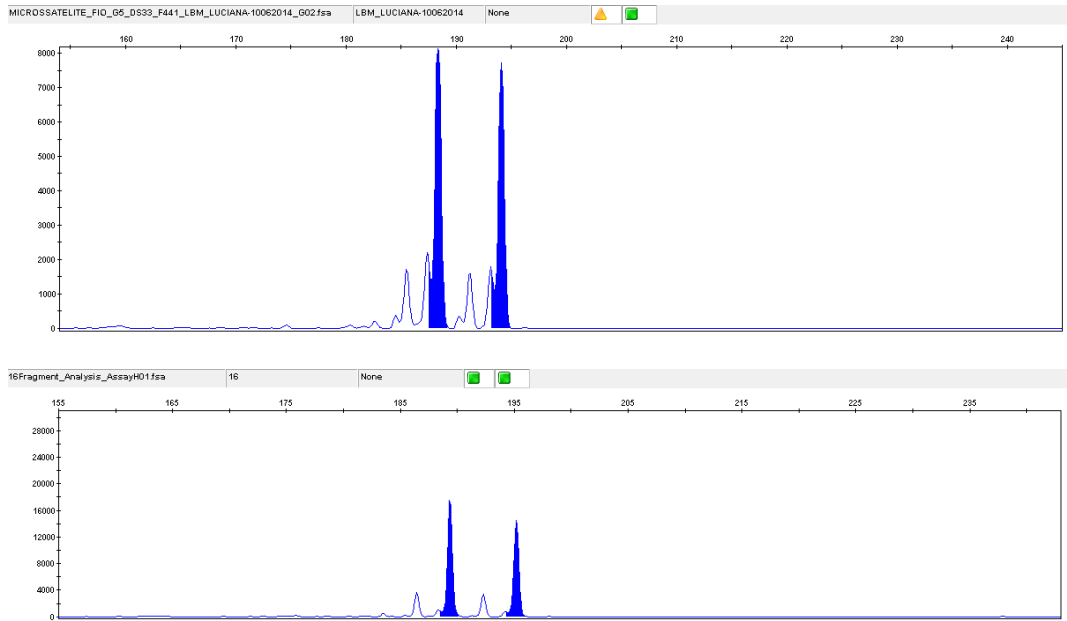
Indivíduo 14



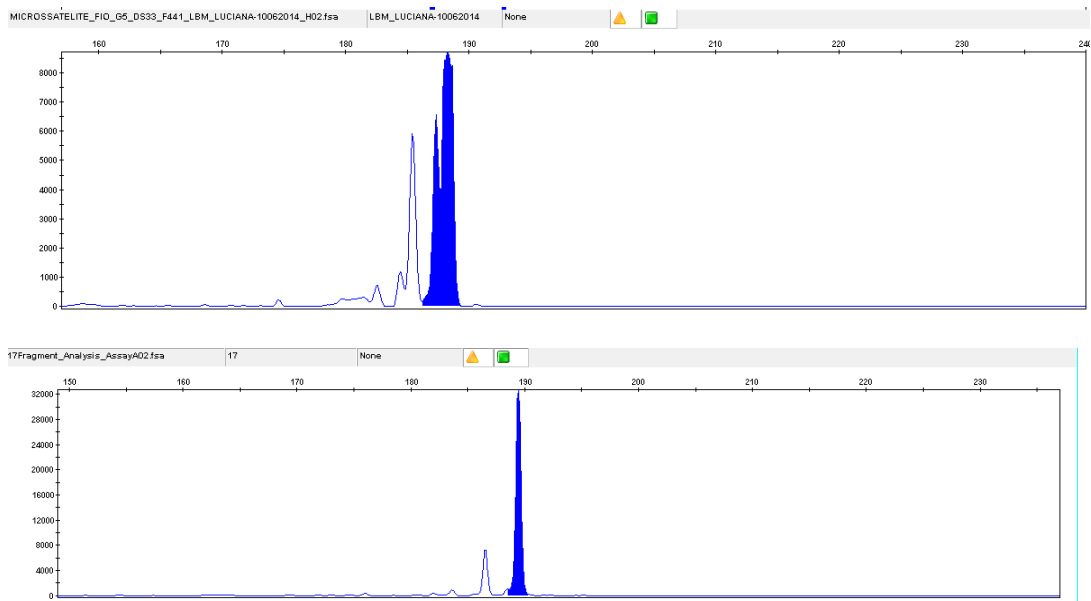
Indivíduo 15



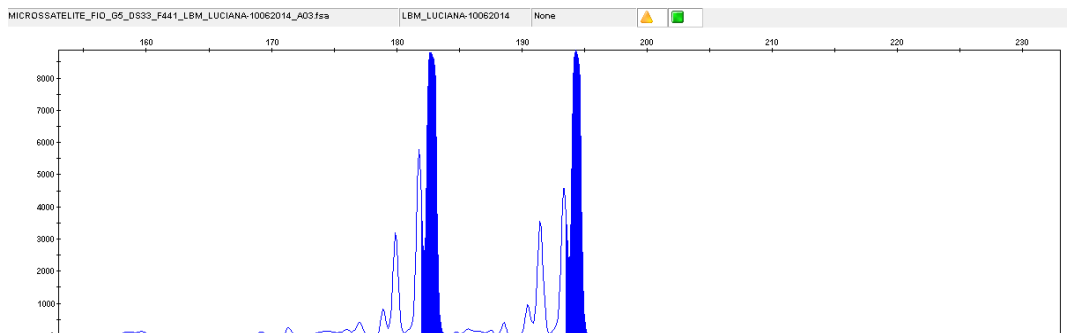
Indivíduo 16

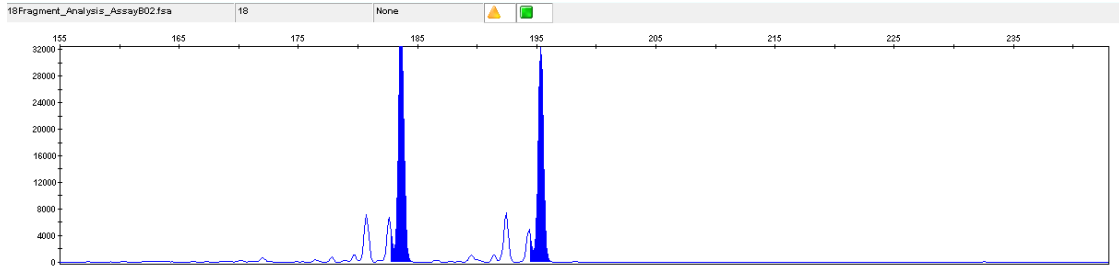


Indivíduo 17

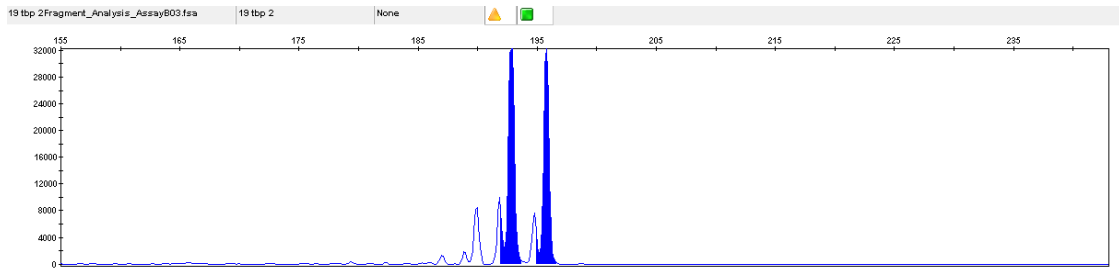
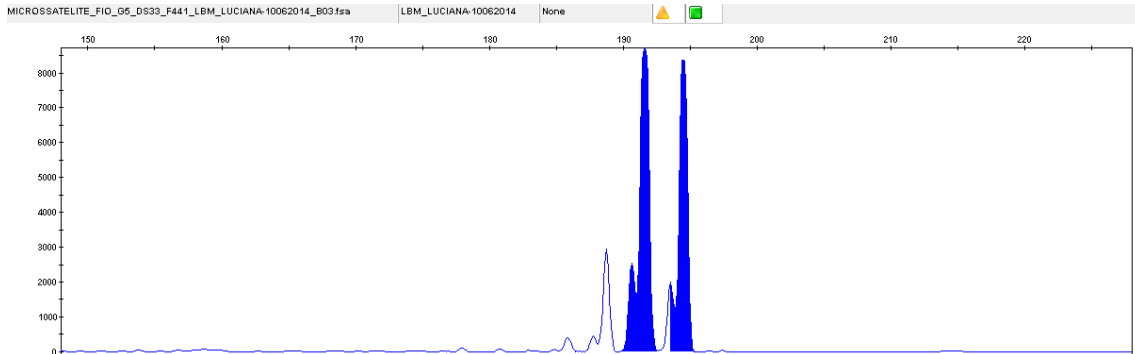


Indivíduo 18

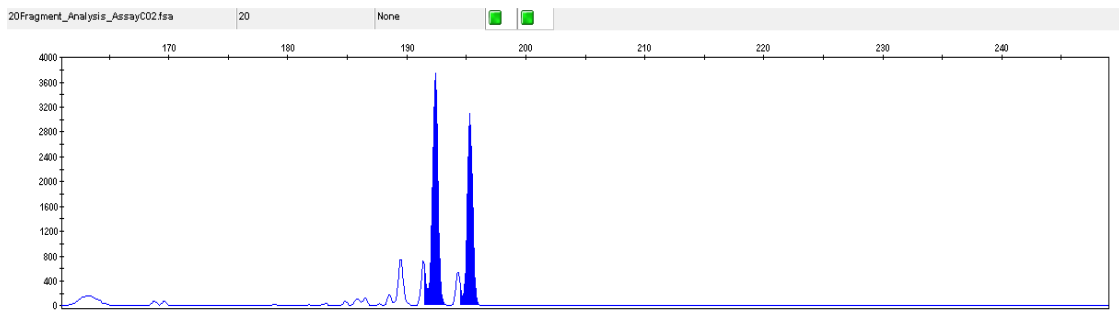
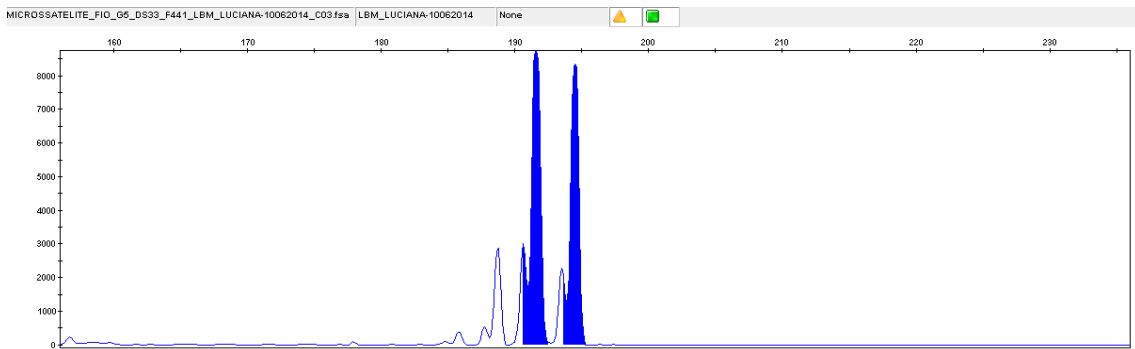




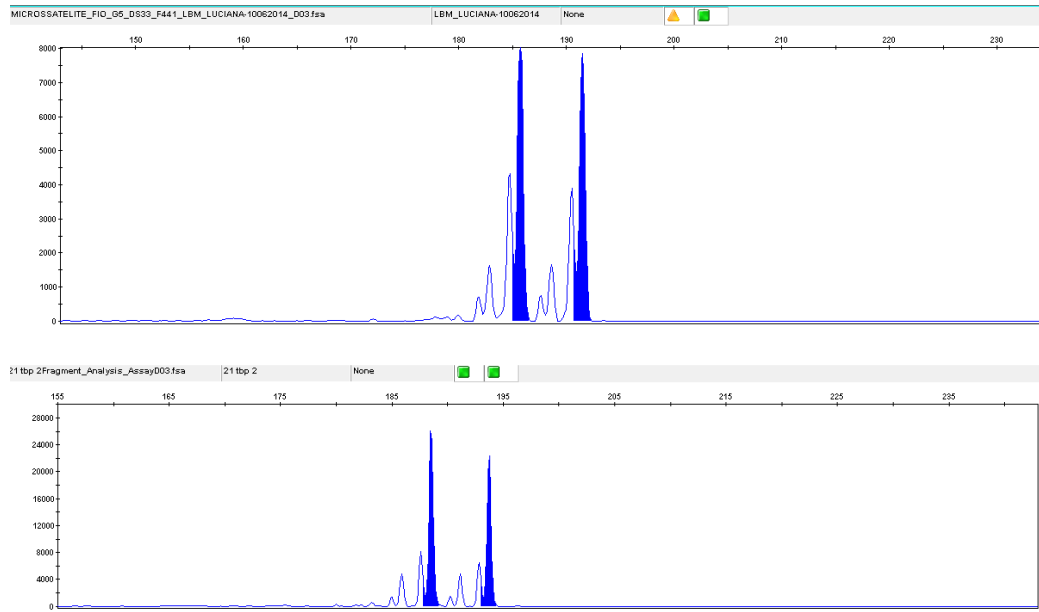
Indivíduo 19



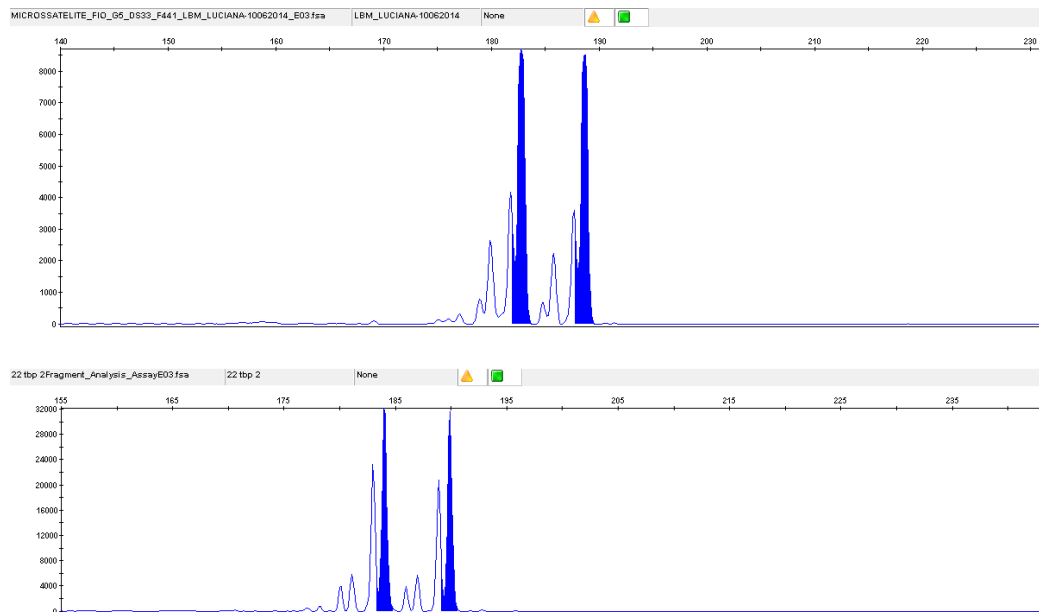
Indivíduo 20



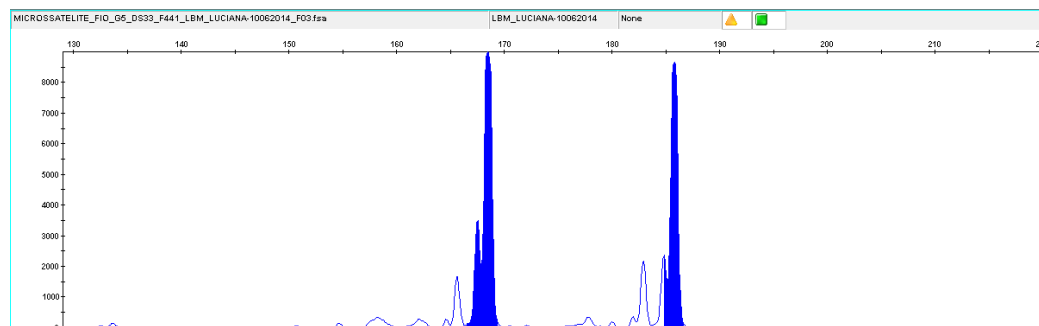
Indivíduo 21

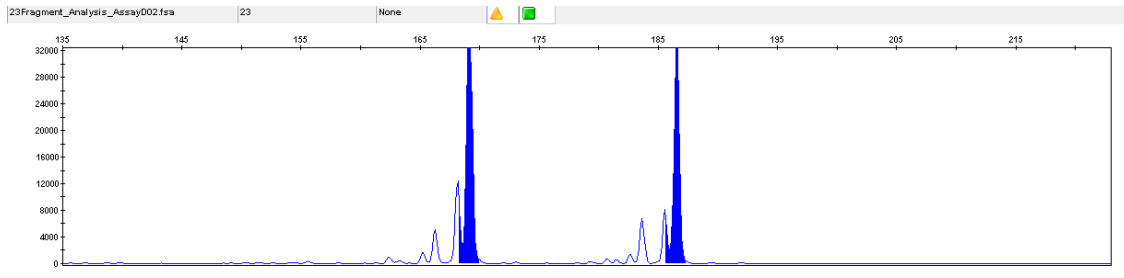


Indivíduo 22

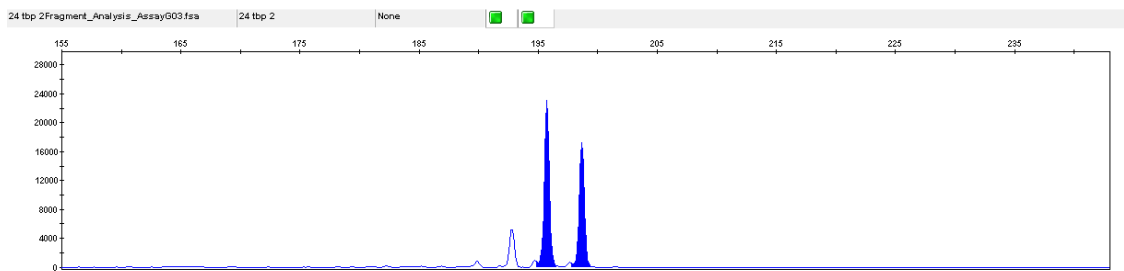
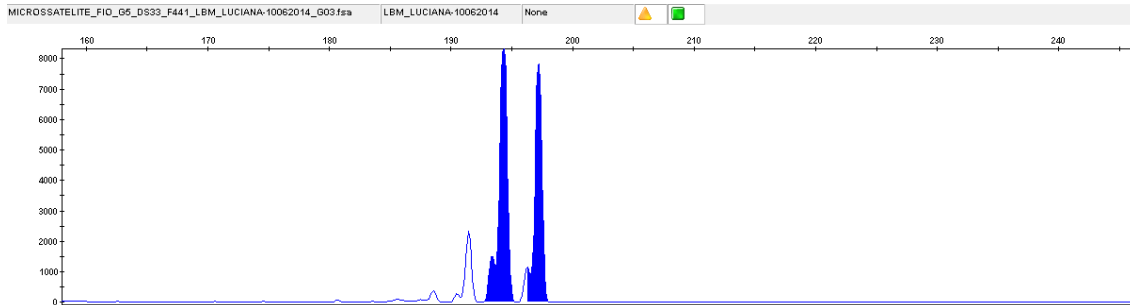


Indivíduo 23

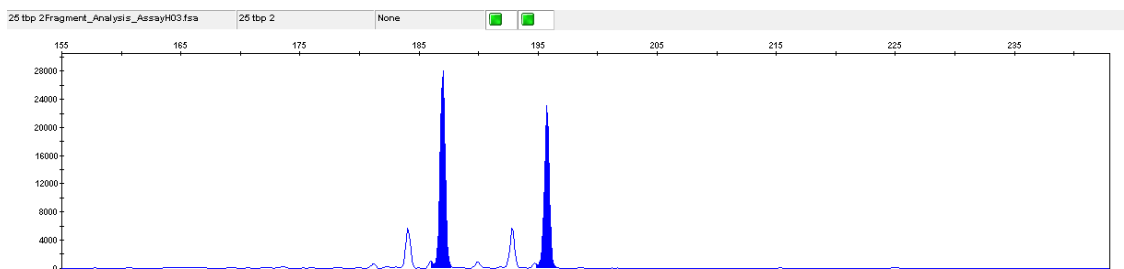
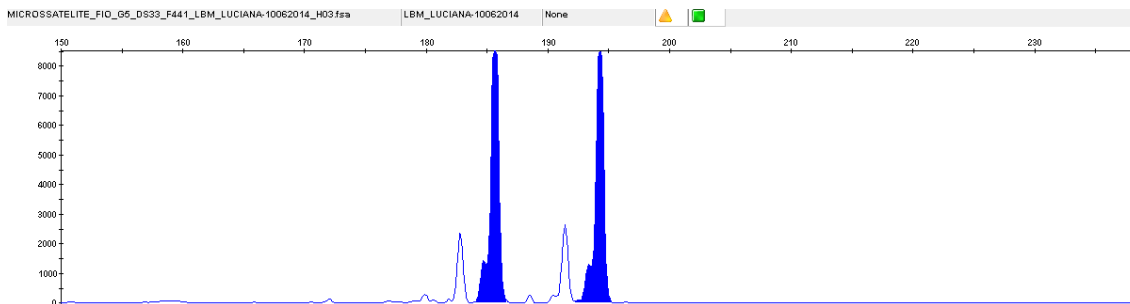




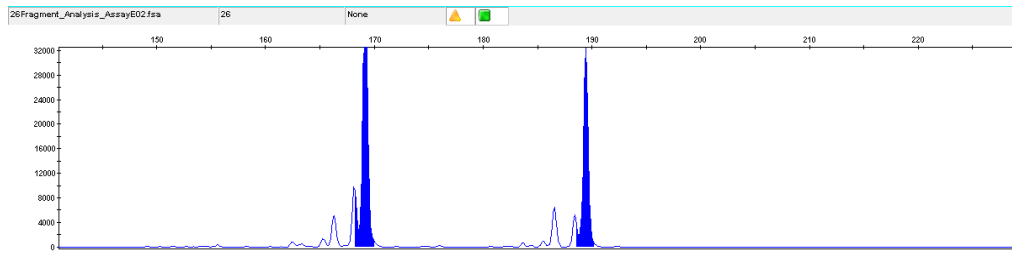
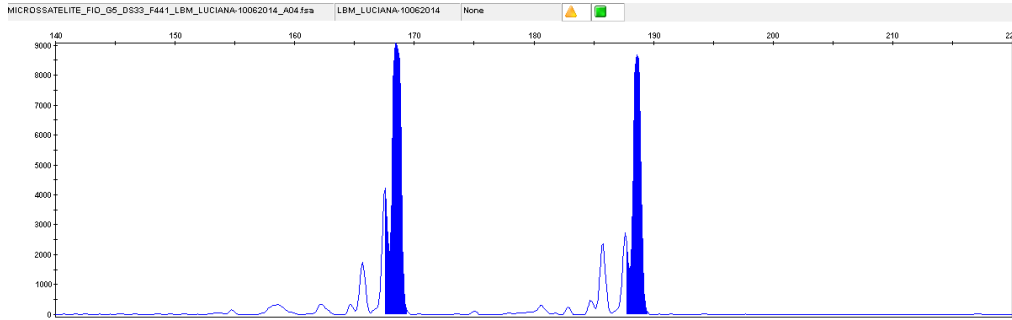
Indivíduo 24



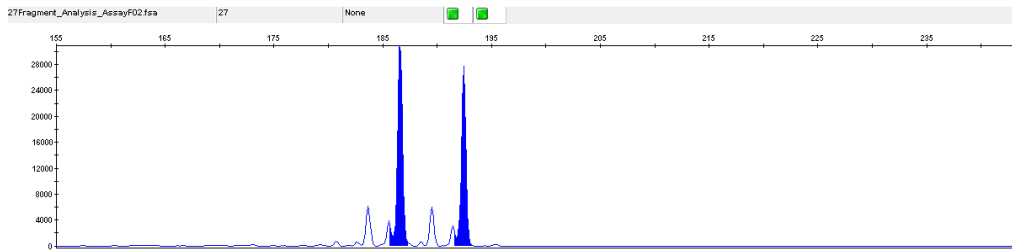
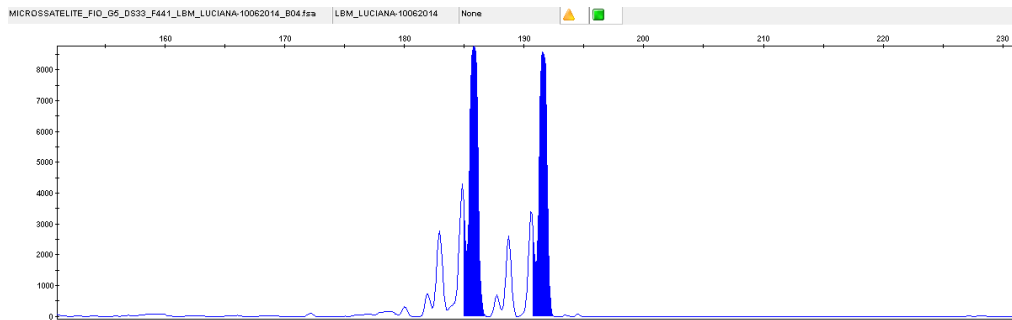
Indivíduo 25



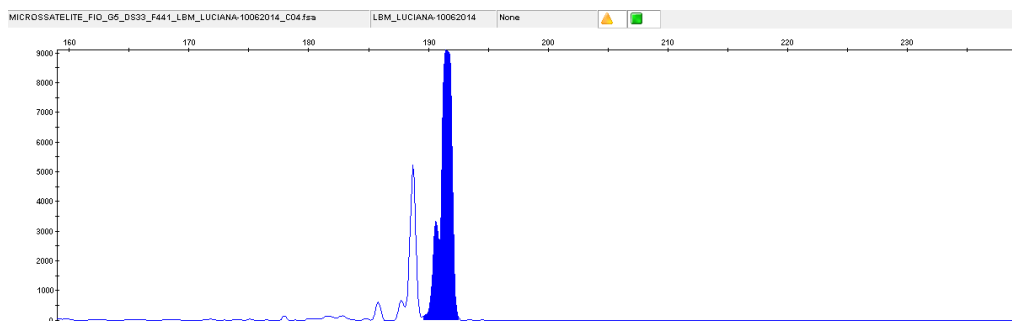
Indivíduo 26

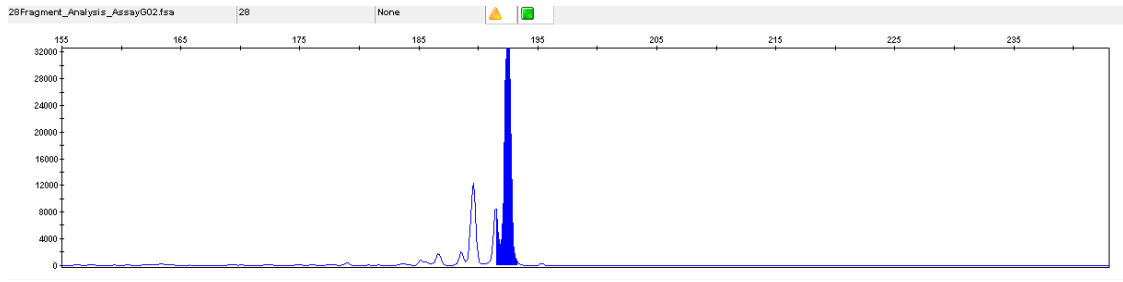


Indivíduo 27

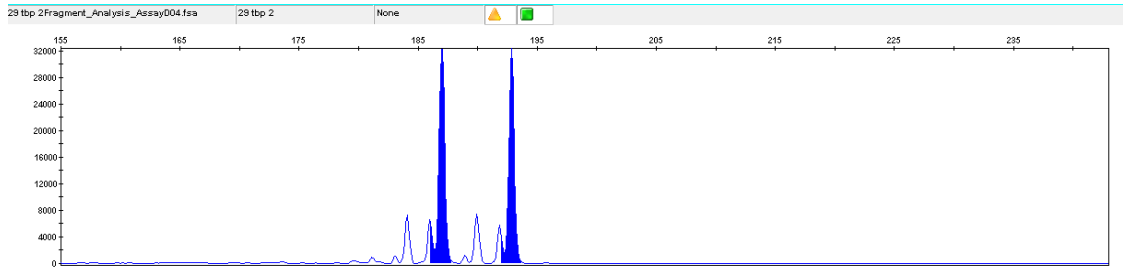
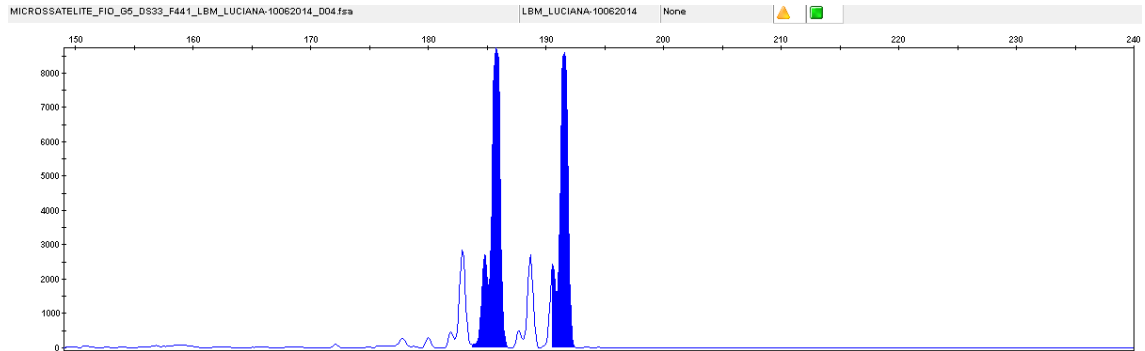


Indivíduo 28

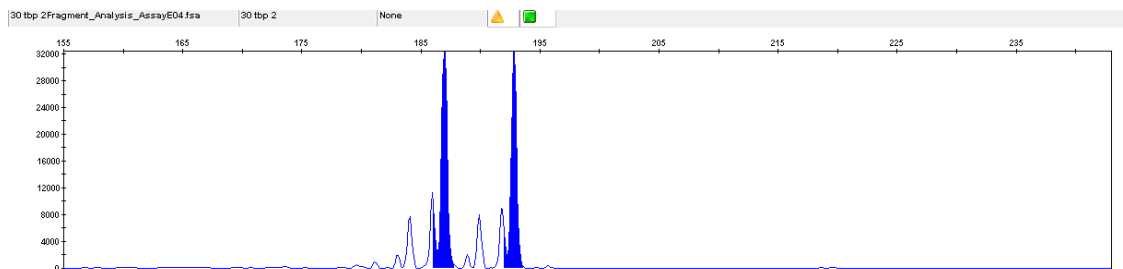
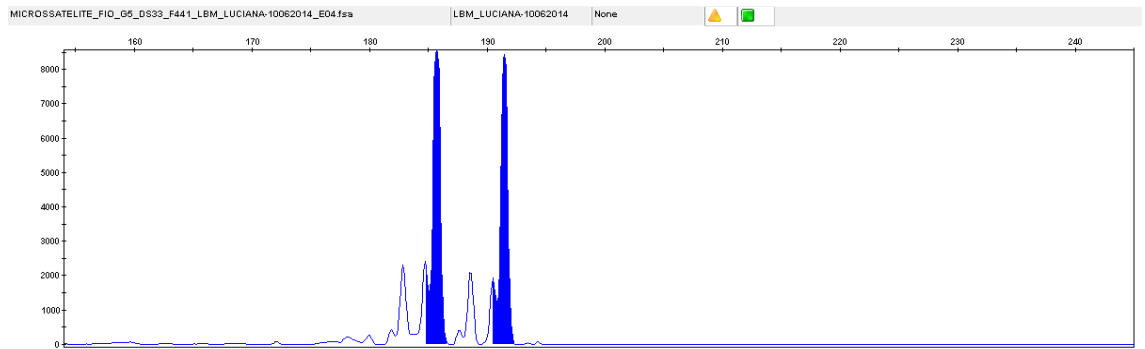




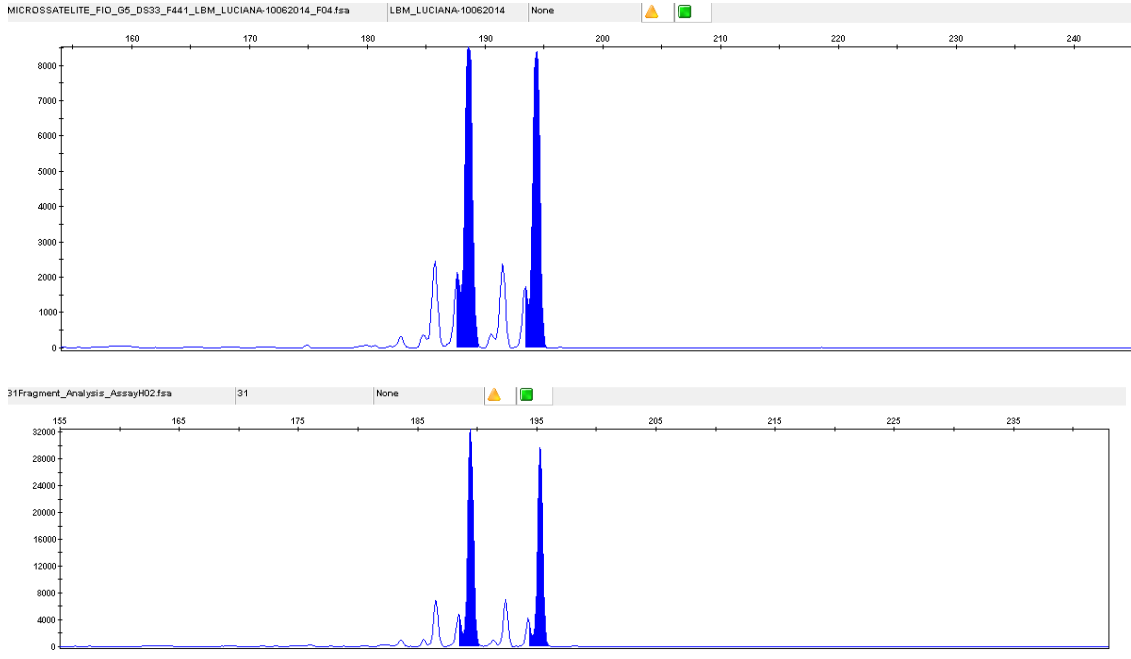
Indivíduo 29



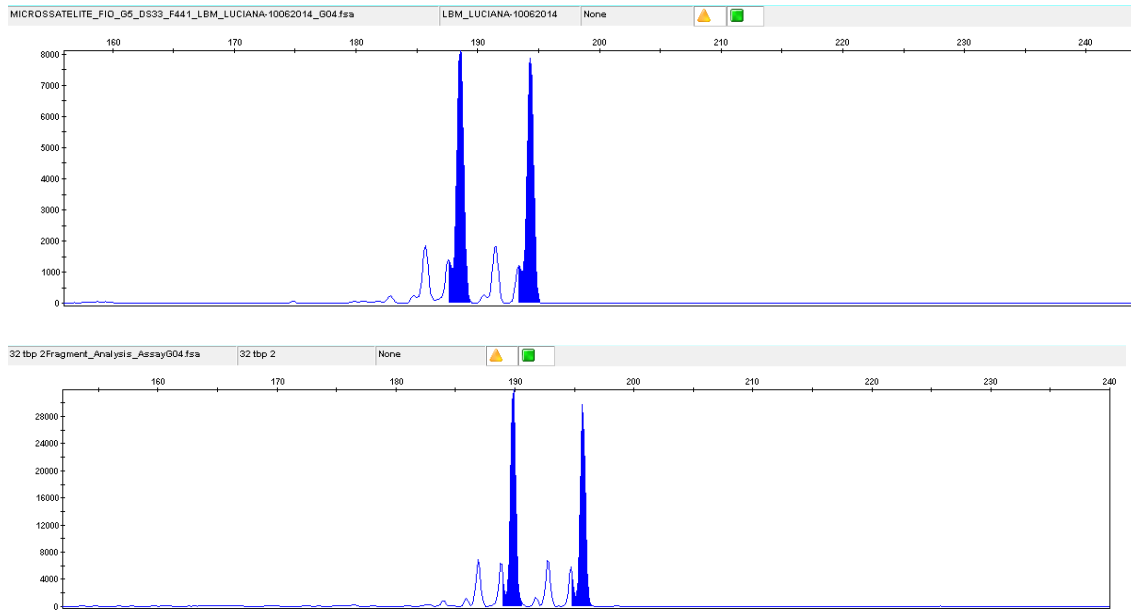
Indivíduo 30



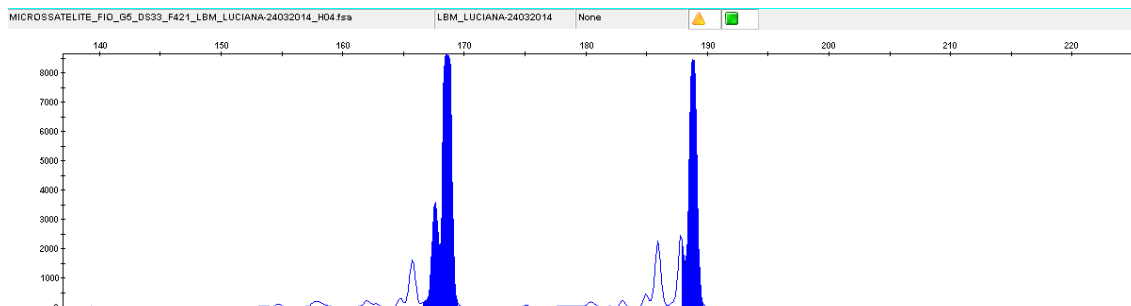
Indivíduo 31

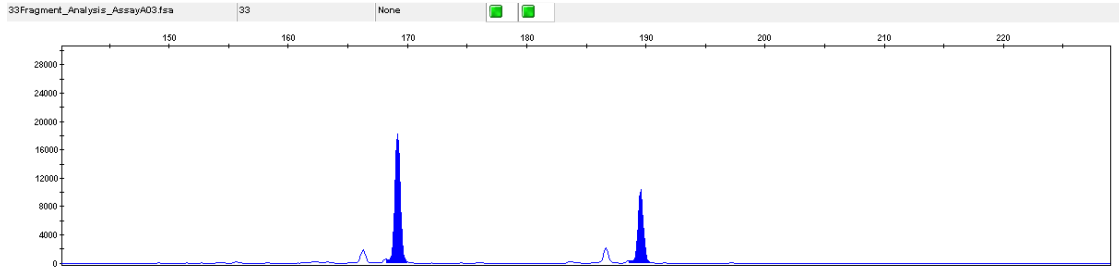


Indivíduo 32

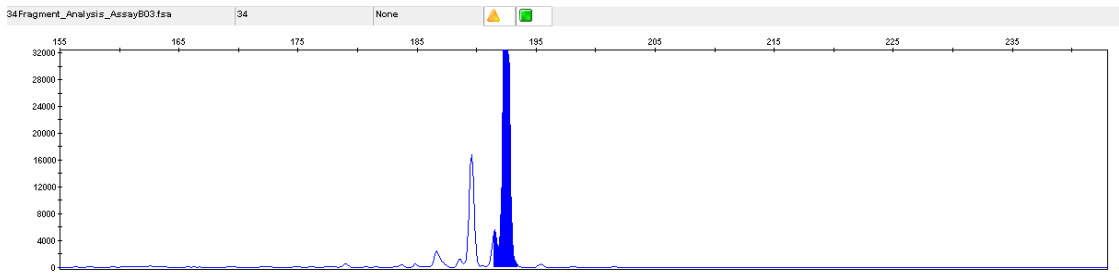
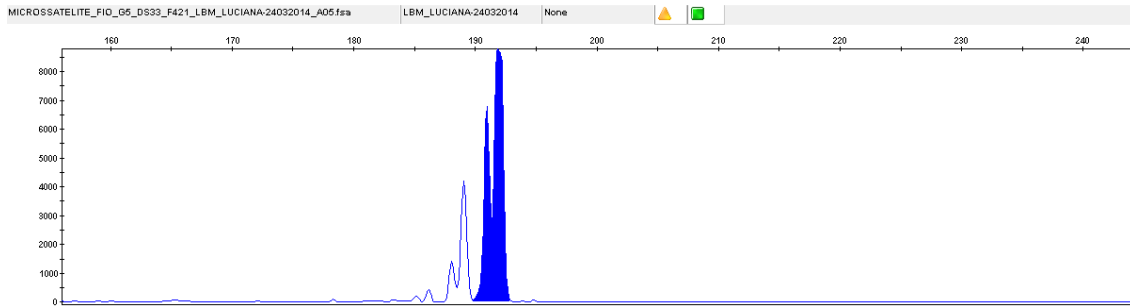


Indivíduo 33

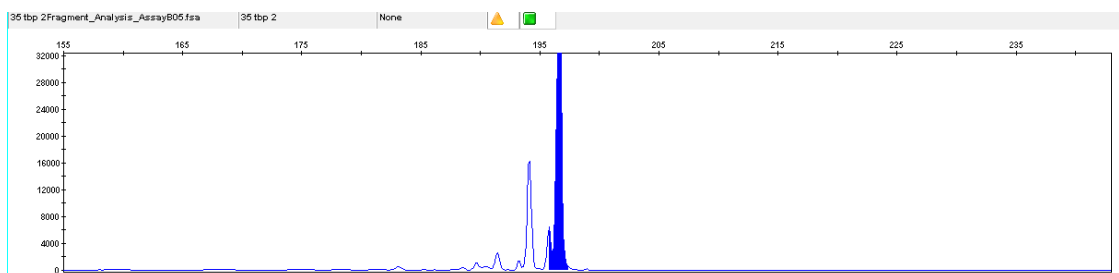
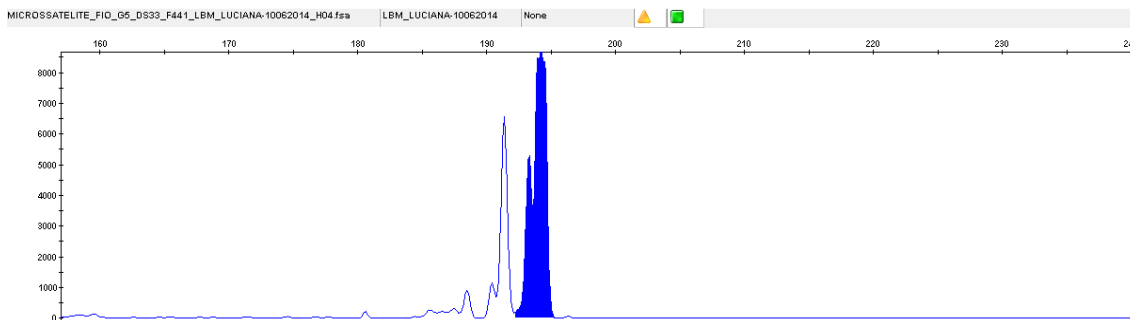




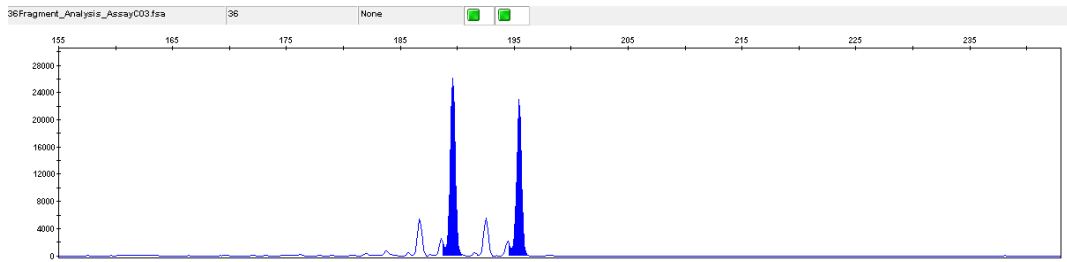
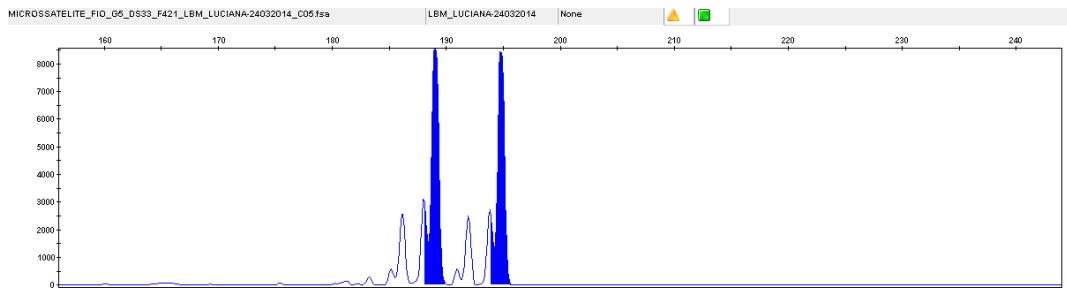
Indivíduo 34



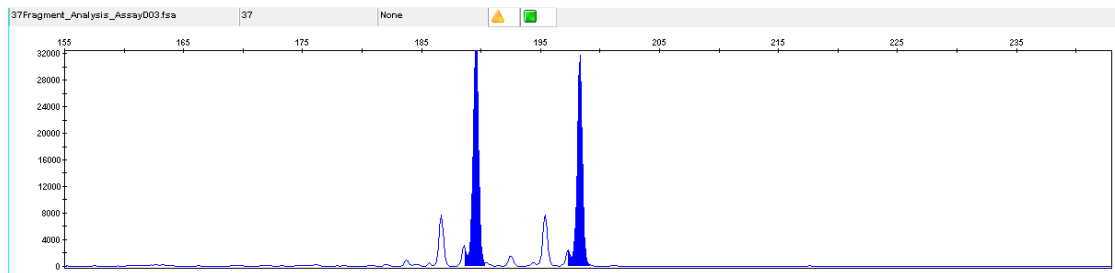
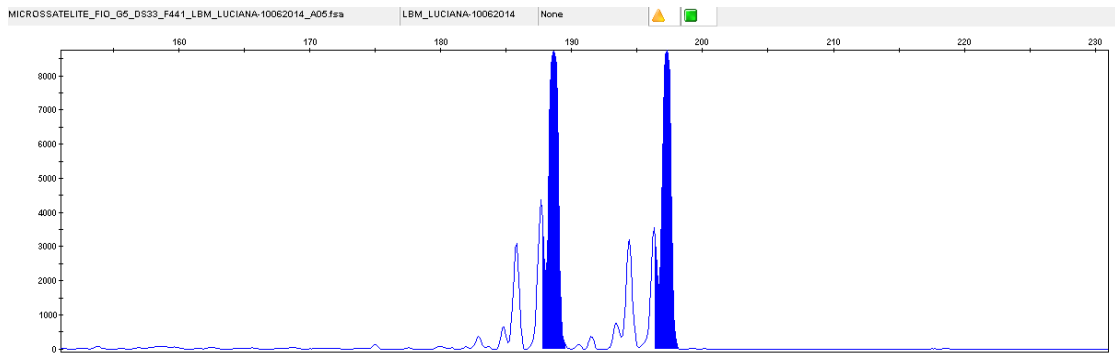
Indivíduo 35



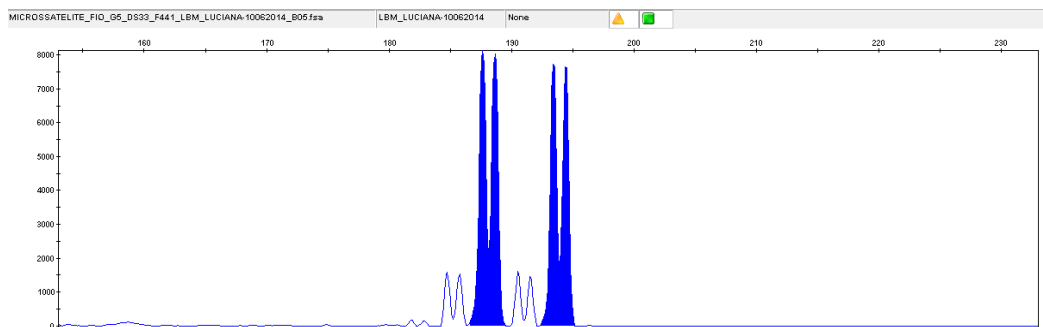
Indivíduo 36

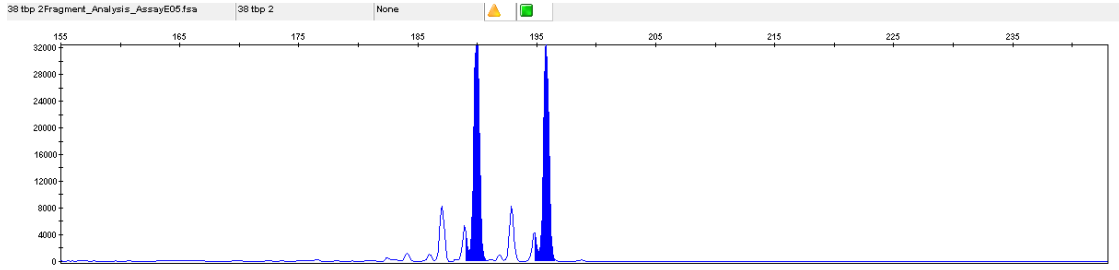


Indivíduo 37

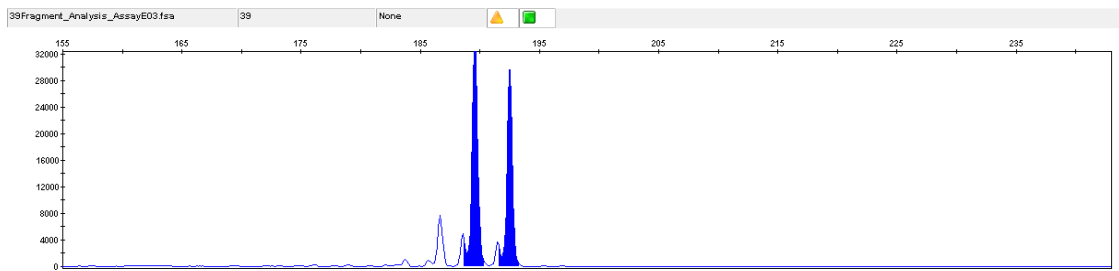
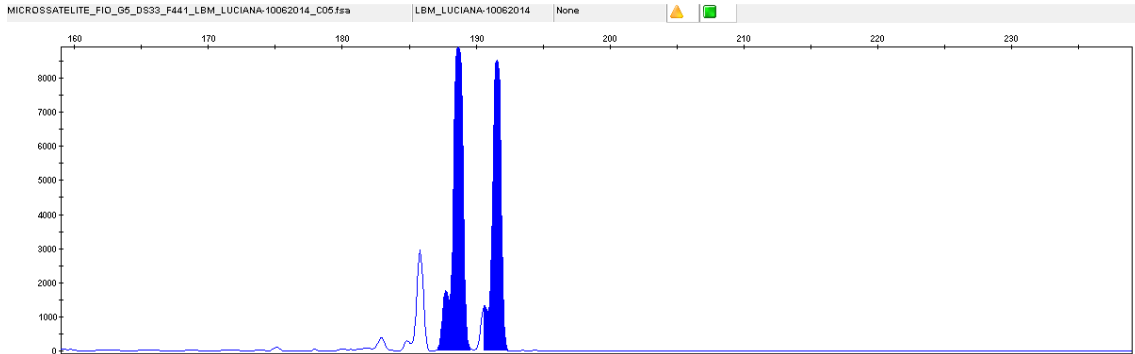


Indivíduo 38

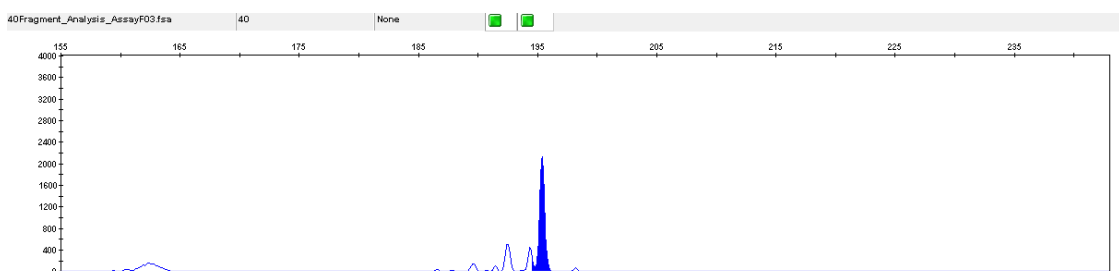
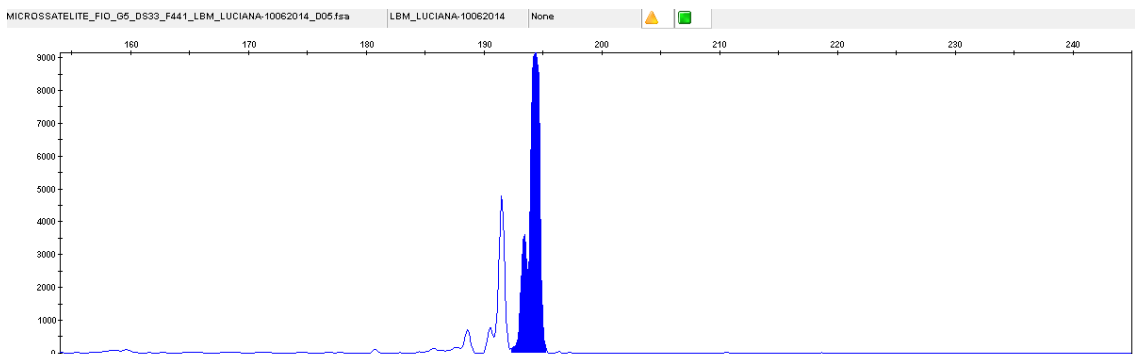




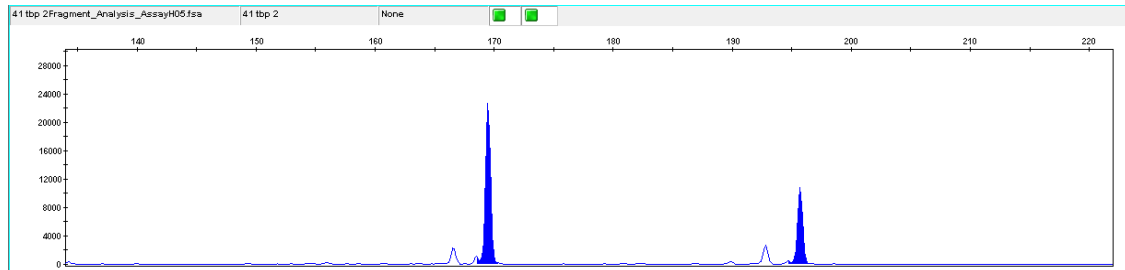
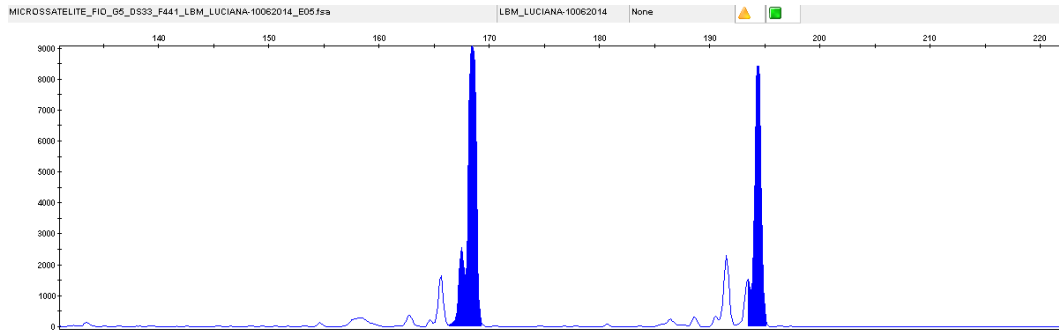
Indivíduo 39



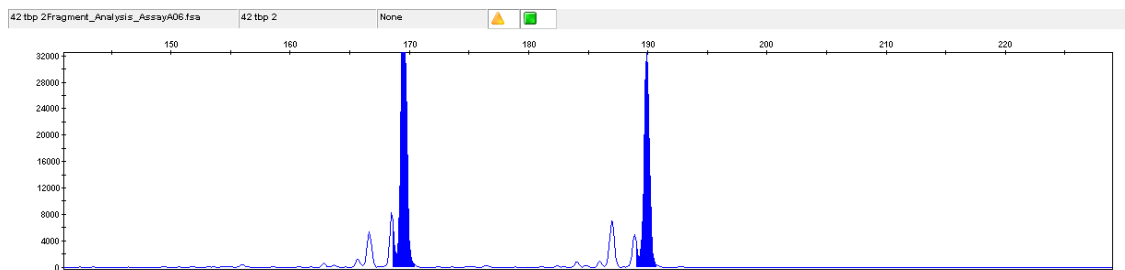
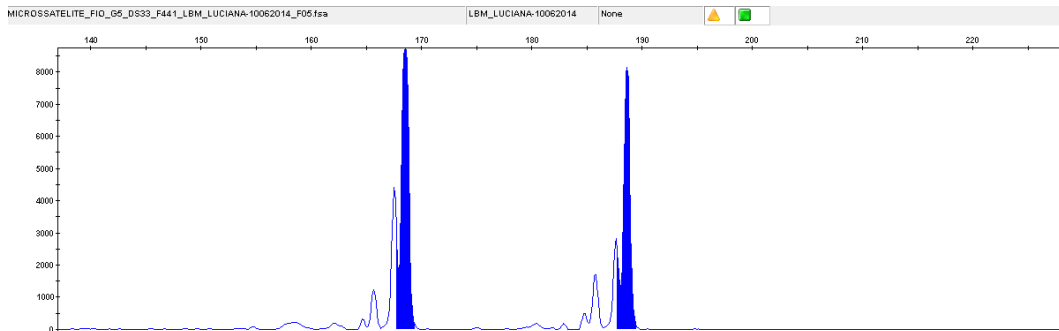
Indivíduo 40



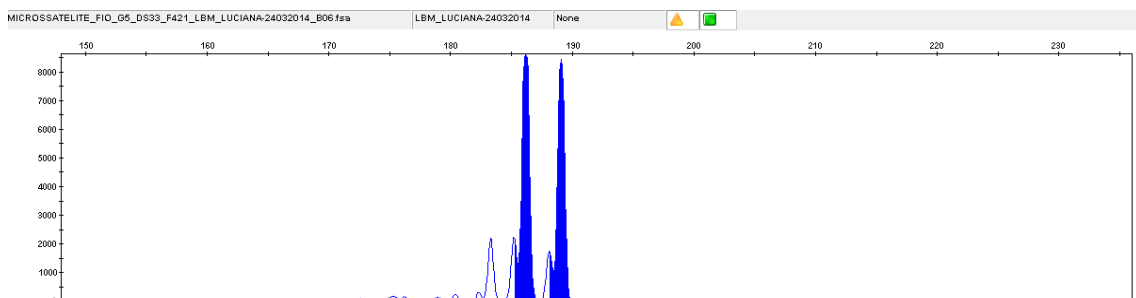
Indivíduo 41

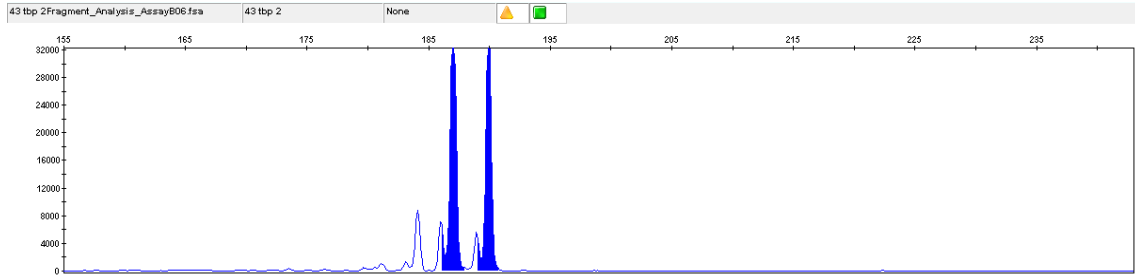


Indivíduo 42

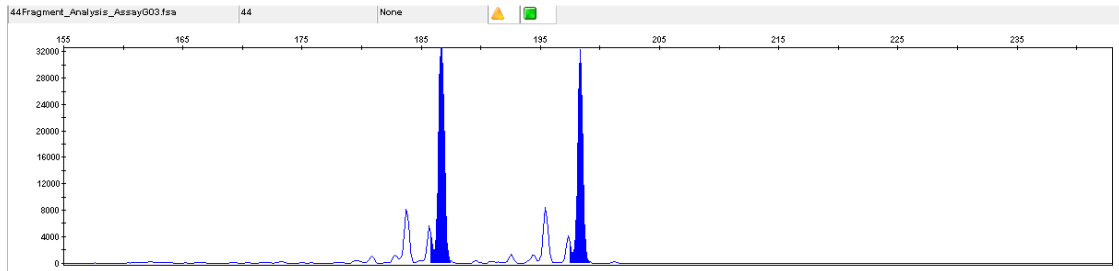
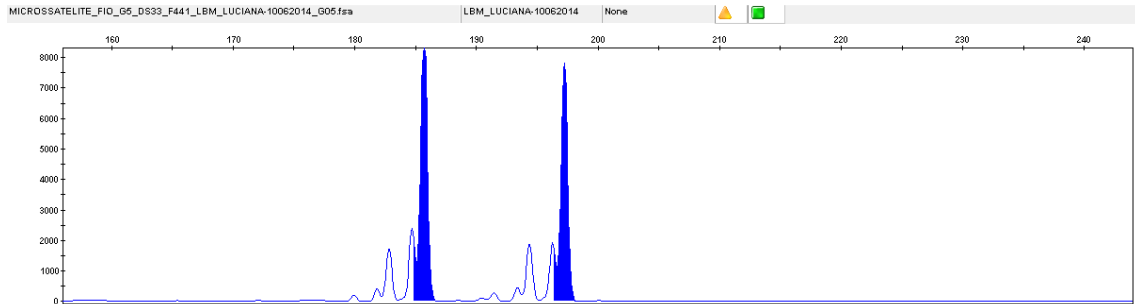


Indivíduo 43

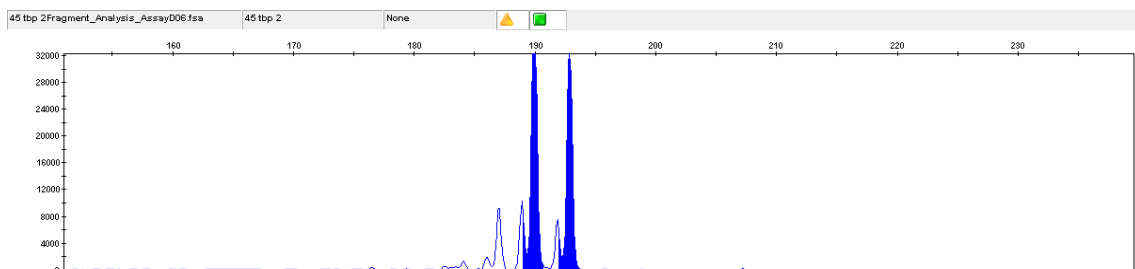
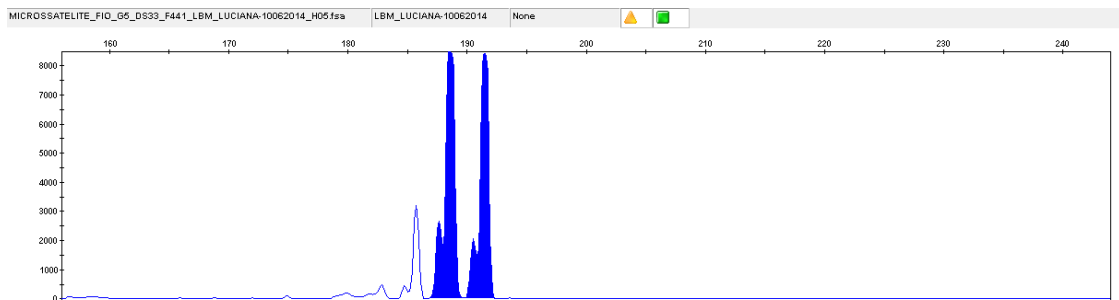




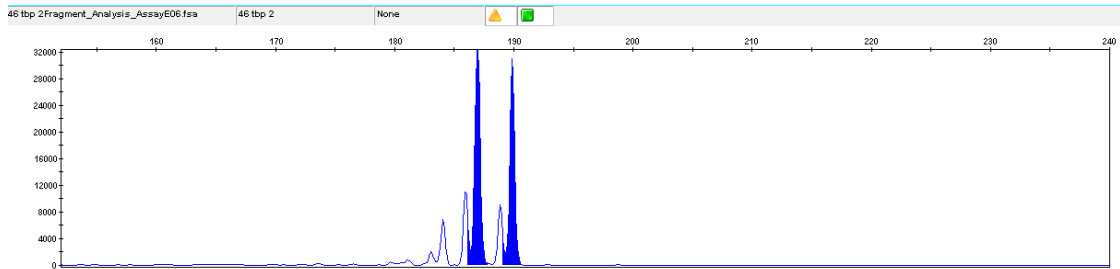
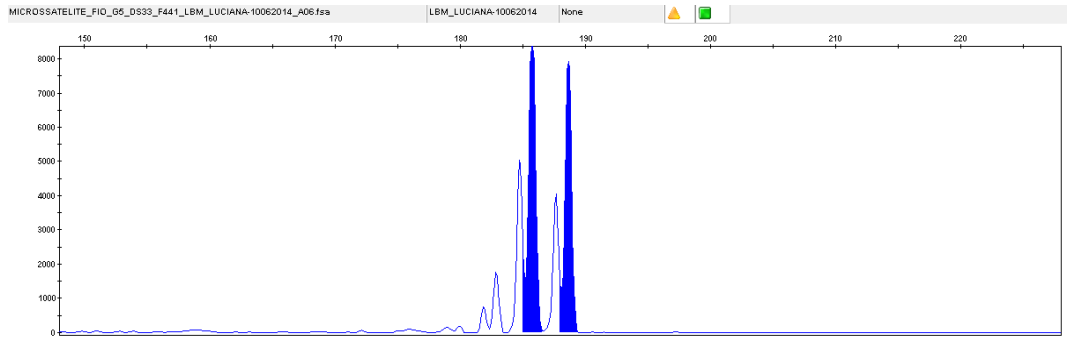
Indivíduo 44



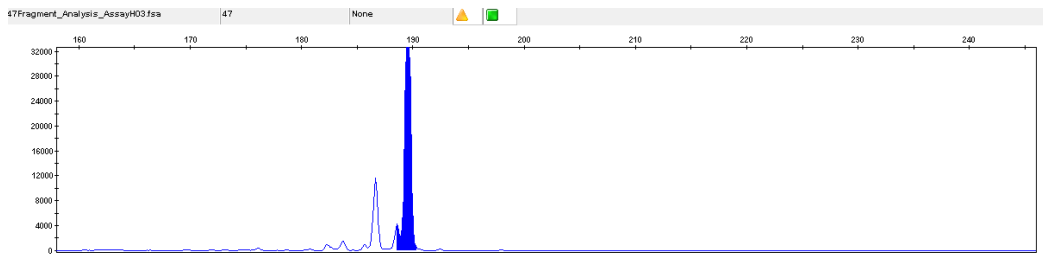
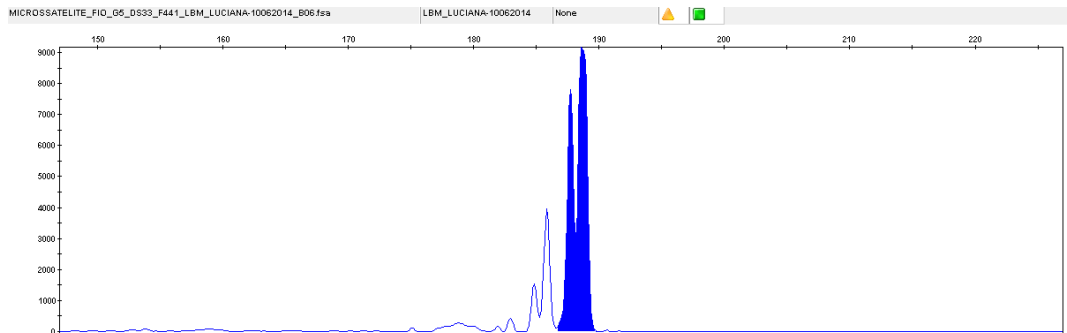
Indivíduo 45



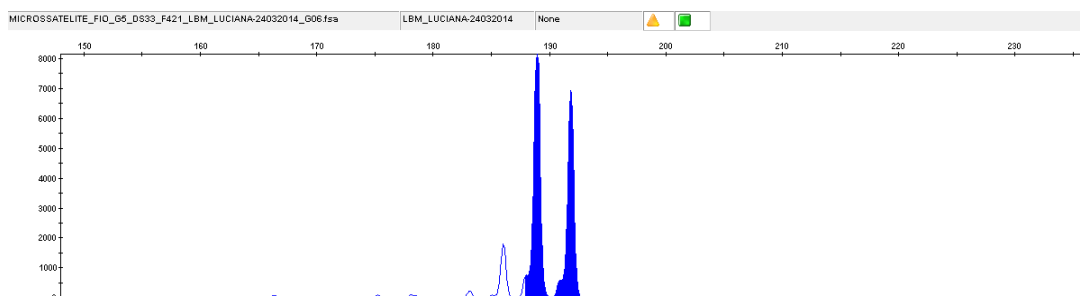
Indivíduo 46

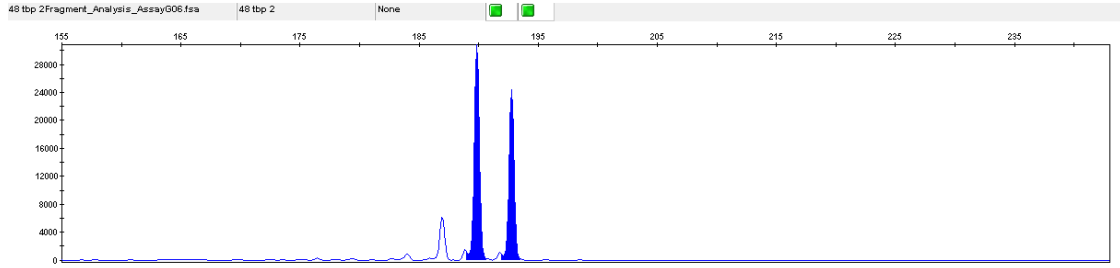


Indivíduo 47

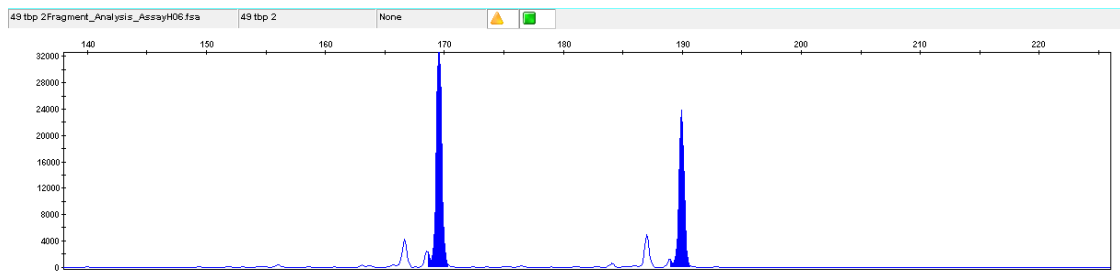
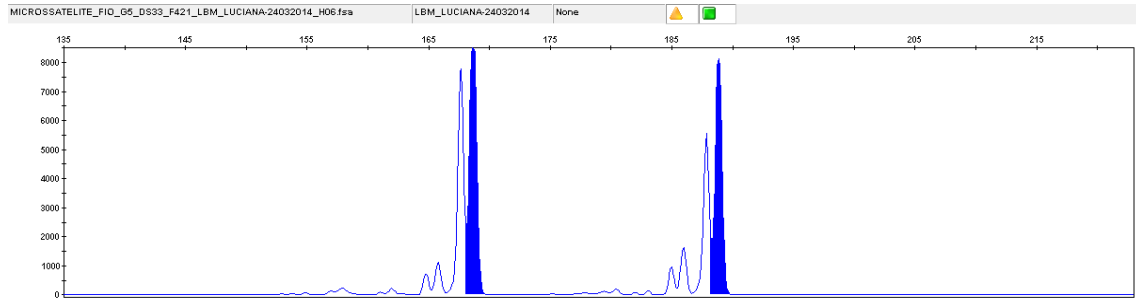


Indivíduo 48

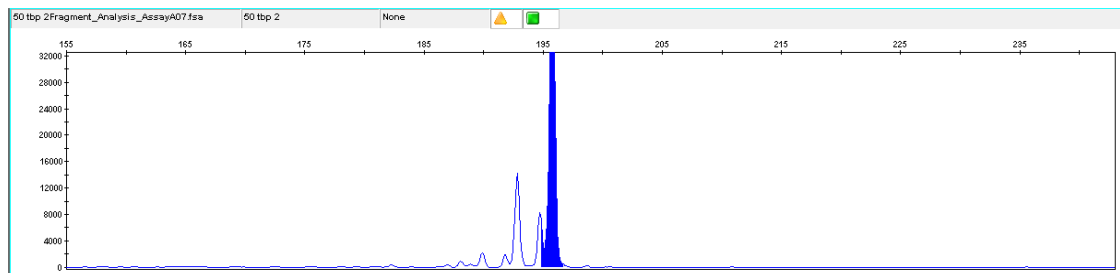
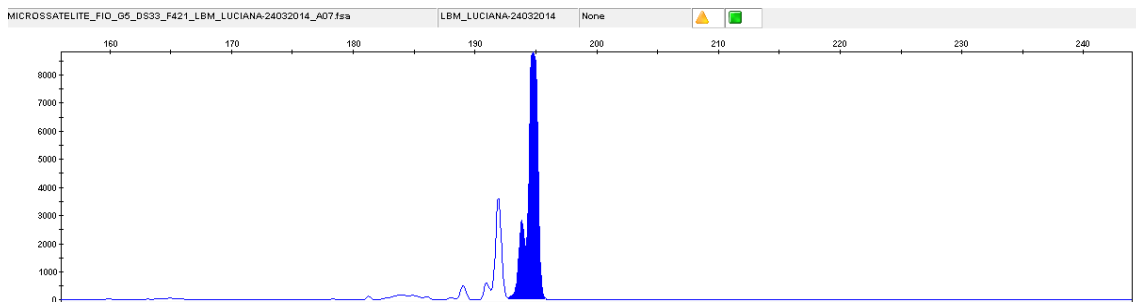




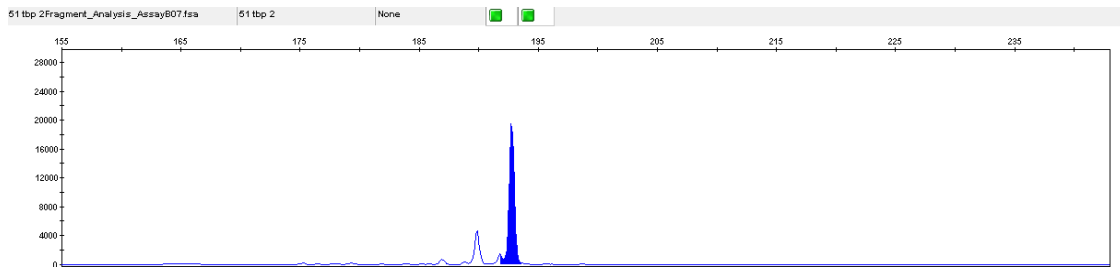
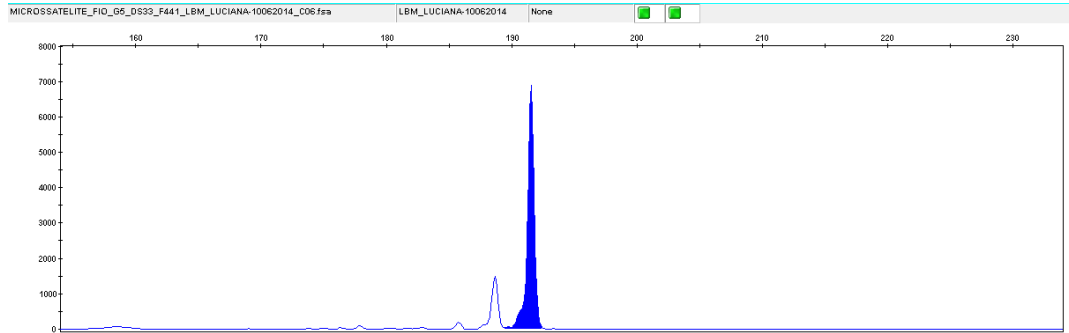
Indivíduo 49



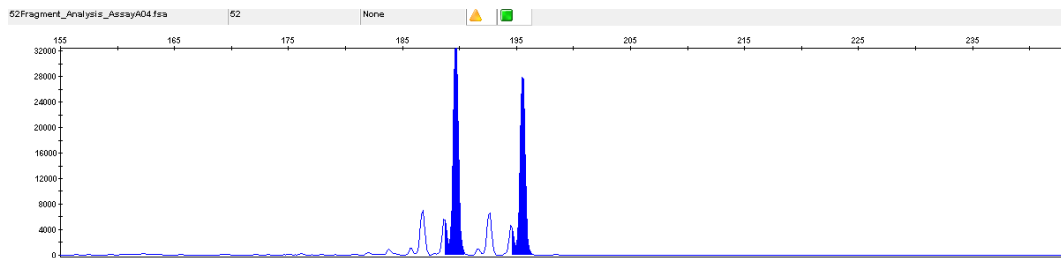
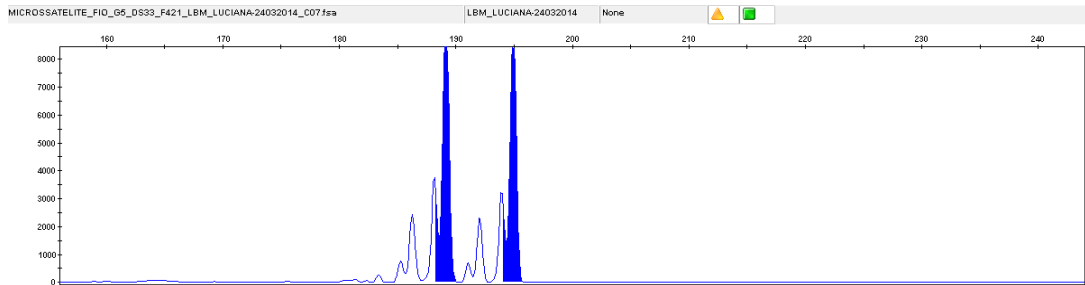
Indivíduo 50



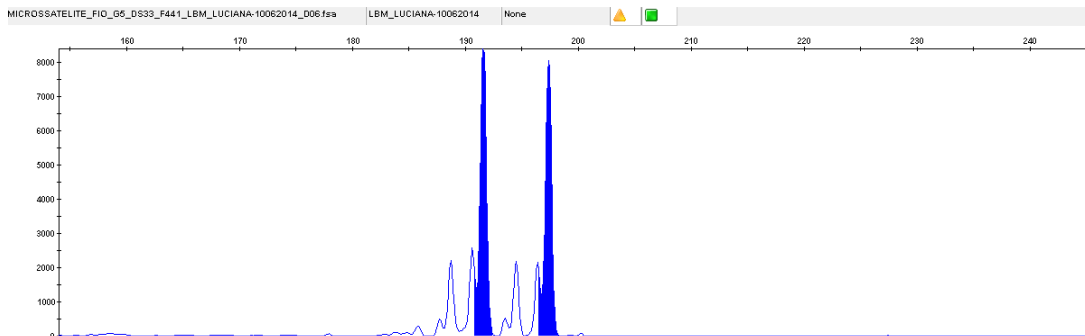
Indivíduo 51

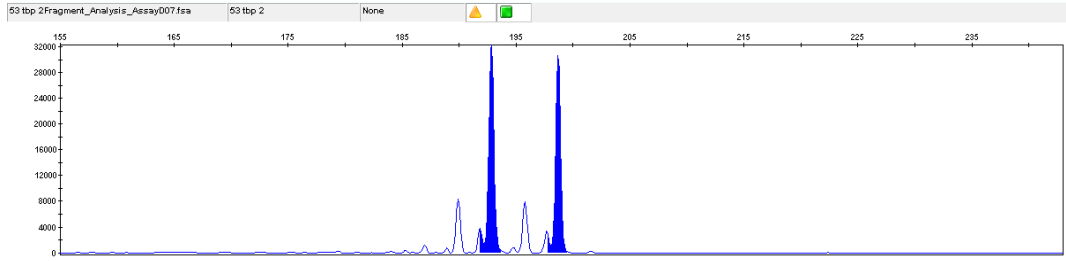


Indivíduo 52

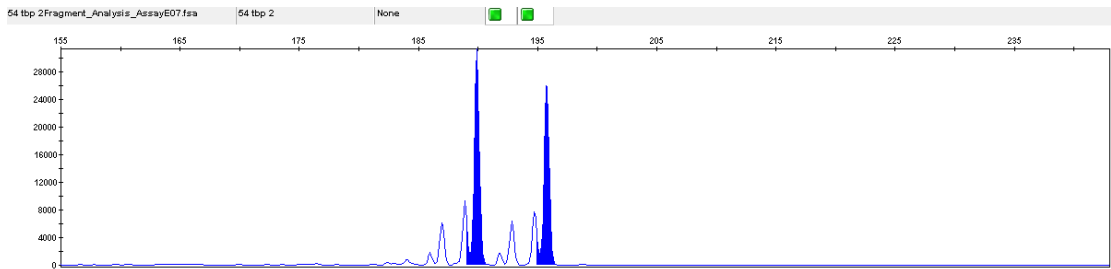
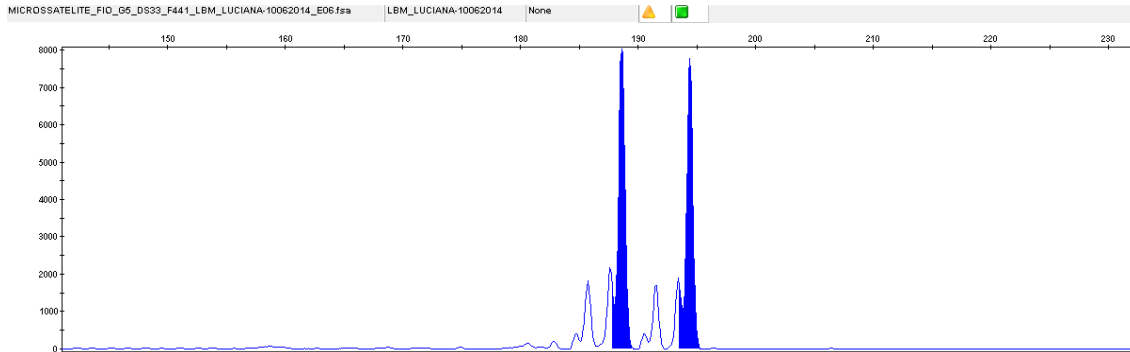


Indivíduo 53

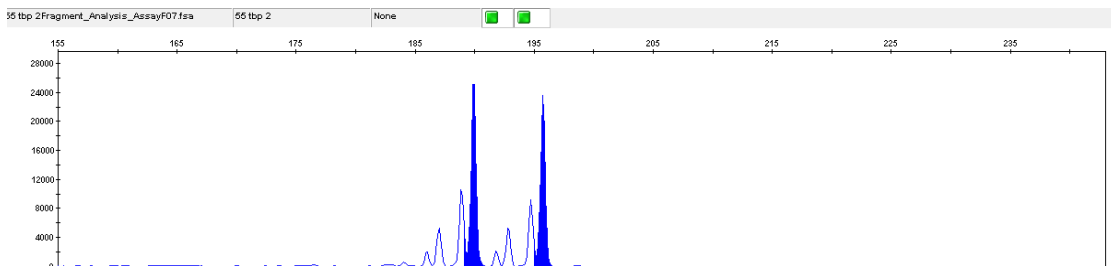
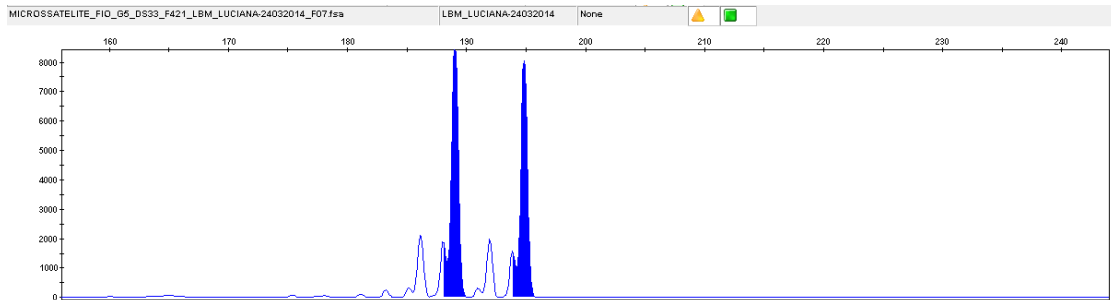




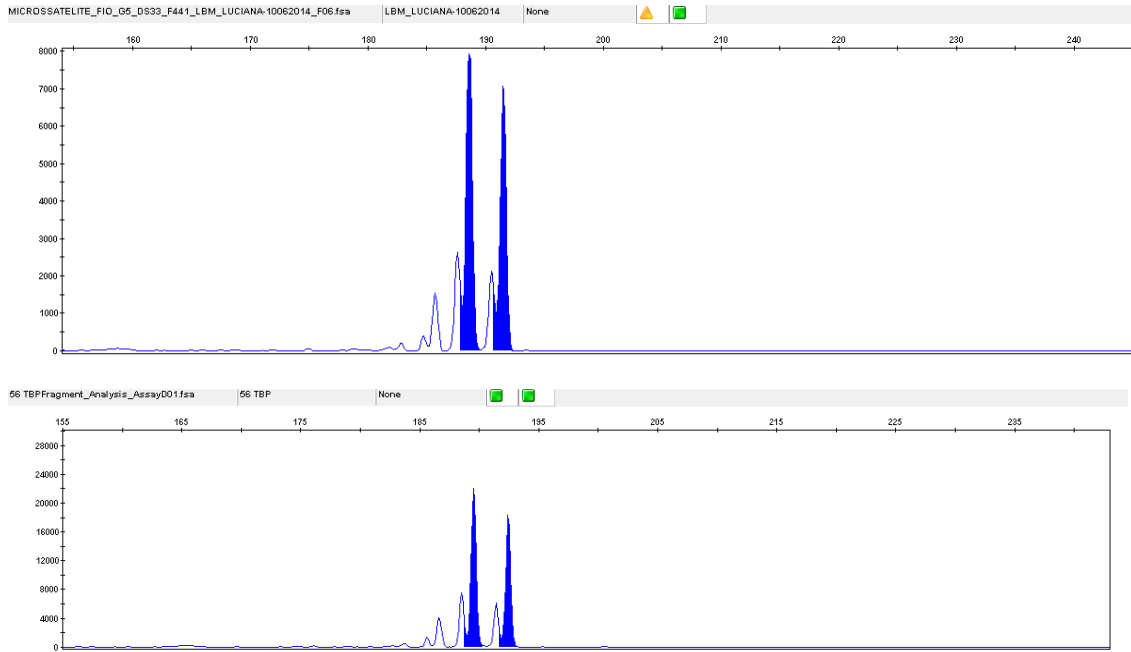
Indivíduo 54



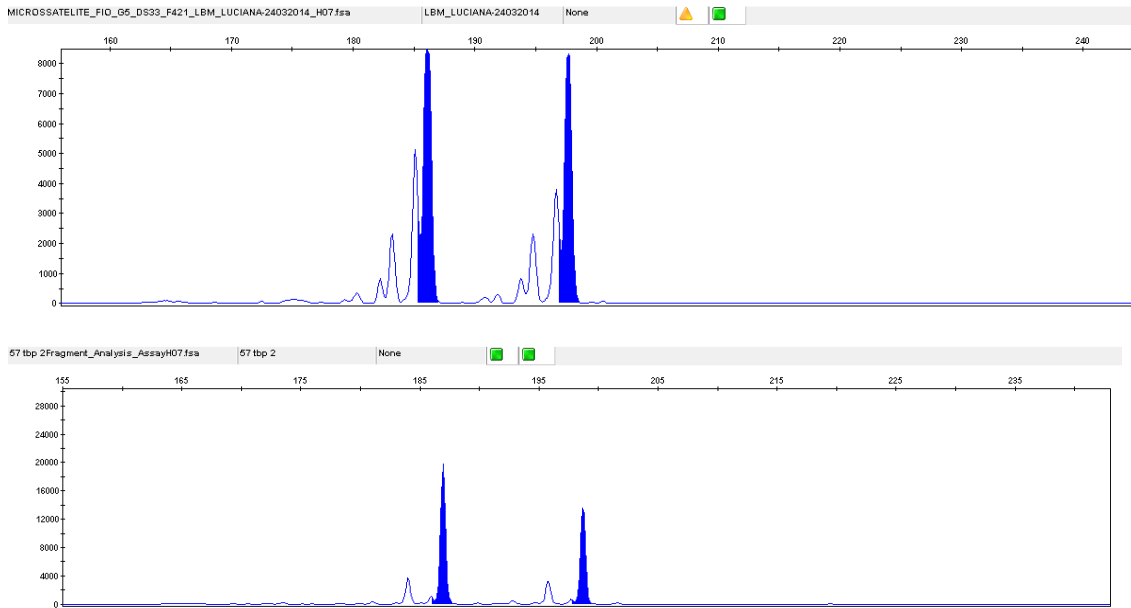
Indivíduo 55



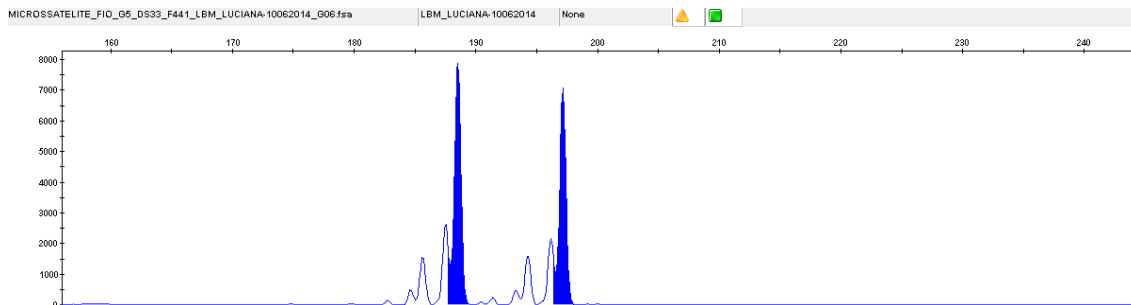
Indivíduo 56

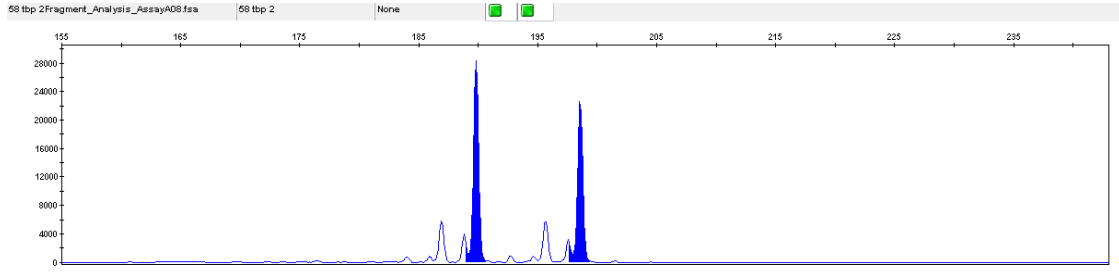


Indivíduo 57

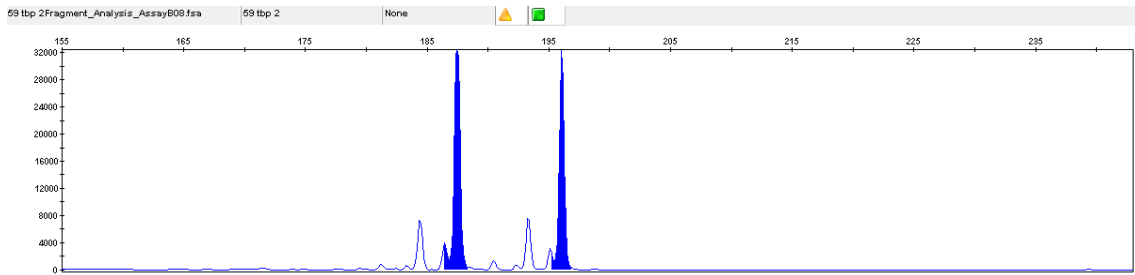
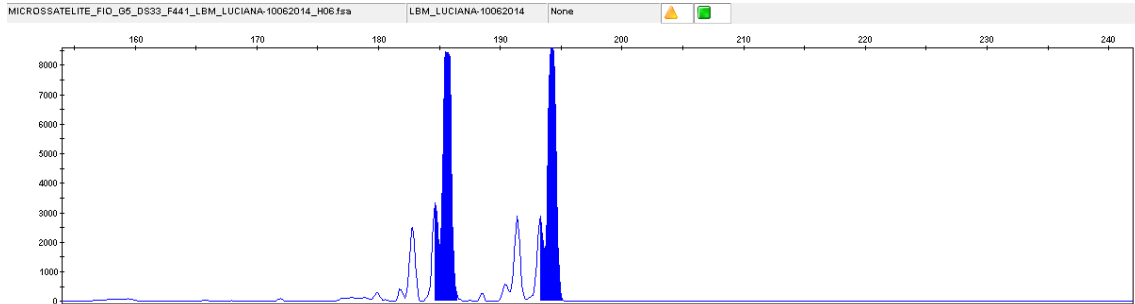


Indivíduo 58

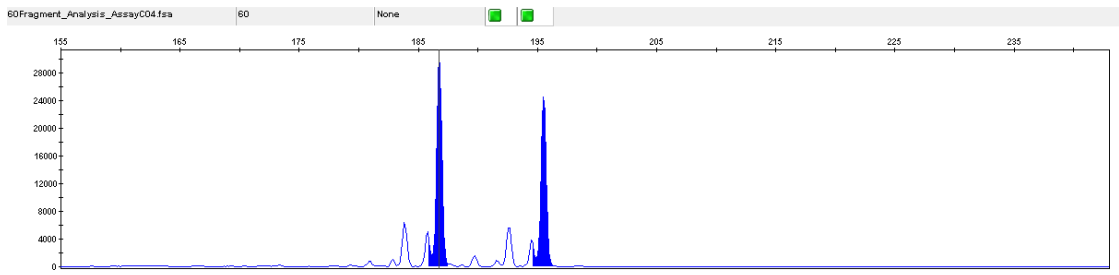
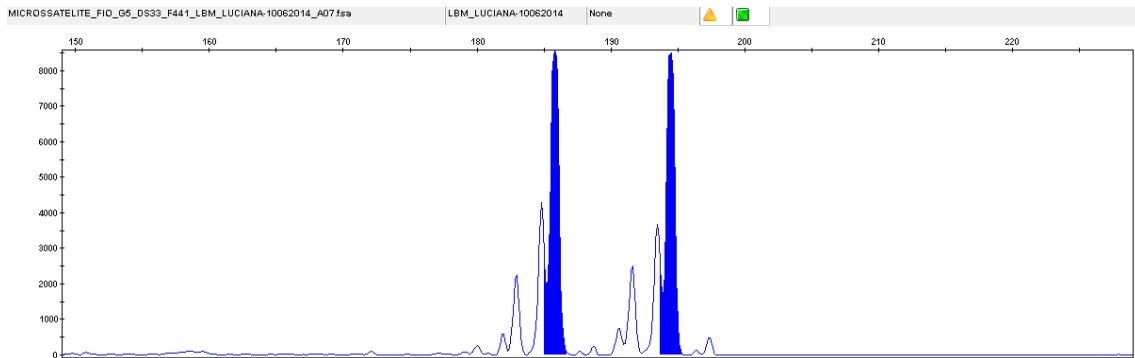




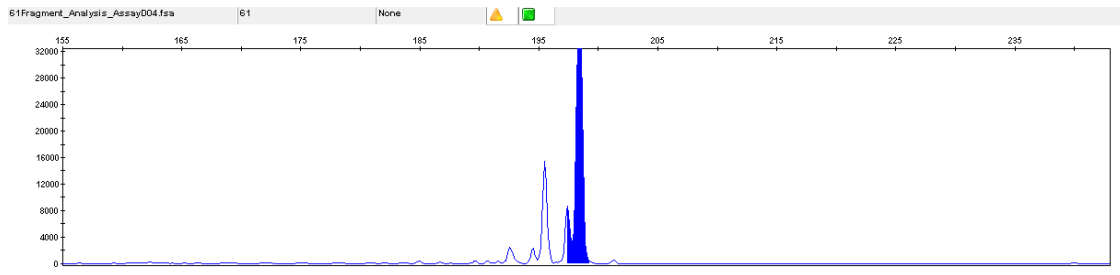
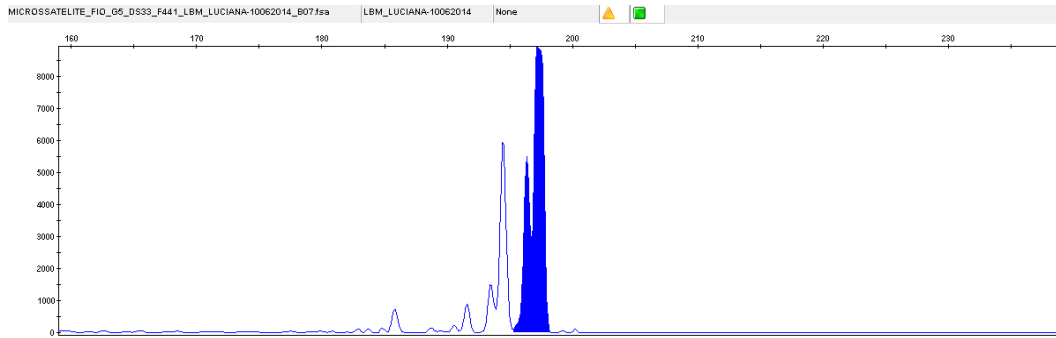
Indivíduo 59



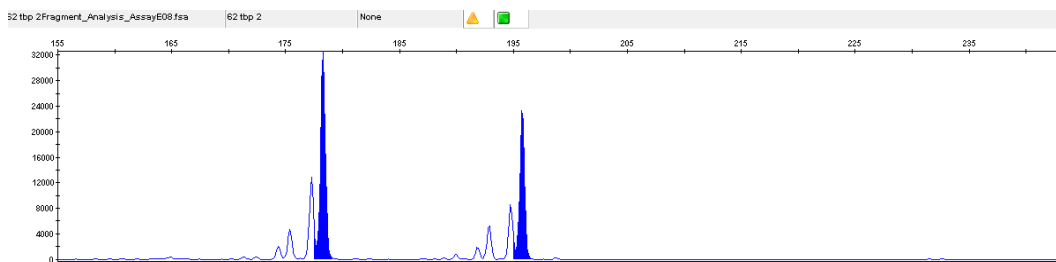
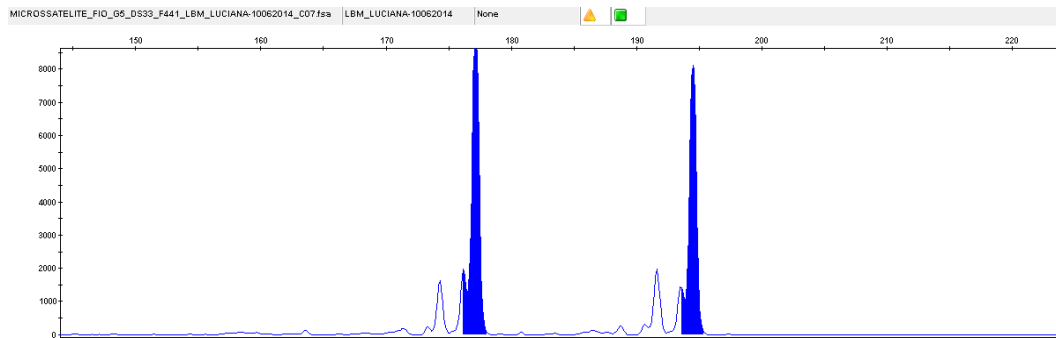
Indivíduo 60



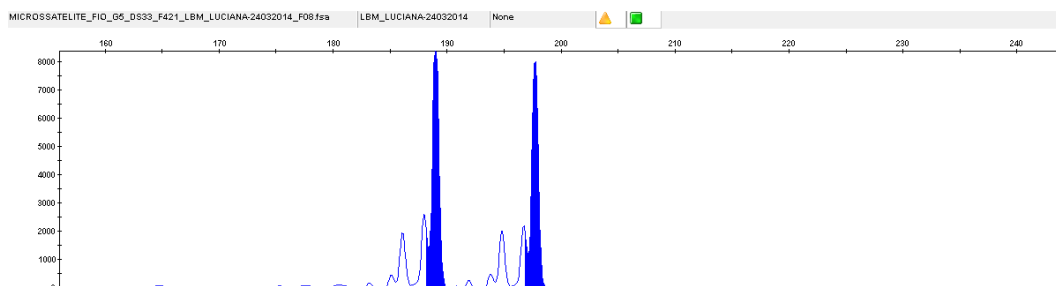
Indivíduo 61

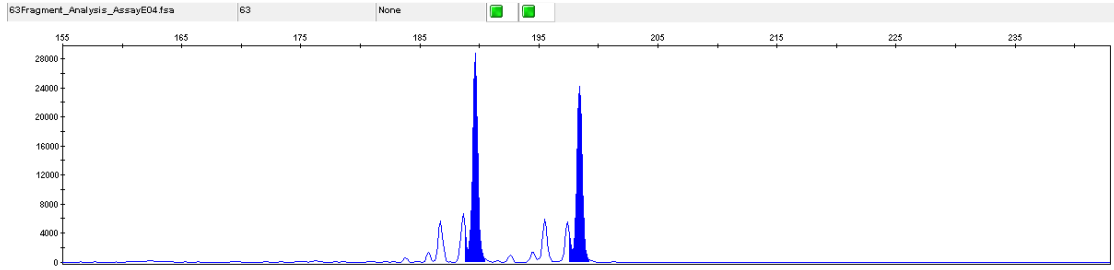


Indivíduo 62

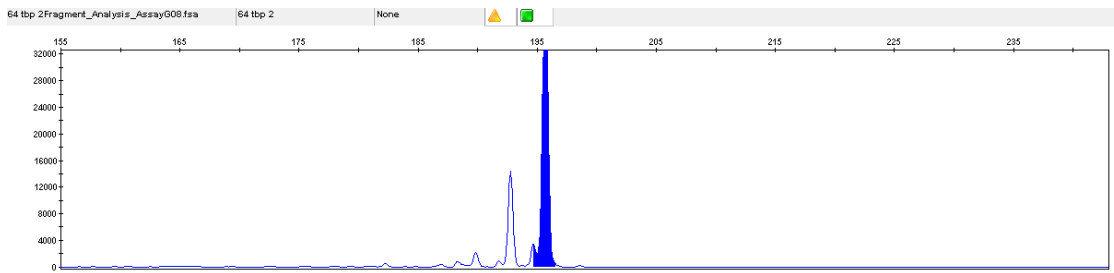
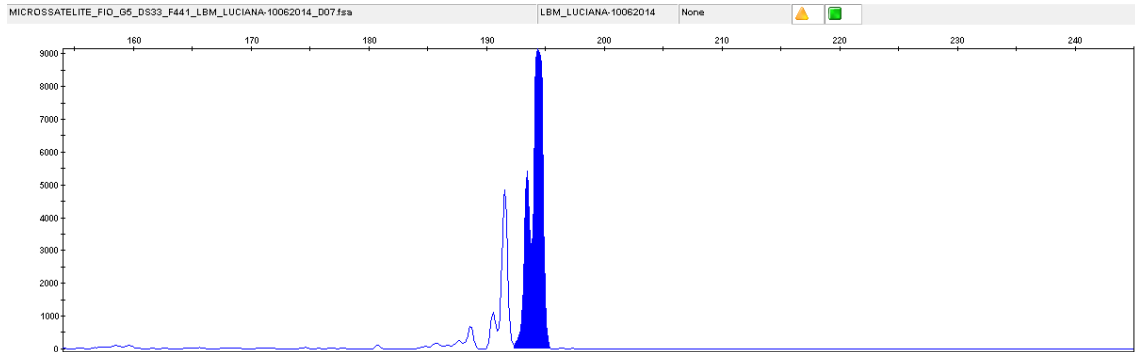


Indivíduo 63

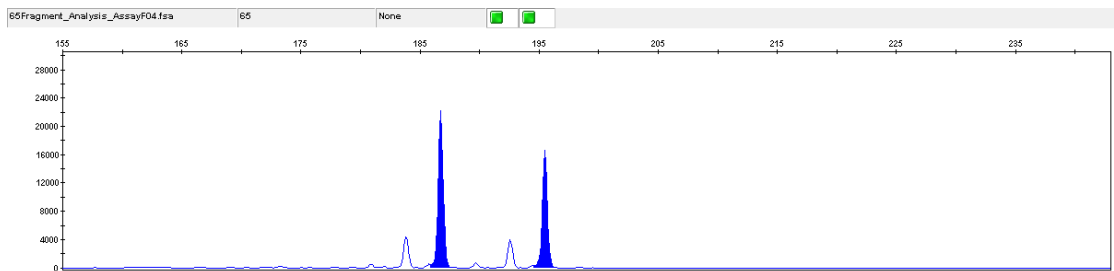
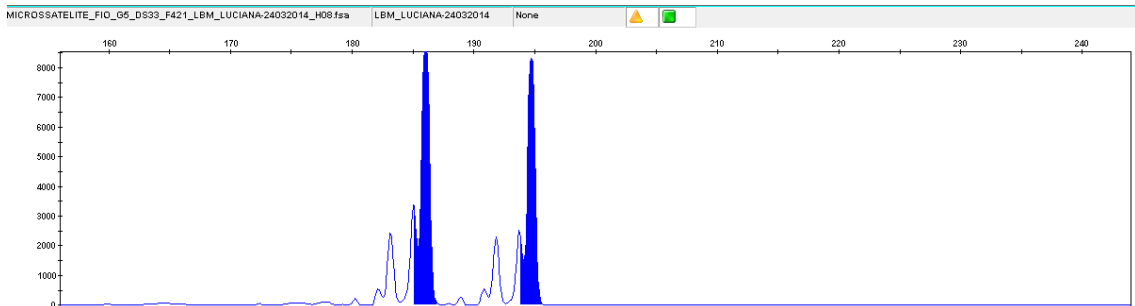




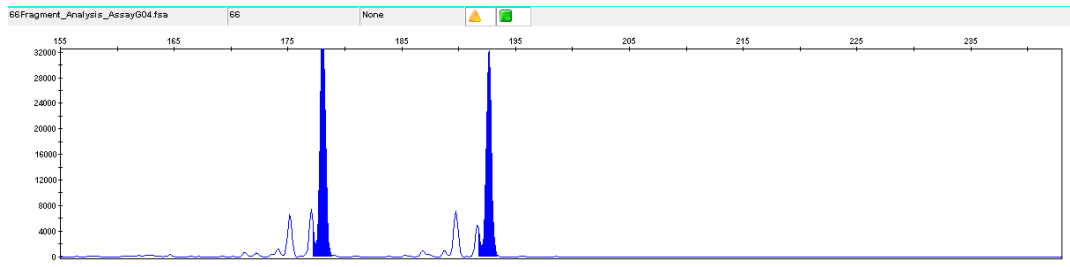
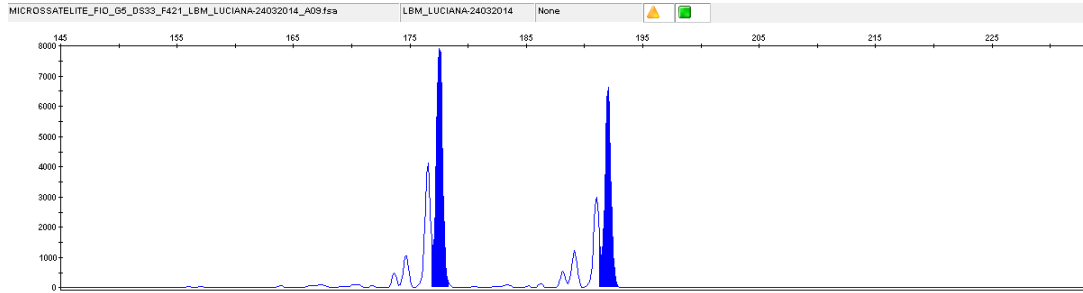
Indivíduo 64



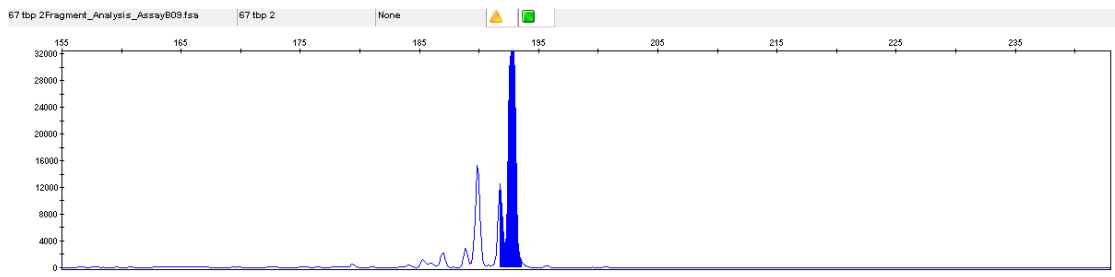
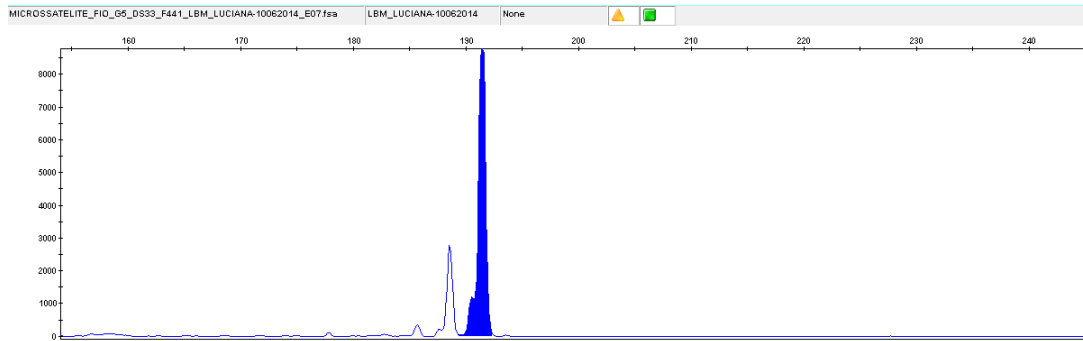
Indivíduo 65



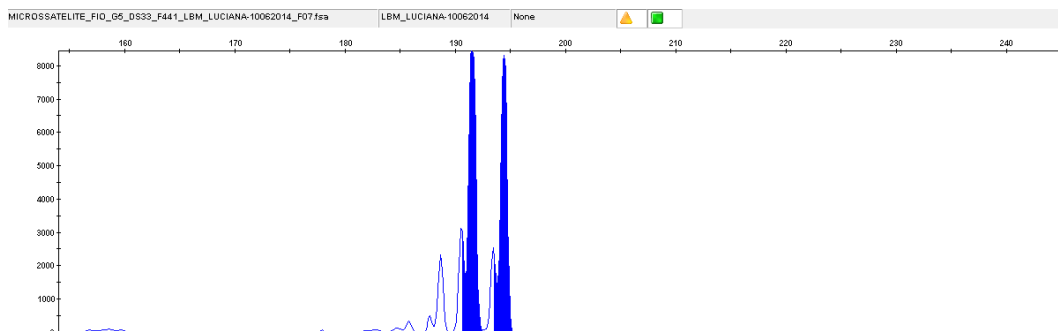
Indivíduo 66

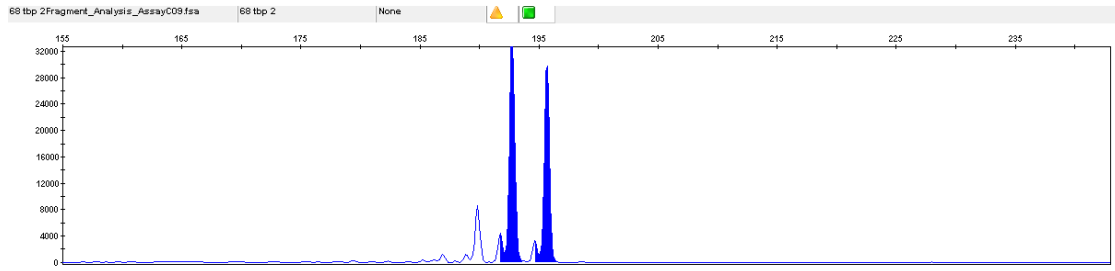


Indivíduo 67

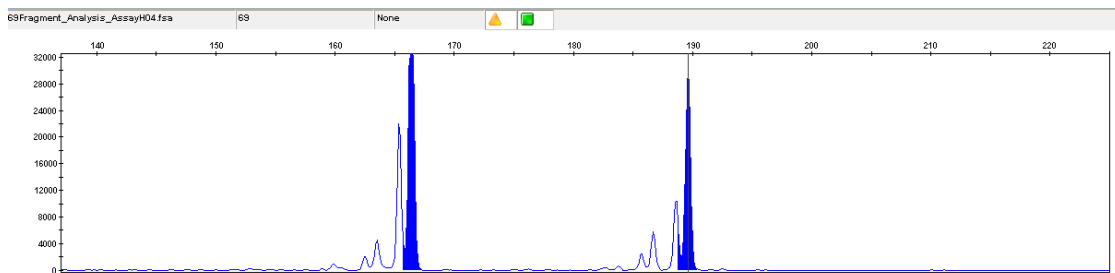
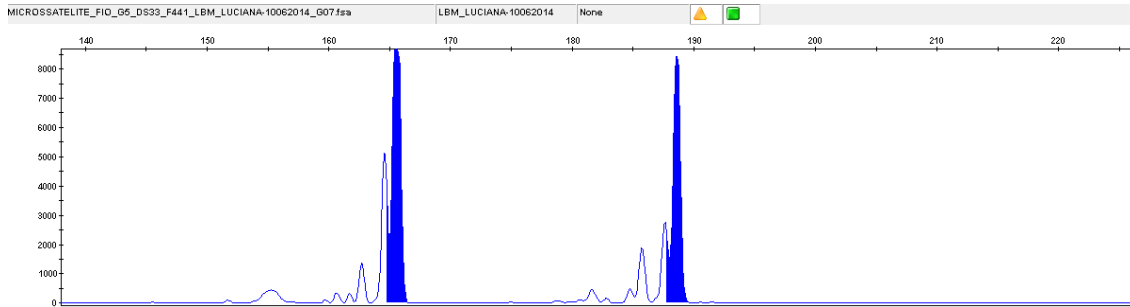


Indivíduo 68

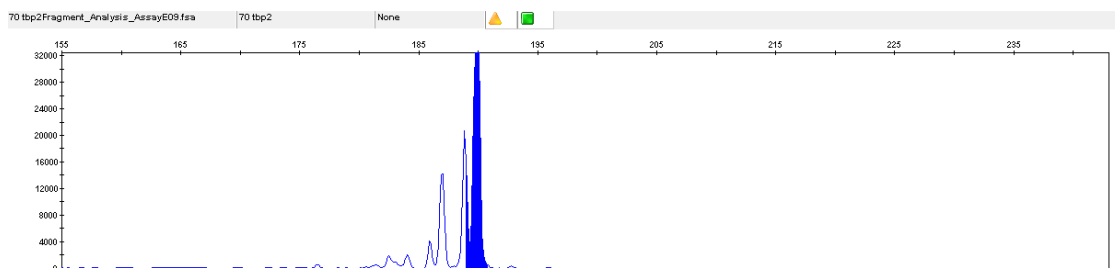
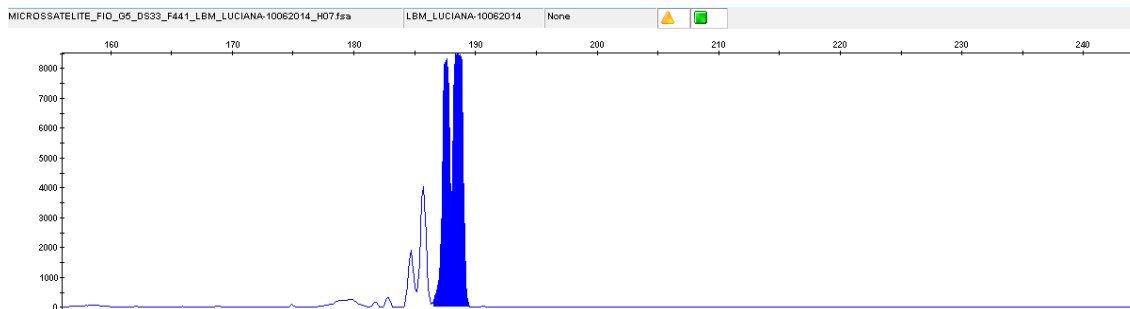




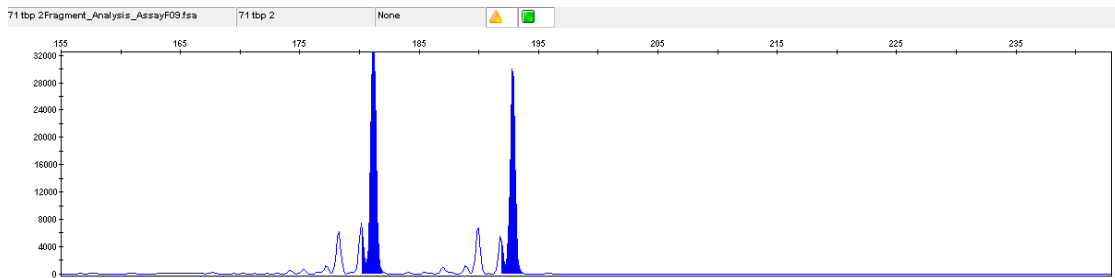
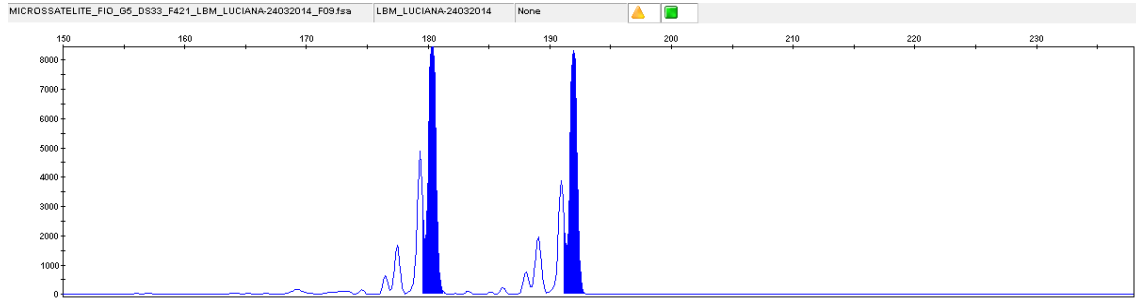
Indivíduo 69



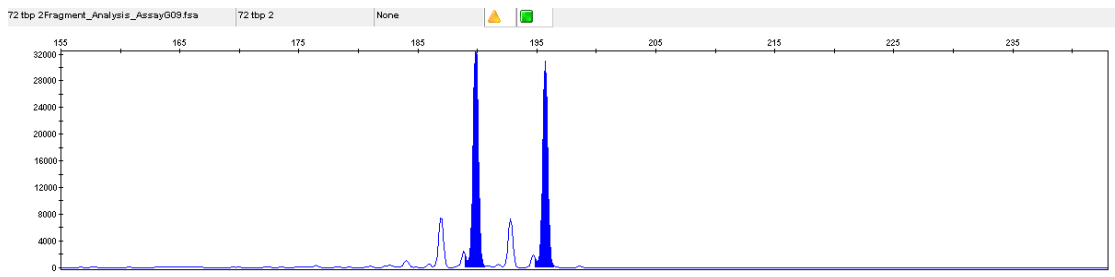
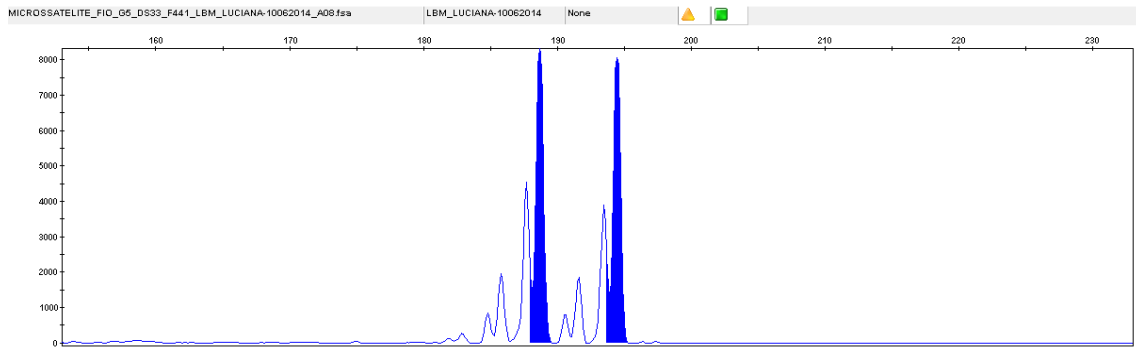
Indivíduo 70



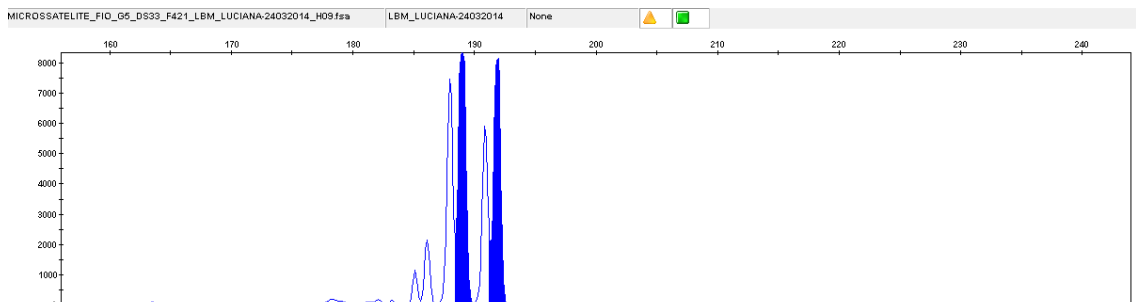
Indivíduo 71

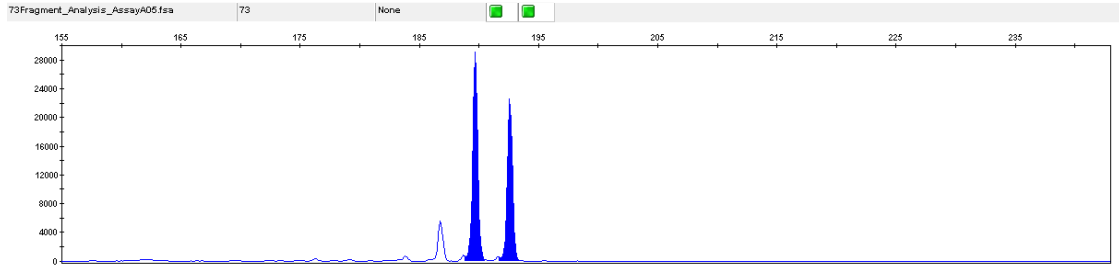


Indivíduo 72

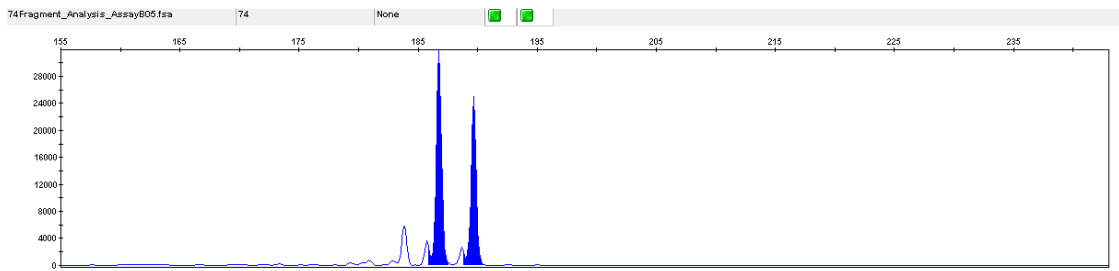
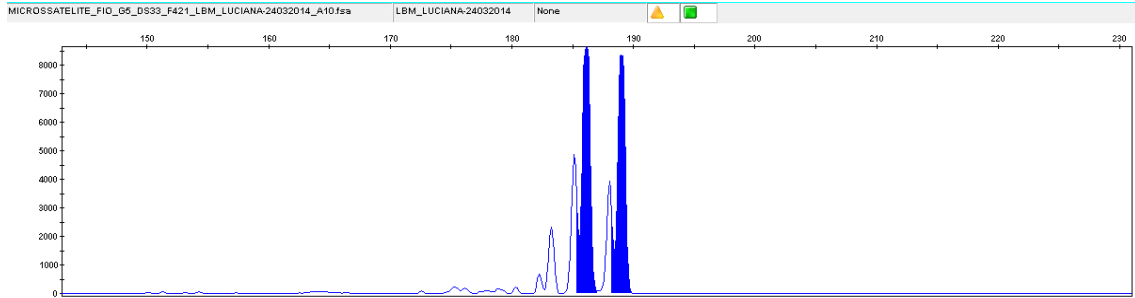


Indivíduo 73

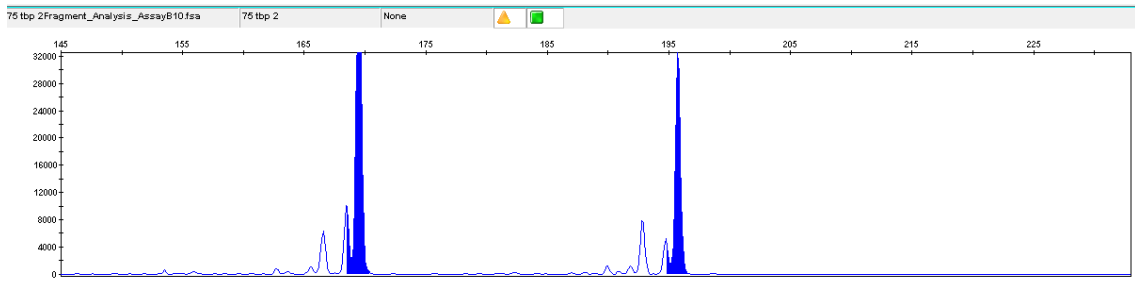
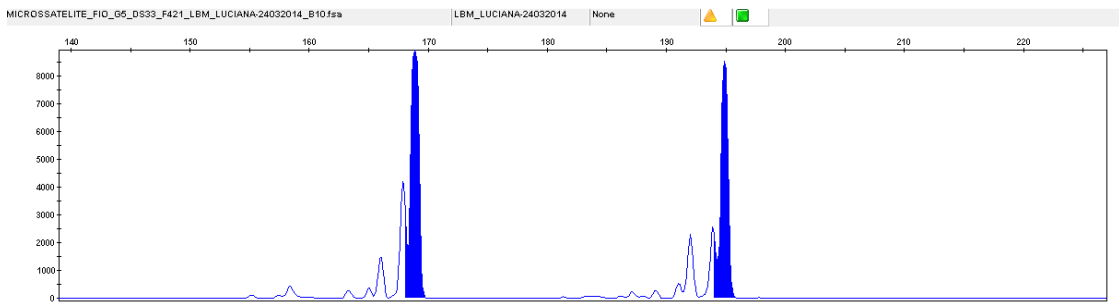




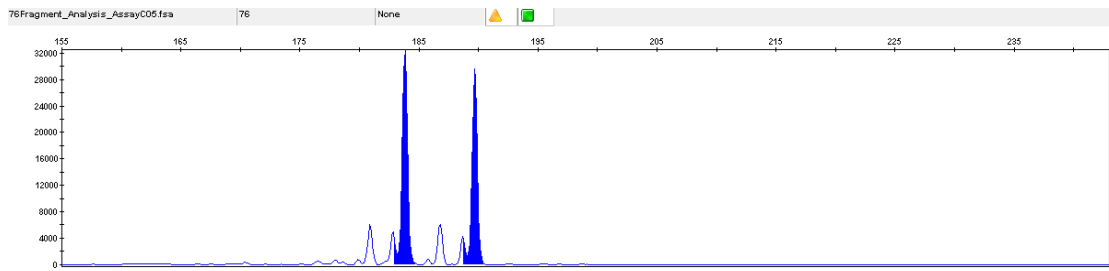
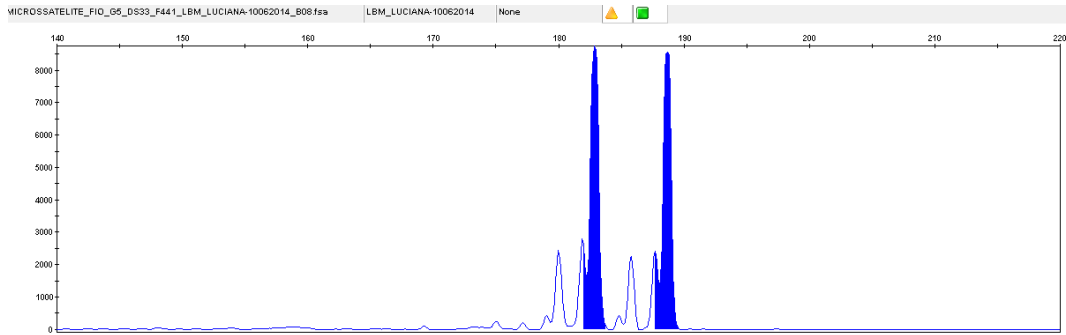
Indivíduo 74



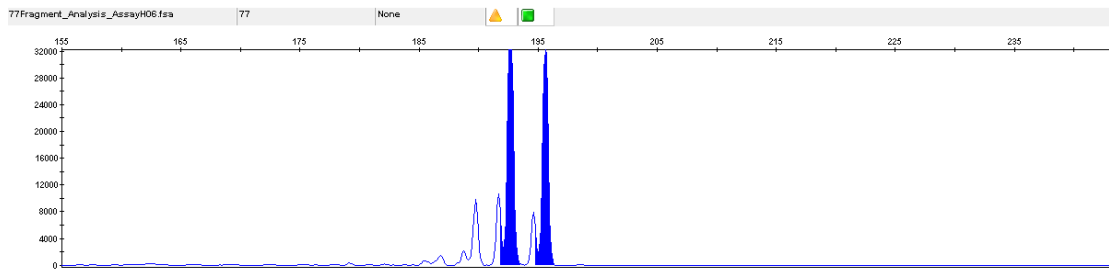
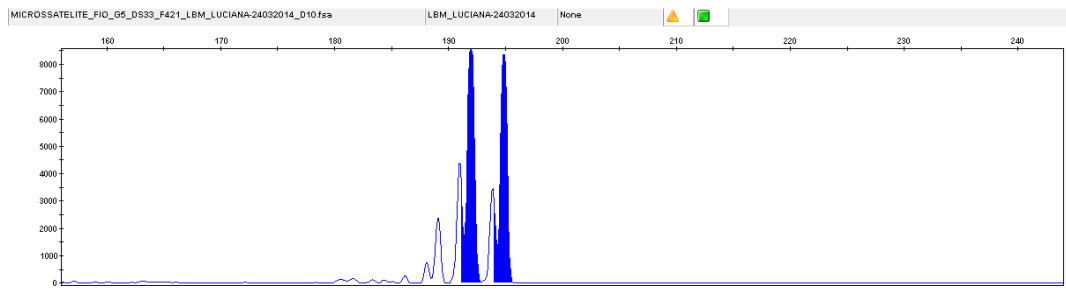
Indivíduo 75



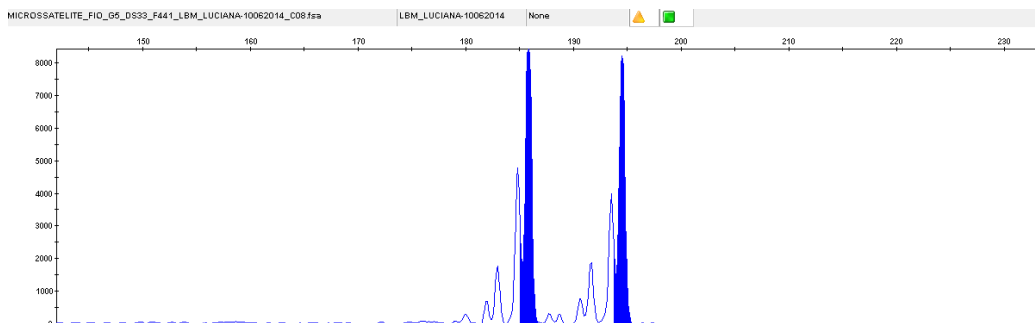
Indivíduo 76

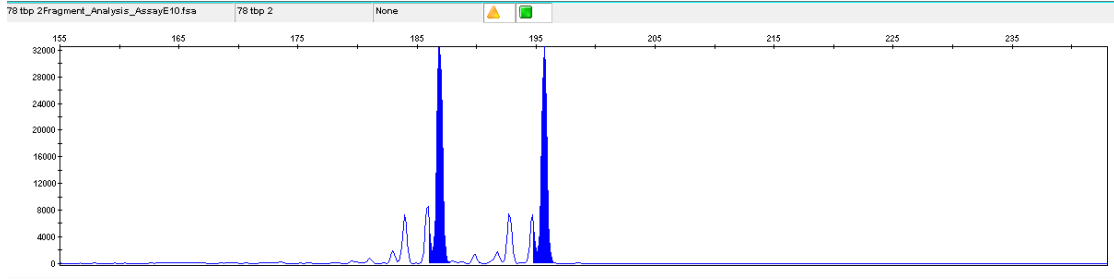


Indivíduo 77

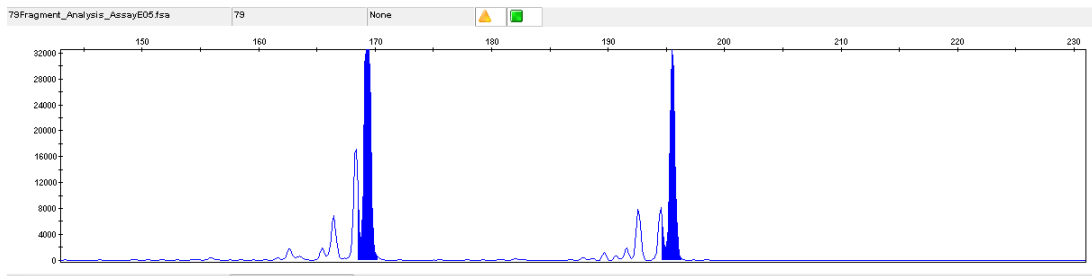
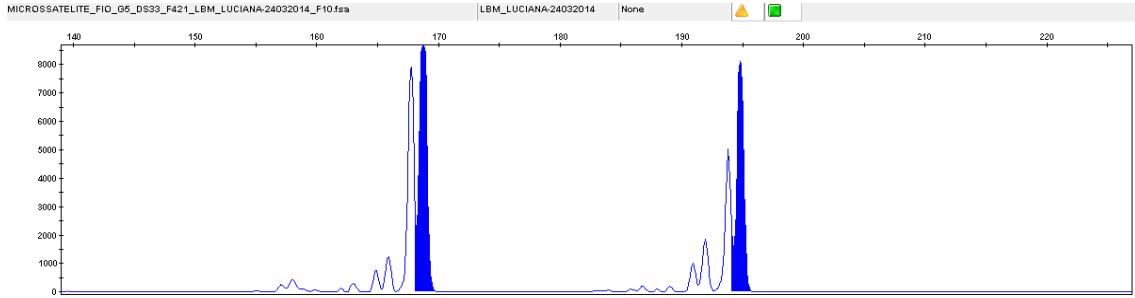


Indivíduo 78

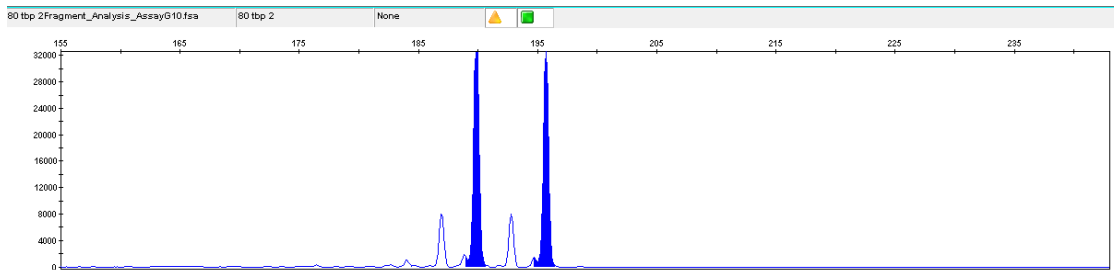
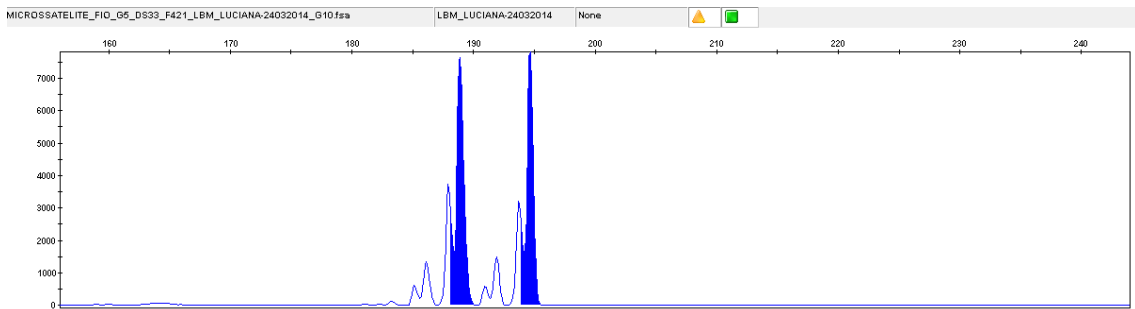




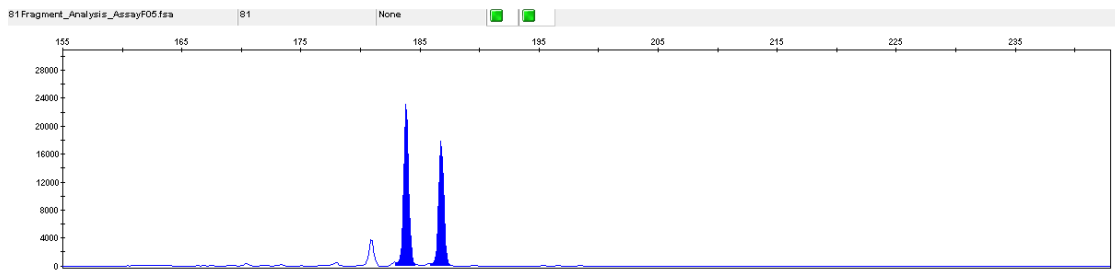
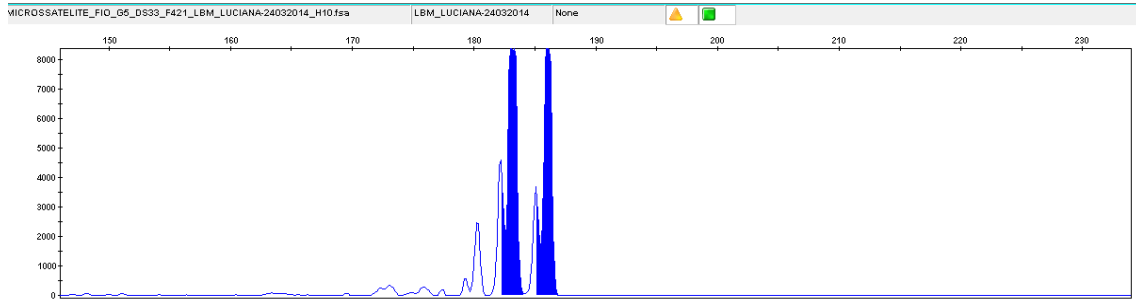
Indivíduo 79



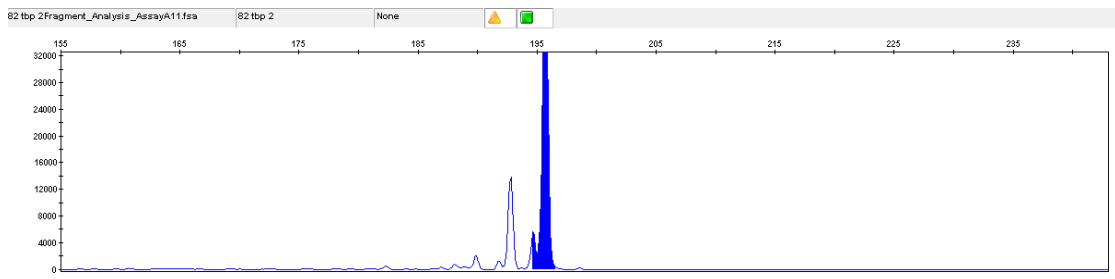
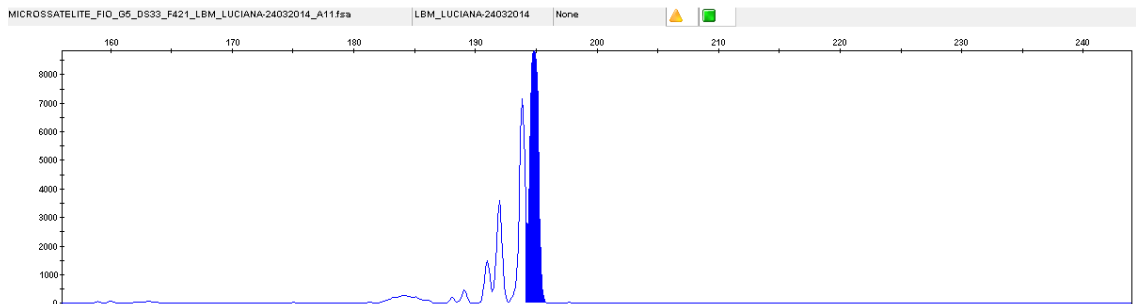
Indivíduo 80



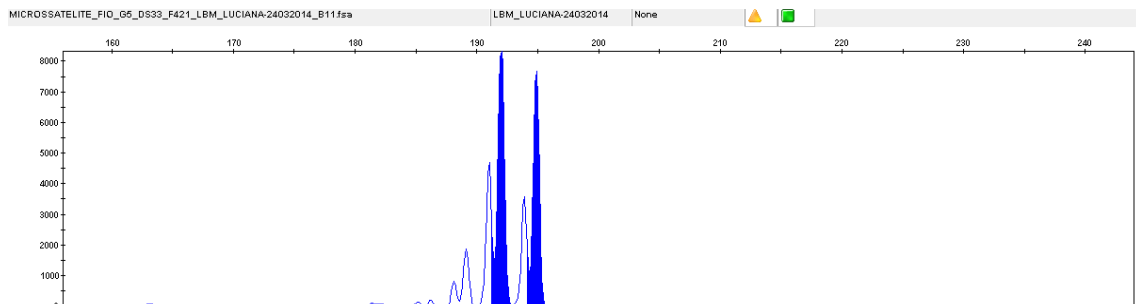
Indivíduo 81

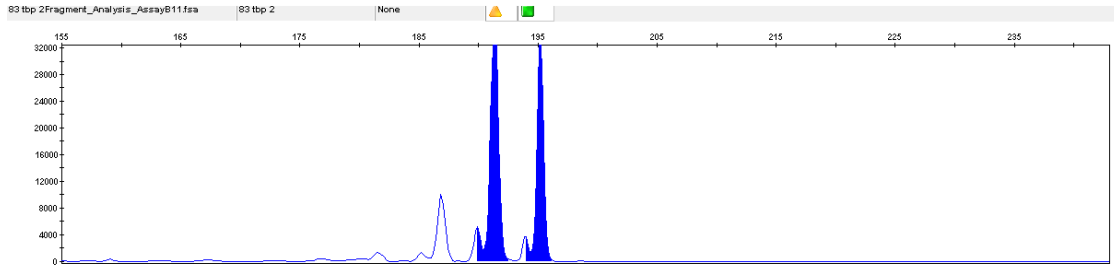


Indivíduo 82

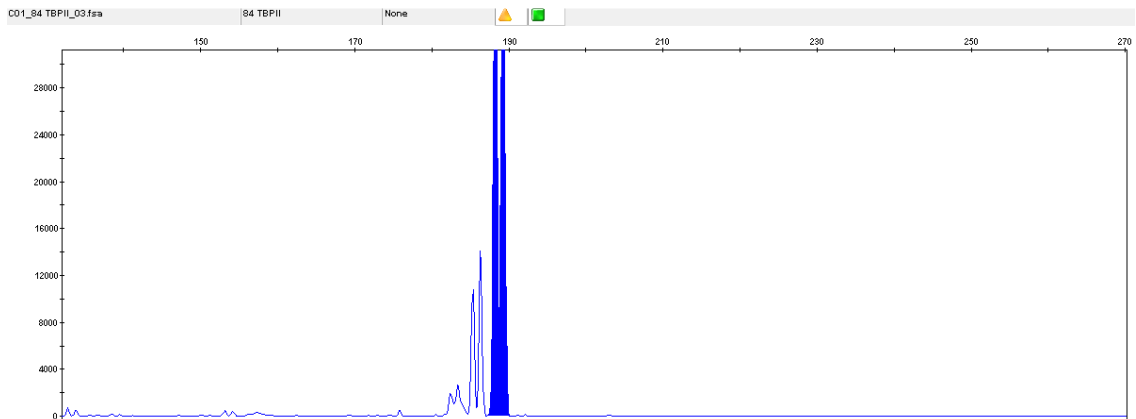
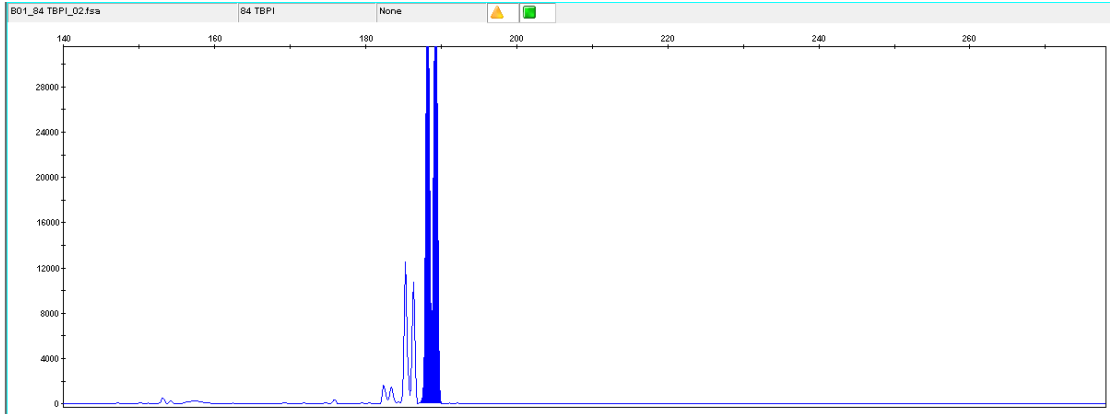


Indivíduo 83

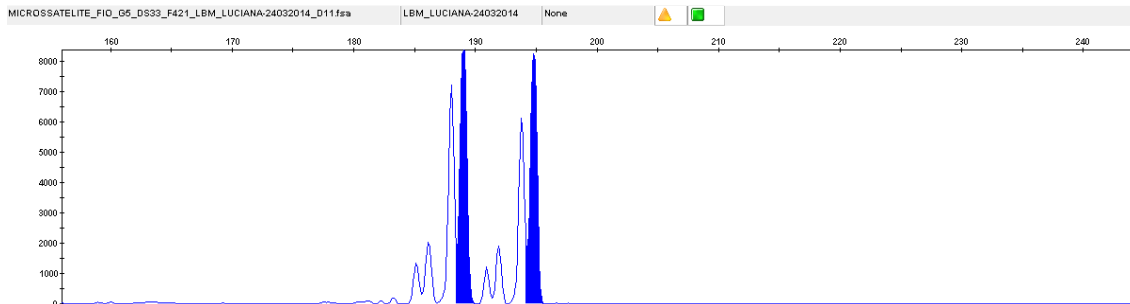


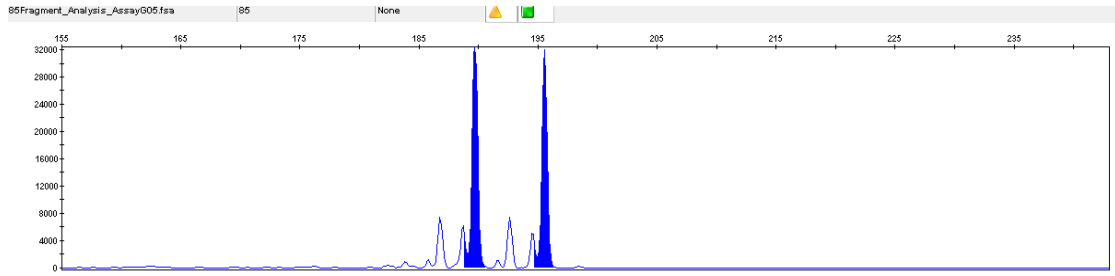


Indivíduo 84

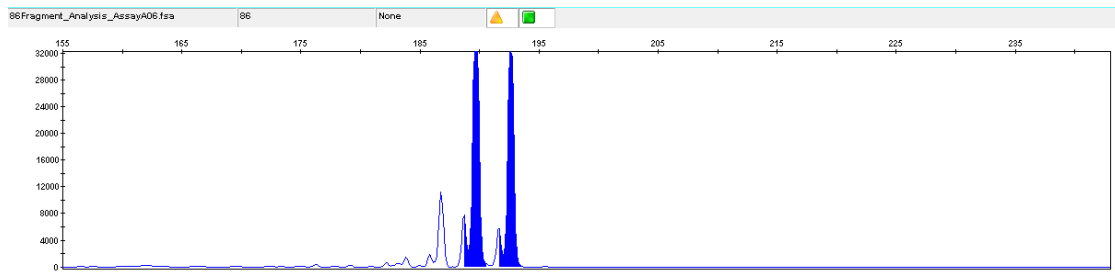
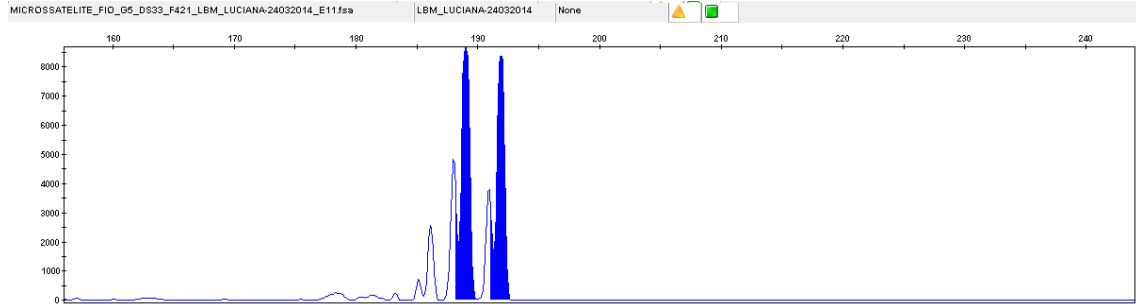


Indivíduo 85

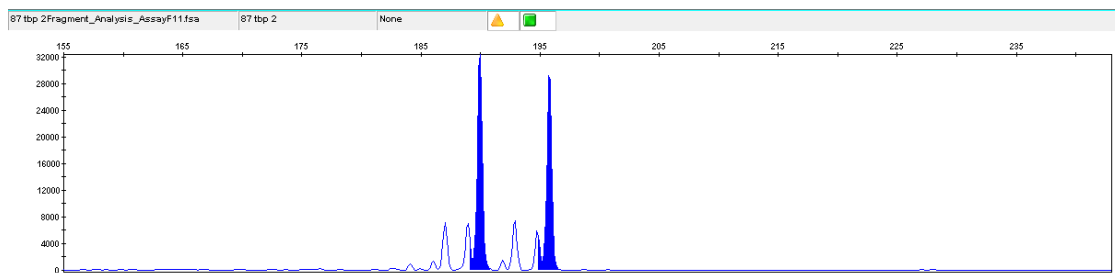
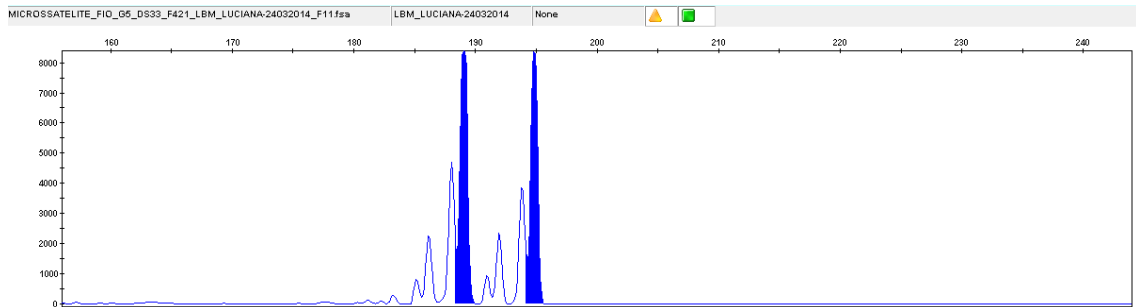




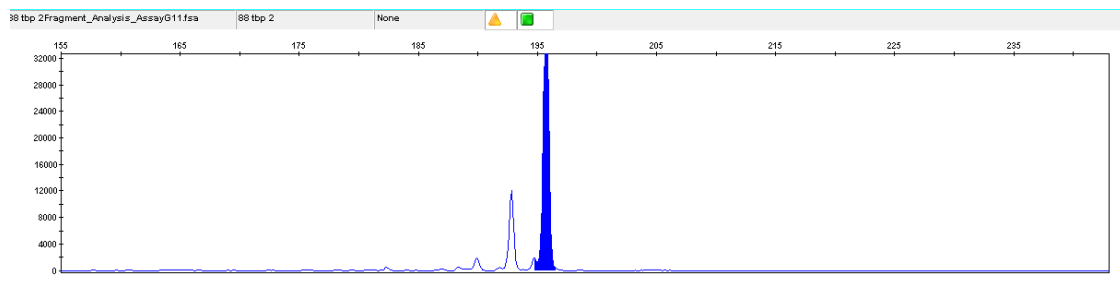
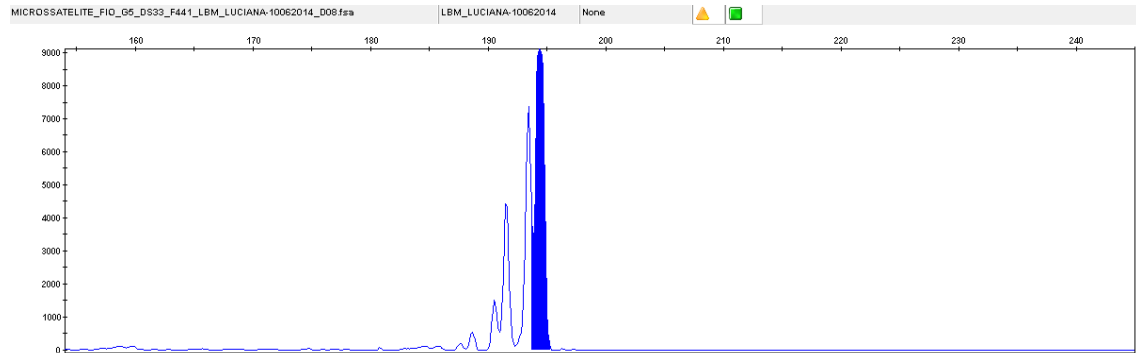
Indivíduo 86



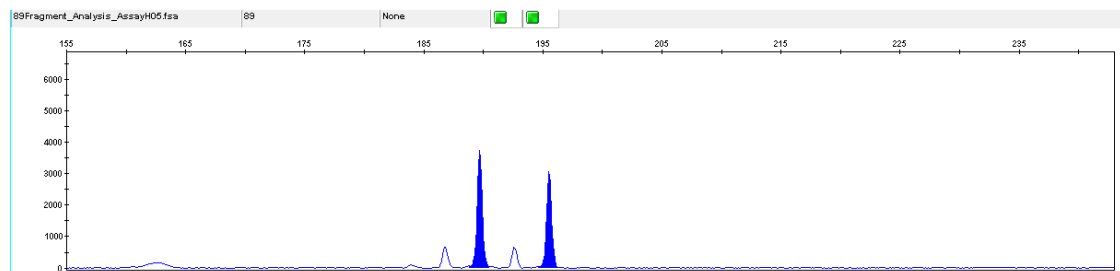
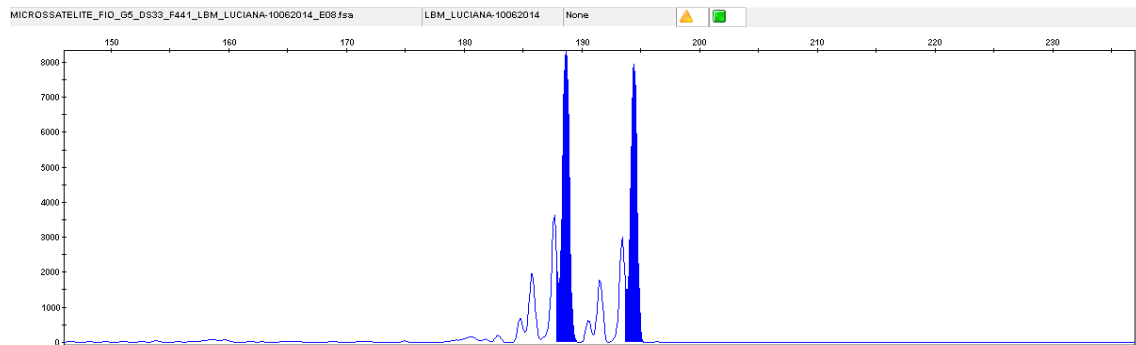
Indivíduo 87



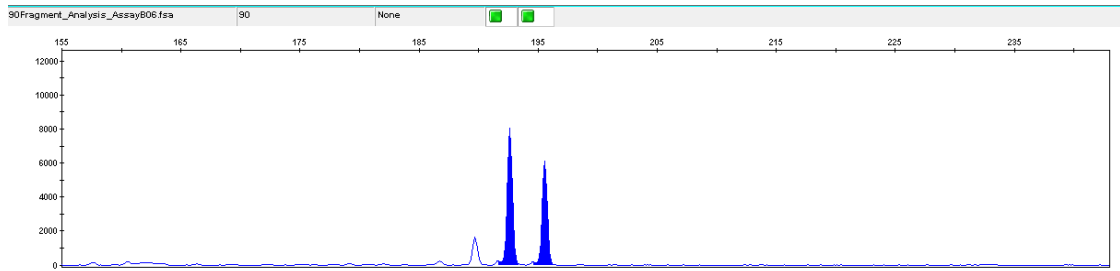
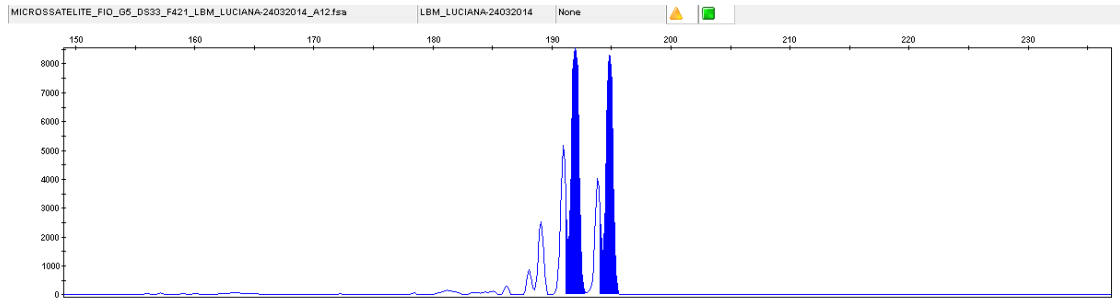
Indivíduo 88



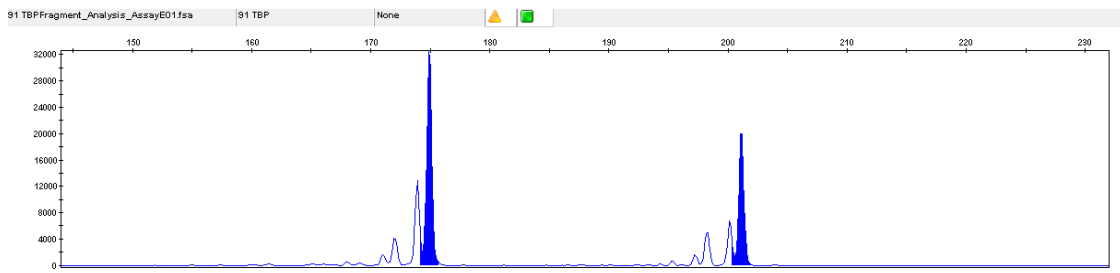
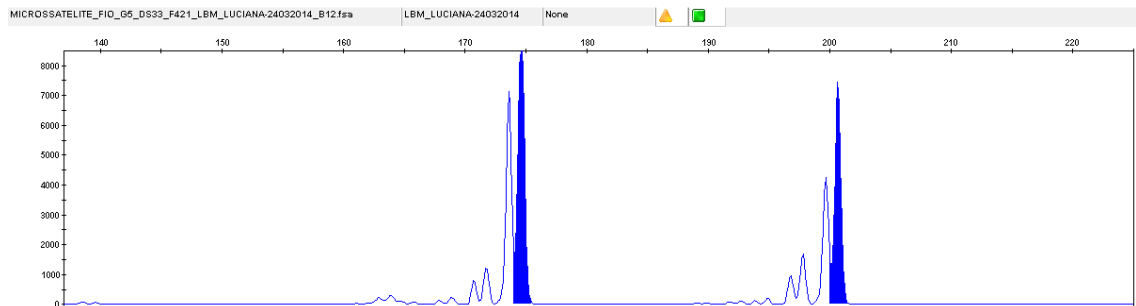
Indivíduo 89



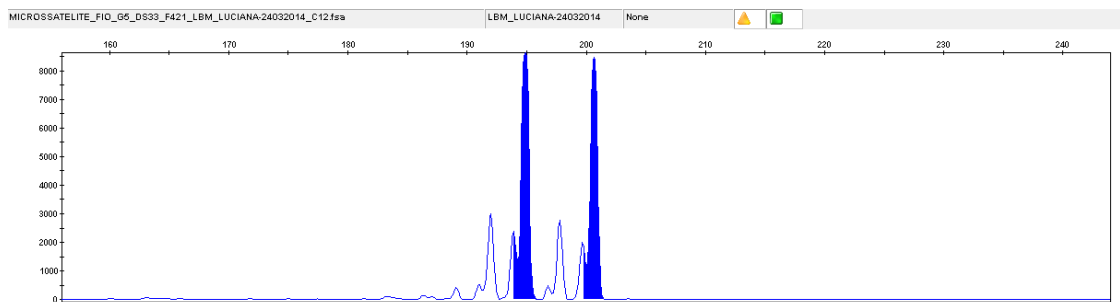
Indivíduo 90

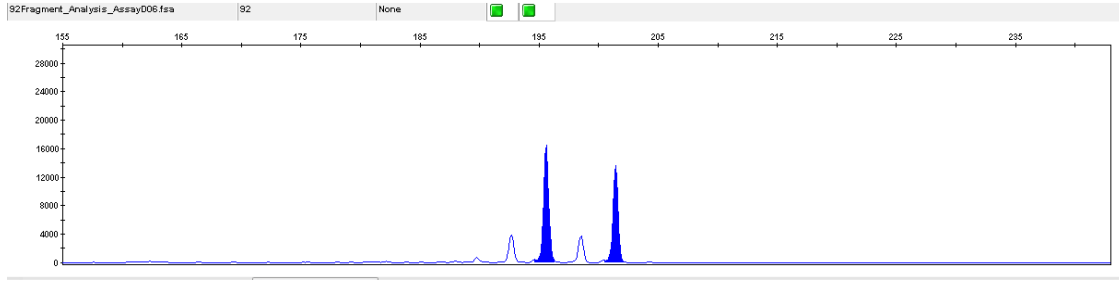


Indivíduo 91

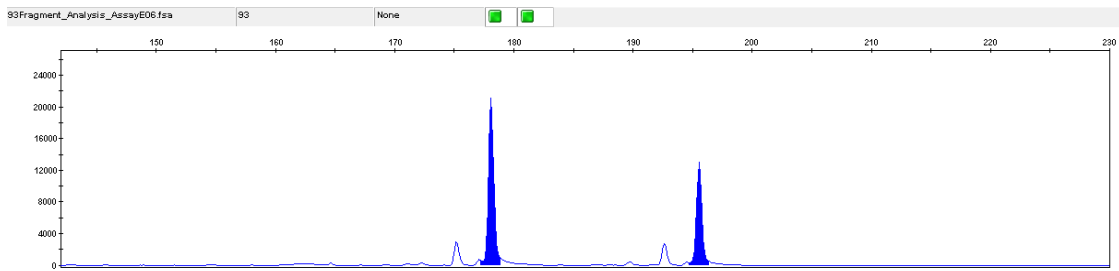
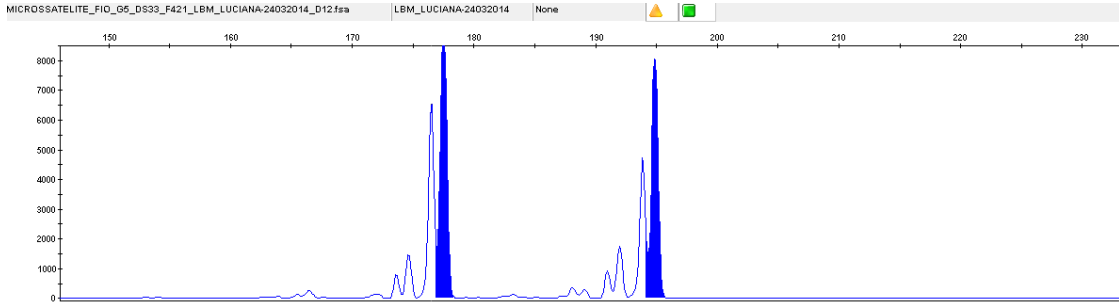


Indivíduo 92

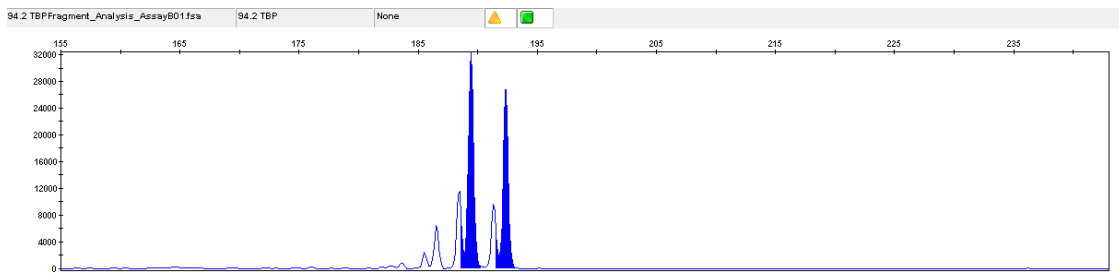
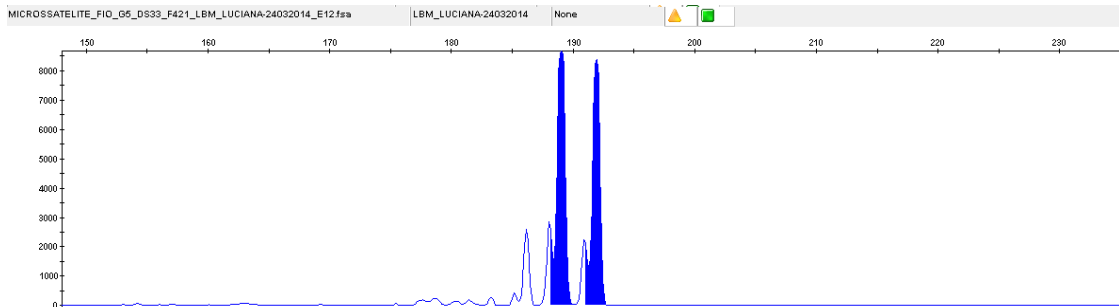




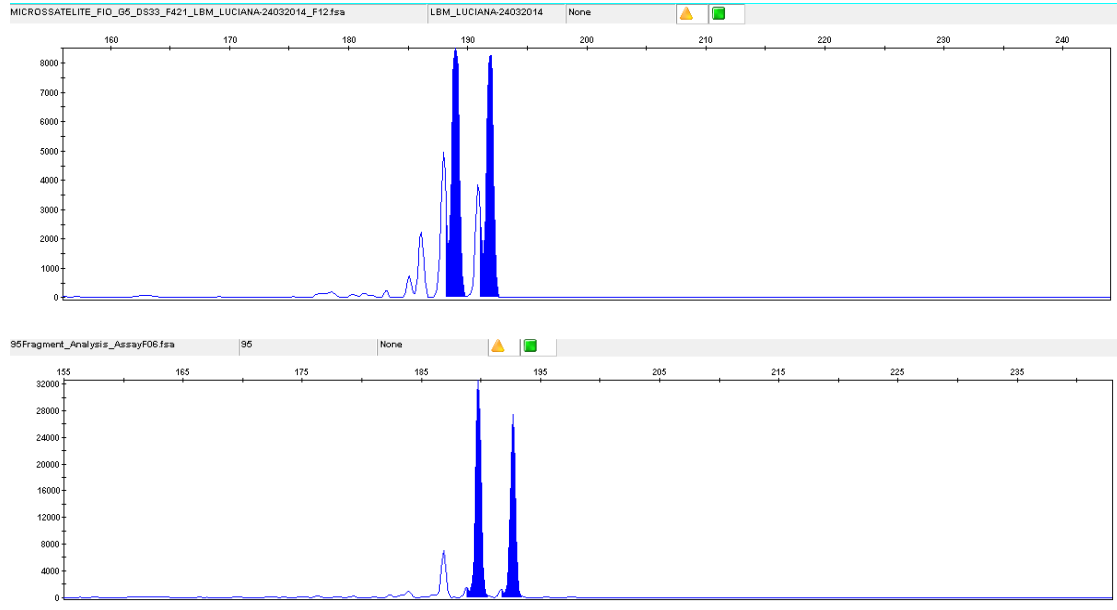
Indivíduo 93



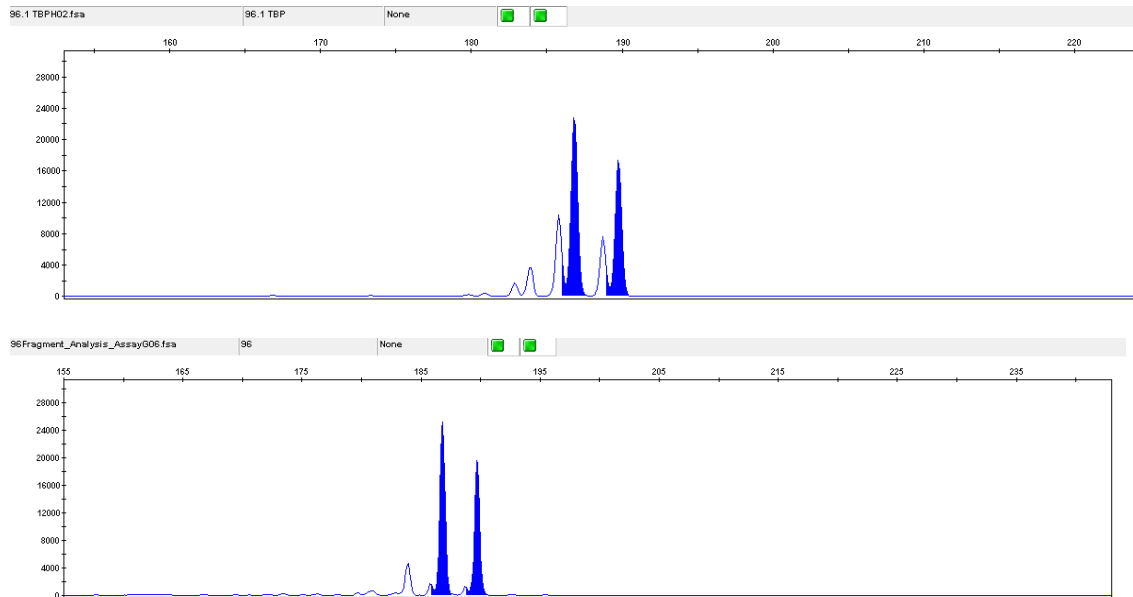
Indivíduo 94



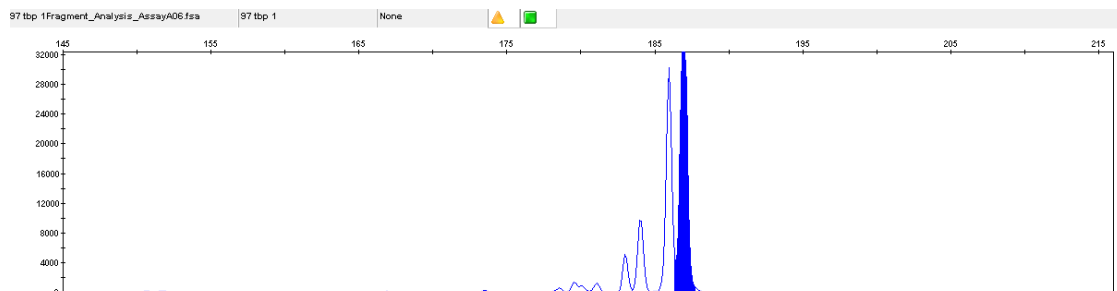
Indivíduo 95

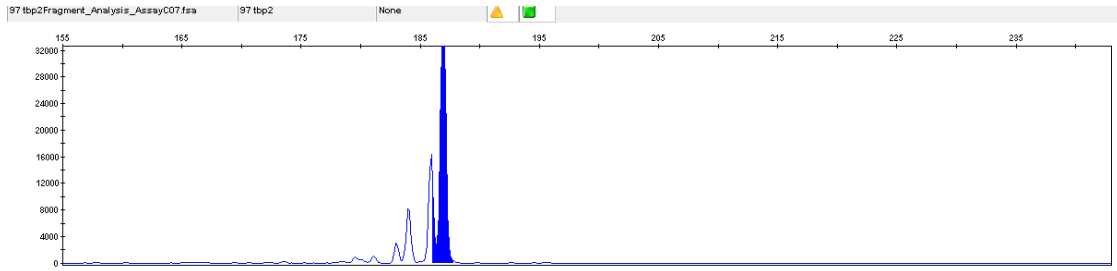


Indivíduo 96

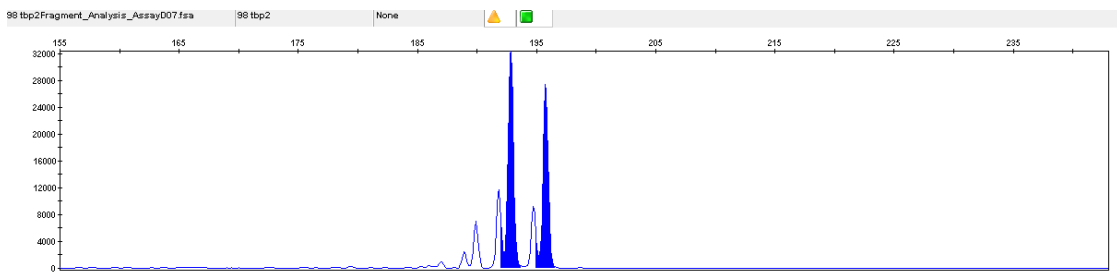
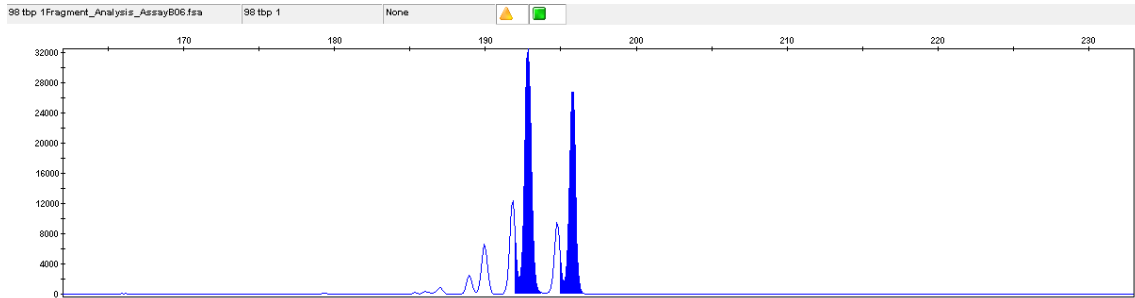


Indivíduo 97

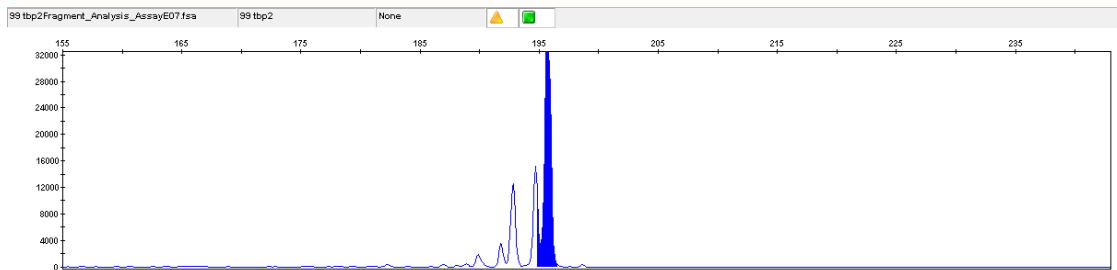
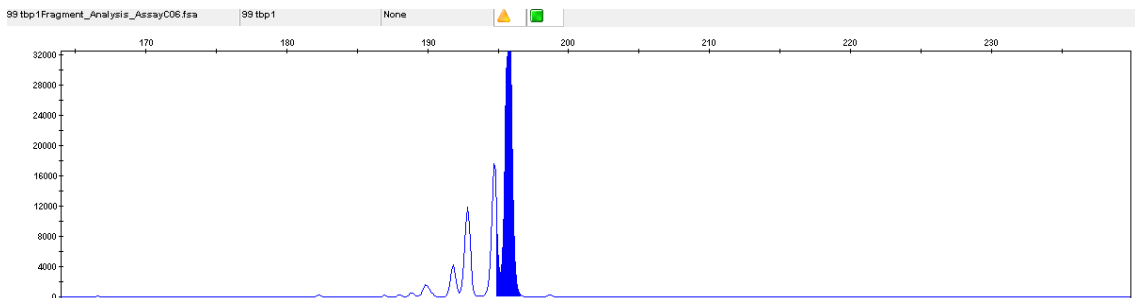




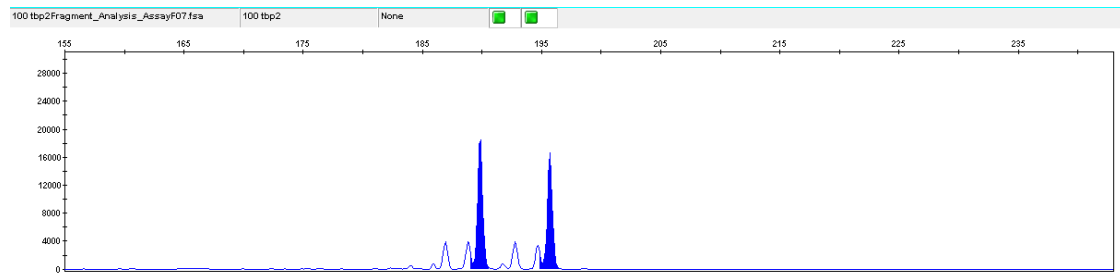
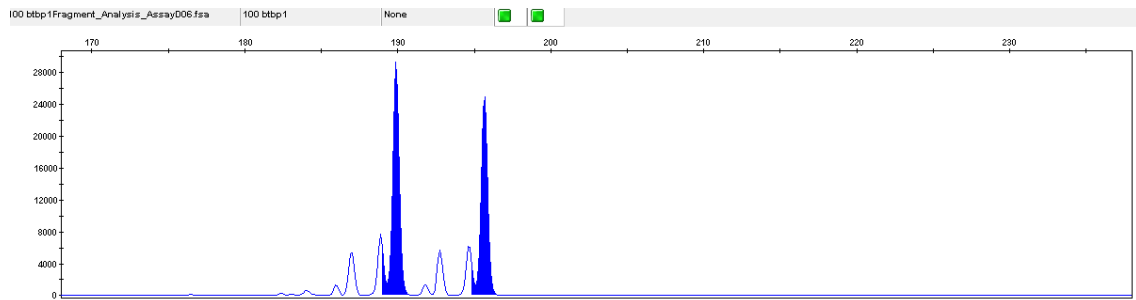
Indivíduo 98



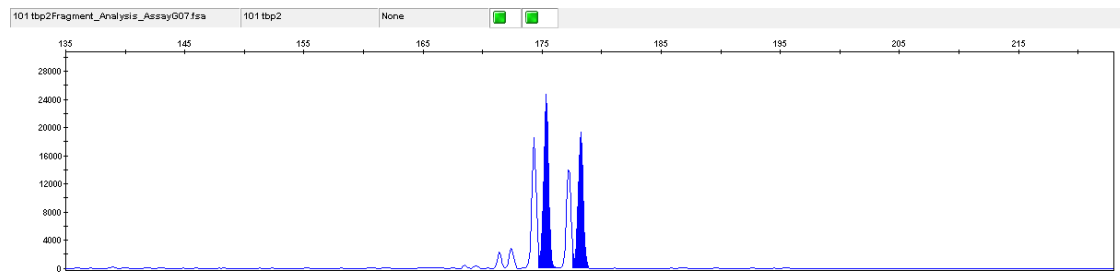
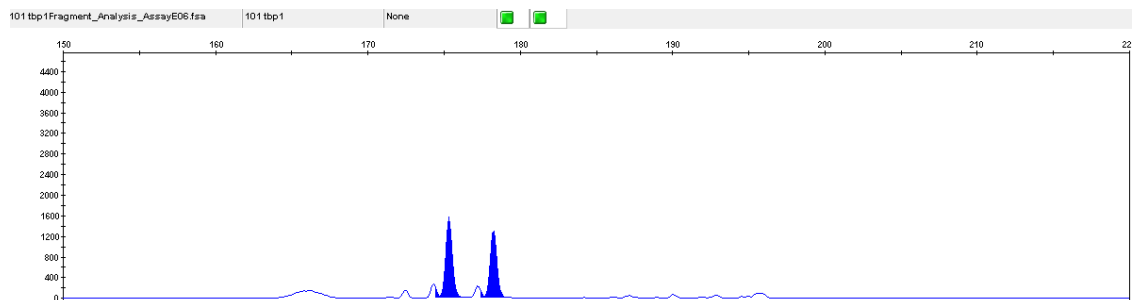
Indivíduo 99



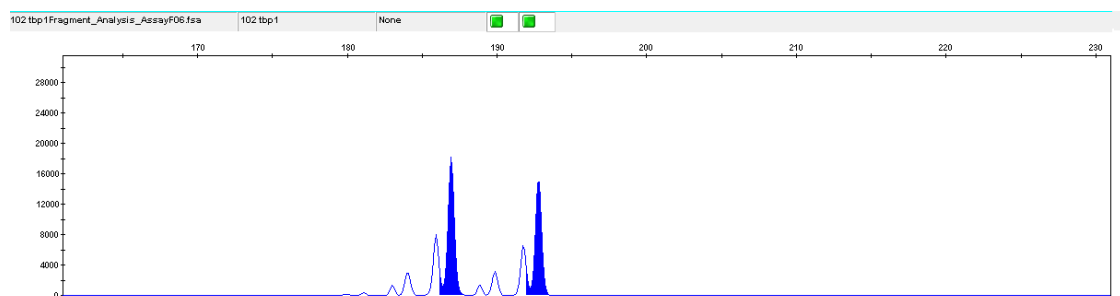
Indivíduo 100

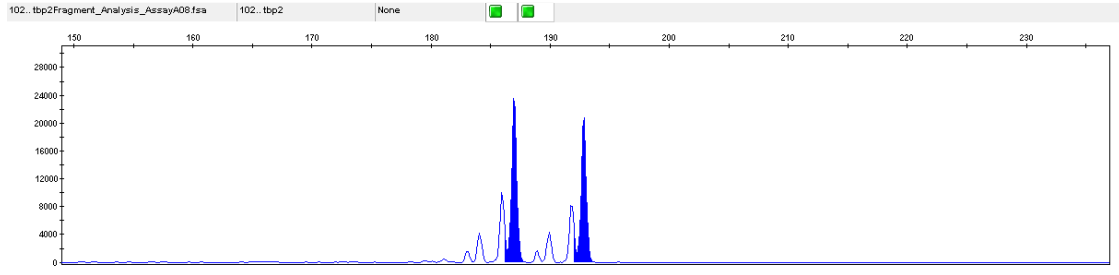


Indivíduo 101

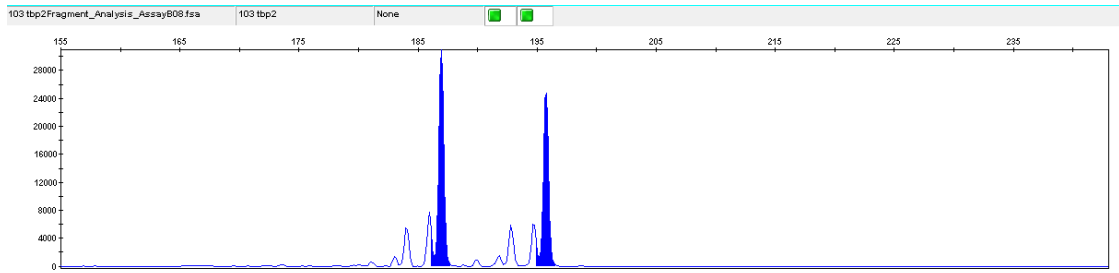
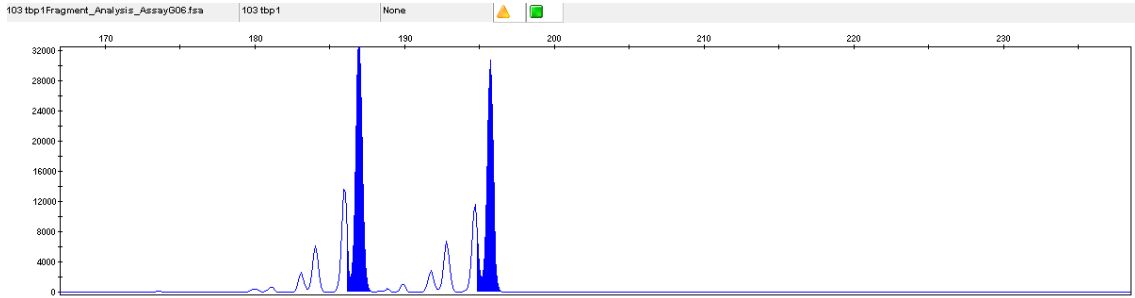


Indivíduo 102

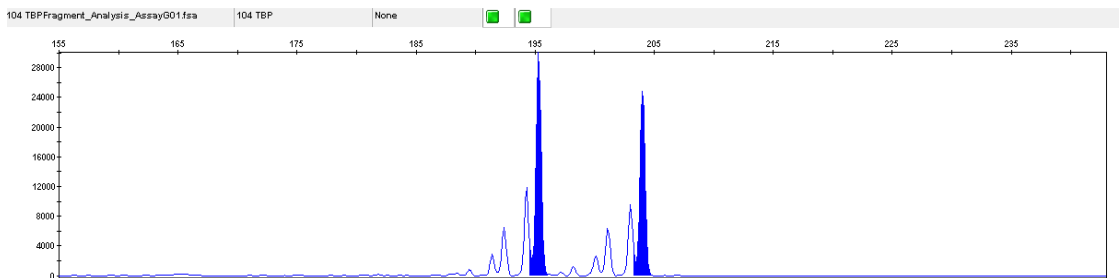
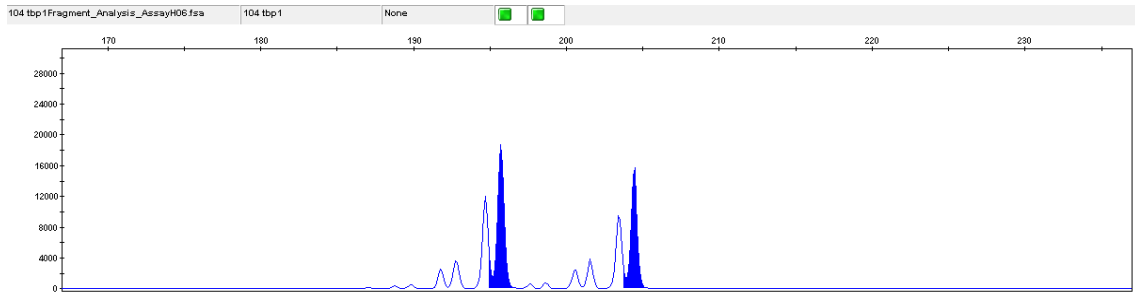




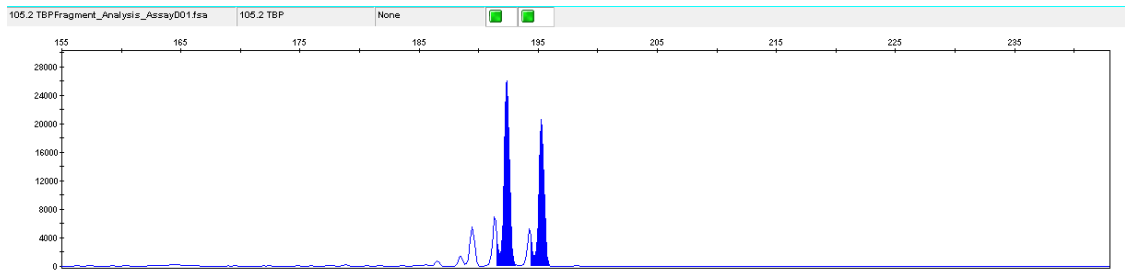
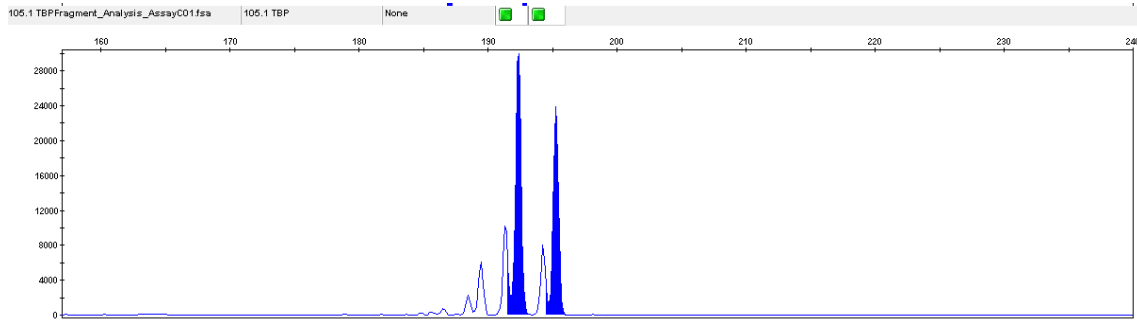
Indivíduo 103



Indivíduo 104



Indivíduo 105



A Study of a Geographical Cluster of Huntington's Disease in a Brazilian Town of Zona da Mata, Minas Gerais State

Luciana de Andrade Agostinho^{a,d} Iane dos Santos da Silva^c Lorena Agostini Maia^d
Mariana de Almeida Azevedo^d Tália Muniz Ribeiro de Oliveira Faria^d
Thays Andrade Apolinario^d Simão Pedro Pereira^d Rafael de Lima Reis^b
Suely Rodrigues dos Santos^{a,c} Carmen Lúcia Antão Paiva^{a,c}

^aUniversidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Post-Graduate Program in Neurology, HUGG, ^bInstituto de Neurologia Deolindo Couto Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, and ^cUniversidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Rio de Janeiro, ^dFaculdade de Minas, FAMINAS, Muriaé, Brazil

Key Words

Huntington's disease · Huntington's disease prevalence · Geographical cluster

Abstract

Background/Aims: Our aim was to investigate a geographical cluster of Huntington's disease (HD) in Ervalia, a Brazilian town of Minas Gerais state (MG). Therefore, we calculated the minimum prevalence of HD in Ervalia, known to have many HD affected families. We also determined the genetic profile of the polymorphic CAG region of the *HTT* gene in 32 subjects of these affected families. **Methods:** A descriptive cross-sectional study was performed, starting in January 2011 until June 2013. Individuals who participated in the survey were all from Ervalia town, MG. **Results:** The minimum prevalence rate found was 7.2/10,000 people, higher than the worldwide prevalence. **Conclusion:** The minimum prevalence of HD in Ervalia was at least 10.3- to 14.4-fold greater than that of the world population, although it does not represent the overall prevalence of the disease in Brazil. Certainly an expanded survey in the country will lead to a lower prevalence estimate than Ervalia's. © 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant, neurodegenerative disease that is caused by expansions of CAG trinucleotide repeats in the *HTT* gene (4p16.3) [1]. Sporadic HD represents 8% of all cases. HD is a rare disorder that affects individuals with ancestral origins and distinct racial groups [2]; despite being found in populations throughout the world, there are significant geographic differences among the prevalence rates [3–5]. There is a remarkable scarcity of information regarding the prevalence of HD in South America's countries, except for Venezuela [6]. In Brazil, the prevalence of HD has not yet been estimated in any of the Brazilian cities. Furthermore, we do not have data on the total number of HD patients in Brazil, because Brazil is a country of continental size and very unequal in terms of health services.

In regards to European immigration, approximately 500,000 Portuguese people arrived in Brazil between 1500 and 1808, when Brazilian ports were legally open to friendly nations [7]. From the mid-19th century, Western Europe, which is regarded as the origin of the founder effect of the HD mutation [8], had great emigration pro-

cesses. From 1872 to 1972, at least 5,350,889 European immigrants came to Brazil (31.06% were Portuguese; 30.32% Italian; 13.38% Spanish; 4.63 Japanese; 4.18% German and 16.42% from other regions) [9].

The history of the Zona da Mata region of Minas Gerais began in the 19th century, with the coffee expansion of Vale do Paraíba, in Rio de Janeiro [10]. As described previously [11], the municipality of Ervalia, situated in the rural area of the Zona da Mata region of Minas Gerais (MG), has a high prevalence of HD although they did not calculate this prevalence. Therefore, the aim of this study was to estimate the minimum prevalence of HD in the population of Ervalia, MG, in 2013, where there is a known geographical cluster of HD, and to determine the genetic profile of the polymorphic CAG region of the *HTT* gene in this population.

Methods

A descriptive cross-sectional study was performed, starting in January 2011 until June 2013. Thirty-two people who were genetically investigated for HD lived in Ervalia town, MG (18,087 inhabitants in 2013, according to IBGE). These individuals were recruited from the outpatient clinic of PAX, a private medical clinic in Ervalia. An informative lecture on HD was presented at the municipality to invite people to participate in this survey. The inclusion criteria were as follows: a clinical condition suggestive of HD or being part of a risk group for HD. A neurologist who was an HD expert participated in the present study. Individuals with foreign citizenship and those who were adopted by the families were excluded. All participating individuals or their legal guardians were invited to fill in and sign an informed consent form. The estimated prevalence of HD in Ervalia was calculated using data obtained from the genetic analysis relative to the number of the CAG repeats in the *HTT* gene and clinical symptoms at the time of the survey. Data, such as gender, the current age of each participant, disease duration through June 1, 2013, age of onset of clinical manifestations, maternal or paternal transmission of the mutated HD allele, and place of birth, were collected using a questionnaire administered to the patients, their caregivers or correlatives. Two patients out of 20 answered the questionnaires by themselves and 18 by their caregivers or correlatives. The information about the age of onset of HD patients reported by the caregivers was concordant with the information related by the patient's correlatives. The other 12 individuals were asymptomatic.

Population data were collected from the Brazilian Institute of Geography and Statistics, IBGE. The pedigrees were constructed using a free version of the GenoPro 2007 program. The project was approved by the ethics committee of FAMINAS, Muriaé, MG, under protocol number 100331/0003, and by the ethics committee of the University Hospital Gaffrée and Guinle of the Federal University of the State of Rio de Janeiro – UNIRIO, under protocol number 03/2009.

The blood sample collection, DNA extraction and the CAG/CCG sizing were performed according to Agostinho et al. [11]. Sizing was also performed by Chris Kay, from Hayden Lab – Hun-

tington Disease Research Group, at the Centre for Molecular Medicine and Therapeutics (University of British Columbia, Vancouver, Canada).

Individuals were classified as affected or normal for HD based on concepts established by the American College of Medical Genetics, the American Society of Human Genetics and the HD Genetic Testing Working Group. The univariate analysis of the data was performed. Mean \pm standard deviation (SD), median and proportions were calculated using the IBM SPSS Statistics software (version 14.0). The correlation between 2 variables was measured by Pearson's *r*.

An Internet search of Brazilian studies about HD was conducted until 2014 using databases related to Health Sciences, such as PubMed/Medline, Scielo and Bireme.

Results

We investigated the population of Ervalia, MG state, Brazil, because it has been known for its geographical cluster of HD. The existence of at least 4 large apparently independent affected families has driven our attention to this town. It is important to mention that other towns near Ervalia (Muriae, Juiz de Fora, and Patrocínio de Muriae) are also known as having many cases of HD; however, their respective prevalence of this disease are not known yet but will be investigated by our group soon. A study of a larger surrounding area and larger population are important because municipality and small towns are subjects to selection effects, and certainly an expanded survey will lead to a lower prevalence estimate than Ervalia's.

There are more than 4 affected families in Ervalia; however, they did not want to participate in this survey for different reasons. If they had been tested, the prevalence could be even higher. Therefore, the estimate prevalence is being called as minimum prevalence. We have not done any molecular study yet to distinguish unrelated disease alleles, although this is a very relevant step to be considered.

Out of 32 individuals from Ervalia, 20 were carriers of the mutated gene responsible for causing HD. These results in combination with the population data from IBGE were used for calculating the minimum prevalence of HD for Ervalia, which was 7.2/10,000 (13/18,087 inhabitants), although this result is not representative of the overall Brazilian HD prevalence. This prevalence value was 14.4 or 10.3 times higher than the estimated prevalence in Caucasian population from Europe and North America, considering respectively 0.5 or 0.7 per 10,000 inhabitants. If affected individuals were considered using only clinical symptoms including those who were not genetically tested, there would be 25 affected individuals, and the preva-

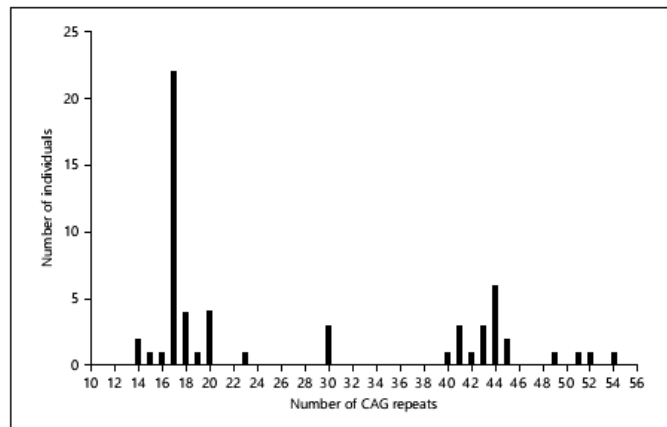


Fig. 1. Number of CAG repeats found in the sample (n = 64 chromosomes).

lence of the disease would increase to 13.82 per 10,000 individuals.

The molecular survey showed that among individuals who were genetically investigated (n = 32), the mean number of CAG repeats was 26.89 (SD \pm 12.71), and the mean current age of the individuals, as of June 1, 2013, was 44.67 years (SD \pm 17.54). Among the individuals bearing expanded alleles (n = 20), the mean age for the onset of the symptoms was 42.67 years (SD \pm 12.78). Among these individuals, 8 were female. The statistical analysis performed between the variables of age of disease onset and the number of expanded alleles showed a strong negative correlation (Pearson (r) = -0.89), with $p < 0.001$. From the 20 subjects with a positive genetic diagnosis of HD, only 7 did not have the symptoms at the time of the survey, which was most likely because they were younger individuals. The number of CAG trinucleotide repeats ranged from 14 to 54 for the 32 subjects studied (fig. 1), including chromosomes with normal alleles and those with expanded alleles. Regarding individuals with 2 normal alleles (n = 10), 3 individuals with normal homozygous alleles were found, and all of those alleles had 17 CAG repeats. The other 7 carriers of 2 normal alleles were heterozygous. The alleles of these individuals ranged from 14 to 24 CAG copies, with a mean value of 18.62 ± 3.8 (median 17). Among the heterozygous individuals carrying mutable normal alleles (n = 3), 1 had alleles with 16 and 30 CAG repeats, 1 had alleles with 18 and 30 CAG repeats, and 1, who was affected, had 30 and 51 CAG repeats. Regarding the expanded alleles for HD (n = 20), the number of CAG repeats ranged from 40 to 54, with a

mean value of 43.52 ± 3.84 (median 44). The 2 carriers of intermediate alleles had no clinical manifestations. Of the 20 subjects with complete penetrance alleles, 7 had not developed the clinical condition, because they were younger than the age of disease onset at the time of data collection. Four independent pedigrees were developed for families with a history of HD and these were confirmed at the molecular level. Only the pedigree of family 1 with 77 individuals is presented here (fig. 2). Individuals were classified as genetically affected (n = 20) and reported as affected (n = 19). A full description of the pedigrees was difficult to achieve because the interviewees did not remember previous generations and deceased relatives with HD. The pedigree of family 2 (not shown) contained 27 individuals, and of the 6 who were genetically tested, 5 were affected. In addition to these 5 genetically proven carriers of expanded alleles, 4 other family members were reported as affected. In an intergenerational analysis of this family, a man with 42 CAG repeats passed the expanded allele on all children with a variation of 1-3 CAG units.

The pedigree of family 3 (not shown) contained 25 individuals. Seven of them were genetically tested and 4 were diagnosed as affected. In addition to these individuals, 4 other individuals were reported as affected. In this family, there were 2 asymptomatic individuals with intermediate alleles (30 CAG repeats) and 1 individual had developed juvenile HD (Westphal variable) with 52 CAG repeats. In the same family, an affected woman carrying a mutated allele with 51 CAG repeats passed the expanded allele on to 2 children, 1 with 49 CAG repeats and the

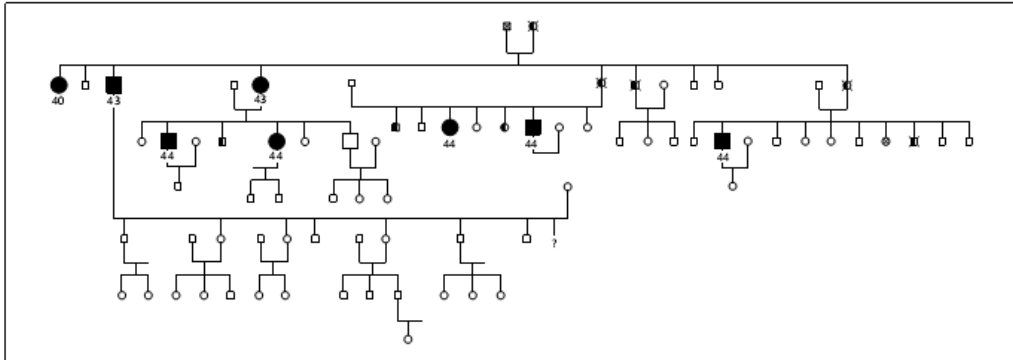


Fig. 2. Pedigree of family 1, with 77 individuals. Filled symbols represent affected individuals (genetically tested), half-filled symbols represent individuals reported as affected, and the numbers

below the symbols represent the number of CAG repeats in each expanded allele. Deceased individuals are marked with an X above the symbol.

other 1 with 54. Interestingly, this woman was a carrier of an allele with 30 repeats that was inherited from her father. The father's family had no reported history of HD; however, he was a carrier of an intermediate allele.

The pedigree of family 4 (not shown) contained 43 individuals. Three were genetically tested, and all of them were diagnosed as affected. In addition to these individuals, 3 individuals who had already died were reported as affected. One individual from the third generation, who carried an allele with 41 CAG repeats, was not included in the prevalence calculation because he had not been living in Ervalia, MG. In this intergenerational analysis, the father passed the allele with 41 CAG repeats on to his son. The frequency of intermediate alleles in the studied sample ($n = 32$) was 9.38%.

Discussion

According to reports from the population who participated in the present study, most of the affected families owned large rural properties in the region, causing individuals from several generations to stay in the town to manage their family businesses; even many children who had left Ervalia to study returned home to manage their farms. Moreover, it is interesting to note that many women that are affected with HD, who had previously left Ervalia, while asymptomatic, were returned by their spouses to their families as soon as they began showing HD symptoms.

Considering the genetic aspects, the above results of mean and median values of CAG repeats are in accordance with Lee et al. [12] and Raskin et al. [13].

The prevalence of HD in the population is also influenced by the number of de novo mutations as well as by the CAG-expanded chromosomes that are not transmitted to the next generation due to genetic anticipation (juvenile HD) [14].

Recent estimates suggest that the rate of de novo mutations in families with no history of the disease, when compared to other de novo mutations, is 10% or greater [15, 16]. Warby et al. [17] suggested that de novo mutations for HD do not occur randomly in any chromosome 4 and that there is a genetic predisposition for the occurrence of the mutation that increases the likelihood of the expansion of CAG repeats in a population.

The emergence of de novo mutations occurs at the same rate in intermediate alleles (from 27 to 35 CAG repeats) as in expanded alleles. According to the study by Warby et al. [18], both allelic categories have the same genetic predisposing factors that lead to extra expansion of CAG repeats.

The intermediate alleles are relatively common in the normal population, with an estimated frequency of 1.0–3.9%. In a Brazilian study, the frequency of intermediate alleles in the HD sample studied was 9.1% (8/88) [13], similarly to this study (9.4%).

Regarding intergenerational transmission, a study observed that, in 70% of maternal transmission cases, the number of CAG repeats varied with an average value of

Table 1. Overview of studies on HD in Brazil

| Author, year | Brazilian place of study | Patients' place of birth | Setting | Study design/period of study | Sample characteristics | Diagnostic criteria | Prevalence | Comments |
|--------------------------------|--------------------------|--|------------|--|--|----------------------|------------|---|
| Mendes et al., 1996 [34] | São Paulo | NA | Hospital | Experimental (retrospective study)/1982–1992 | 119 patients with chorea (22 with HD) | Clinical | NA | Etiologies of chorea |
| Raskin et al., 2000 [13] | São Paulo | 60% were born in Paraná, 14% in the state of Minas Gerais, 8% in the state of Rio de Janeiro and Bahia, 4% in the state of São Paulo, and 2% in the states of Espírito Santo, Santa Catarina and Rio Grande do Sul | Hospital | Experimental (case control study)/not reported | 84 HD-affected individuals and 92 healthy controls | Clinical and genetic | NA | Molecular analysis of CAG region in Caucasian and African-Brazilian samples |
| Lima e Silva et al., 2000 [35] | São Paulo | NA | Hospital | Experimental (case control study)/not reported | 44 HD-affected individuals and 25 healthy controls | Clinical and genetic | NA | Molecular analysis of CAG region |
| Alencar et al., 2010 [36] | Alagoas | Feira Grande (Alagoas) | Population | Experimental (series of Brazilian families)/not reported | 22 HD-affected individuals | Clinical | 1/1,000 | Large number of consanguineous marriages in a small population |
| Agostinho et al., 2012 [11] | Rio de Janeiro | 11.5% were born in Espírito Santo, 39.3% in the state of Minas Gerais, 45.9% in the state of Rio de Janeiro and 3.3% in the state of São Paulo | Hospital | Experimental (Cross-sectional)/2009–2011 | 46 HD-affected individuals | Genetic | NA | Molecular analysis of CAG and CCG polymorphic regions |
| Agostinho et al., 2013 [37] | Rio de Janeiro | Venezuela, Turkey, Croatia, China, Germany, Italy, Taiwan, Spain, Crete, India, Russia, Brazil, the United States and the Netherlands | NA | Systematic review/2000/2012 | 2381 HD individuals reported | Clinical and genetic | NA | Out of 41 articles, 17 were chosen because they reported detailed molecular investigations of HD, intergenerational analysis of expanded alleles in different regions of the world, and atypical cases of the disease |
| Castilhos et al., 2014 [38] | Rio Grande do Sul | NA | Hospital | Experimental (Cross-sectional)/2009–2011 | 104 families with an HDL phenotype: 93 HD, 4 HDL2 and 1 SCA2; 6 families without a molecular diagnosis | Clinical and genetic | NA | Patients with HD-like disorders HDL1, HDL2, SCA2, SC.A17, DRPLA, benign hereditary chorea, neuroferritinopathy and chorea-acanthocytosis, in a series of Brazilian families |

NA = Not available.

+0.40 CAG repetitions for maternal transmission and +3.86 CAG repetitions for paternal transmission [19]. The instability of the CAG polymorphic region, which is responsible for causing HD, is believed to be influenced by several factors in addition to the actual size of the CAG expansion, such as the gender and age of the affected patients that transmit the mutated allele [20], environmental factors [21], other genetic factors, such as cis-elements and trans-factors, and the machinery of DNA repair [22, 23].

Other studies have investigated the source of HD by constructing haplotypes related to the *HTT* gene region in specific ethnic populations [11, 17–19, 24–26]. Some of these studies have reported a positive correlation between specific markers on the *HTT* gene and HD and have concluded that the mutation responsible for causing this disease appeared de novo in several individuals from independent families in Western Europe, not from a single founder [4, 27, 28].

The black African population is historically known to have a low prevalence of HD; however, according to Magazi et al. [29], the prevalence in Southern Africa may be greater than expected. It is worth mentioning that the age of onset of the disease is inversely correlated to the number of expanded CAG repeats in a fully dominant way [12] and that sub-Saharan Africa countries are experiencing an increase of age-related conditions, such as neurodegenerative diseases, as a result of rapid transitions with increased life expectancy [30]. As described previously [31], the prevalence of HD in the population that lives around the Maracaibo Lake (Venezuela) is the highest in the world, 699.3 per 100,000.

All individuals who participated in the present study bear a CCG allele (*HTT* gene) with 7 repeats according to Agostinho et al. [11]. In Western Europe, the allele (CCG)₇ is the most frequent, similarly to previous findings [11].

It is important to mention that the minimum prevalence rate found in the present study was higher (7.2 per 10,000 people) than the worldwide prevalence, which is estimated to be 0.27 per 10,000 people (95% CI 1.55–4.72) [32]. A meta-analysis showed that the incidence rate of HD is 0.38 per 100,000 people per year (95% CI 0.16–0.94) [32].

We found only 7 scientific articles published from 1996–2014 about HD in Brazil (table 1). Therefore, there is sparse literature data about HD in Brazil, and it is worse about HD in MG state, where Ervalia is located.

Brazil had the sixth highest population of Italian European immigrants between 1870 and 1970. The Italian emigration to Brazil included people from different regions of Italy that settled in MG state. Italian im-

migrants were concentrated in only 3 specific regions of MG: Belo Horizonte, Southern MG, and the Zona da Mata region where Ervalia is located. In this region there were concentrated coffee plantations. When analyzing the immigrants who arrived at the Zona da Mata region, it was found that they came from 14 different regions of Italy. This immigration movement, with the resulting formation of the ethnic population of Ervalia, may be one of the causes that led the municipality to present a high prevalence of HD [33]. The return of affected individuals (who left the town to marry, to study, or to work) to run their family farms or because their spouses did not accept the disease may also have contributed to the high prevalence of HD estimated for Ervalia, MG.

We concluded that the minimum prevalence of HD in Ervalia was at least 14.4- to 10.3-fold greater than that of the world population; however, further studies should be conducted to investigate the epidemiology of HD in other regions of Brazil, as well as tracing the origin of the *HTT* gene in different Brazilian regions.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES/PROAP and FAPERJ. Many thanks are due to Prof. T. Quirico-Santos (UFF) for referring Ervalia as a geographical cluster of HD. We are very grateful to Chris Kay, from Hayden Lab – Huntington Disease Research Group, at the Centre for Molecular Medicine and Therapeutics (UBC), Vancouver, Canada, for sizing the polymorphic regions of *HTT* gene of our samples.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993;72:971–983.
- 2 Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, et al: A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 1994;330:1401–1406.
- 3 Al-Jader LN, Harper PS, Krawczak M, Palmer SR: The frequency of inherited disorders database: prevalence of Huntington disease. *Community Genet* 2001;4:148–157.

- 4 Andrew SE, Hayden MR: Origins and evolution of Huntington disease chromosomes. *Neurodegeneration* 1995;4:239-244.
- 5 Harper PS: The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 1992;89:365-376.
- 6 Paradisi I, Hernandez A, Arias S: Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet* 2008;53:127-135.
- 7 Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística: Brasil: 500 anos de Povoamento. Apêndice: Estatísticas de Povoamento, Rio de Janeiro, 2000, p 225.
- 8 Garcia-Planells J, Burguera JA, Solis P, Millan JM, Ginestar D, Palau F, Espinos C: Ancient origin of the CAG expansion causing Huntington disease in a Spanish population. *Hum Mutat* 2005;25:453-459.
- 9 Levy MS: [The role of international migration on the evolution of the Brazilian population (1872 to 1972)]. *Rev Saude Publica* 1974;(suppl):49-90.
- 10 Lamas FG: Povoamento E Colonização da Zona da Mata Mineira no Século XVIII, 2006.
- 11 Agostinho Lde A, Rocha CF, Medina-Acosta E, Barboza HN, da Silva AF, Pereira SP, da Silva Idos S, Paradelo ER, Figueiredo AL, Nogueira Ede M, Alvarenga RM, Hernan Cabello P, dos Santos SR, Paiva CL: Haplotype analysis of the CAG and CCG repeats in 21 Brazilian families with Huntington's disease. *J Hum Genet* 2012;57:796-803.
- 12 Lee JM, Ramos EM, Lee JH, Gillis T, Mysore JS, Hayden MR, Warby SC, Morrison P, Nance M, Ross CA, Margolis RL, Squitieri F, Orobello S, Di Donato S, Gomez-Tortosa E, Ayuso C, Suchowersky O, Trent RJ, McCusker E, Novelletto A, Frontali M, Jones R, Ashizawa T, Frank S, Saint-Hilaire MH, Hersch SM, Rosas HD, Lucente D, Harrison MB, Zanko A, Abramson RK, Marder K, Sequeiros J, Paulsen JS; PREDICT-HD study of the Huntington Study Group (HSG), Landwehrmeyer GB; REGISTRY Study of the European Huntington's Disease Network, Myers RH; HD-MAPS Study Group, MacDonald ME, Gusella JF; COHORT Study of the HSG: CAG repeat expansion in Huntington's disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 2012;78:690-695.
- 13 Raskin S, Allan N, Teive HA, Cardoso F, Haddad MS, Levi G, Boy R, Lereña Junior J, Sotomaior VS, Janzen-Duck M, Jardim LB, Fellander FR, Andrade LA: Huntington disease: DNA analysis in Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:977-985.
- 14 Myers RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, Duyao MP, Ambrose CM, Taylor SA, Barnes G, Srinidhi J, Lin CS, Whaley WL, et al: De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;5:168-173.
- 15 Almqvist EW, Elterman DS, MacLeod PM, Hayden MR: High incidence rate and absent family histories in one quarter of patients newly diagnosed with Huntington disease in British Columbia. *Clin Genet* 2001;60:198-205.
- 16 Falush D, Almqvist EW, Brinkmann RR, Iwasa Y, Hayden MR: Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am J Hum Genet* 2001;68:373-385.
- 17 Warby SC, Visscher H, Collins JA, Doty CN, Carter C, Butland SL, Hayden AR, Kanazawa I, Ross CJ, Hayden MR: HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet* 2011;19:561-566.
- 18 Warby SC, Montpetit A, Hayden AR, Carroll JB, Butland SL, Visscher H, Collins JA, Semaka A, Hudson TJ, Hayden MR: CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. *Am J Hum Genet* 2009;84:351-366.
- 19 [Analysis of the IT15 gene in Huntington's disease families]. *Genetika* 2004;40:1123-1130.
- 20 Kaytor MD, Burrett EN, Duwick LA, Zoghbi HY, Orr HT: Increased trinucleotide repeat instability with advanced maternal age. *Hum Mol Genet* 1997;6:2135-2139.
- 21 Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, Marder K, Pechaszadeh G, Roberts SA, Gayan J, Brocklebank D, Cherny SS, Cardon LR, Gray J, Dlouhy SR, Wiktorski S, Hodes ME, Conneally PM, Penney JB, Gusella J, Cha JH, Irizarry M, Rosas D, Hersch S, Hollingsworth Z, MacDonald M, Young AB, Andresen JM, Housman DE, De Young MM, Bonilla E, Stilling S, Negrette A, Snodgrass SR, Martinez-Jaurieta MD, Ramos-Arroyo MA, Bickham J, Ramos JS, Marshall F, Shoulson I, Rey GJ, Feigin A, Arnheim N, Acevedo-Cruz A, Acosta L, Alvir J, Fischbeck K, Thompson LM, Young A, Dure L, O'Brien CJ, Paulsen J, Brickman A, Krcb D, Peery S, Hogarth P, Higgins DS Jr, Landwehrmeyer B: Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3498-3503.
- 22 Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD: Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 2005;6:729-742.
- 23 Semaka A, Creighton S, Warby S, Hayden MR: Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet* 2006;70:283-294.
- 24 Pramanik S, Basu P, Gangopadhyay PK, Sinha KK, Jha DK, Sinha S, Das SK, Maity BK, Mukherjee SC, Roychoudhuri S, Majumder PP, Bhattacharyya NP: Analysis of CAG and CCG repeats in huntingtin gene among HD patients and normal populations of India. *Eur J Hum Genet* 2000;8:678-682.
- 25 Rubinsztein DC, Leggo J, Goodburn S, Barton DE, Ferguson-Smith MA: Haplotype analysis of the delta 2642 and (CAG)_n polymorphisms in the Huntington's disease (HD) gene provides an explanation for an apparent 'founder' HD haplotype. *Hum Mol Genet* 1995;4:203-206.
- 26 Scholfield J, Greenberg J: A common SNP haplotype provides molecular proof of a founder effect of Huntington disease linking two South African populations. *Eur J Hum Genet* 2007;15:590-595.
- 27 Costa MC, Magalhaes P, Guimaraes L, Maciel P, Sequeiros J, Sousa A: The CAG repeat at the Huntington disease gene in the Portuguese population: insights into its dynamics and to the origin of the mutation. *J Hum Genet* 2006;51:189-195.
- 28 Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Spence N, Zeisler J, Nichol K, Theilmann J, Greenberg J, Goto J, et al: 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* 1994;3:2103-2114.
- 29 Magazi DS, Krause A, Boney V, Moagi M, Iqbal Z, Dhludla M, van der Meyden CH: Huntington's disease: genetic heterogeneity in black African patients. *S Afr Med J* 2008;98:200-203.
- 30 Lekoubou A, Echouffo-Tcheugui JB, Kengne AP: Epidemiology of neurodegenerative diseases in sub-Saharan Africa: a systematic review. *BMC Public Health* 2014;14:653.
- 31 Avila-Giron R: Medical and social aspects of Huntington's chorea in the state of Zulia, Venezuela. *Adv Neurol* 1973;1:261-266.
- 32 Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N: The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2012;27:1083-1091.
- 33 Barth F: Teorias da etnicidade; in org POUTIGNAT PeS-F, Jocelyne (ed): Grupos Etnicos e suas Fronteiras, São Paulo, 1997.
- 34 Mendes MF, Andrade de LAF, Ferraz HB: Chorea: Clinical correlates of 119 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1996;54:419-427.
- 35 Lima e Silva TC, Serra HG, Bertuzzo CS, Lopes-Cendes I: Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:11-17.
- 36 Alencar MA, Lopez AM, Figueiredo E, Porciúncula CG, Monlleó I: Prevalence of Huntington's disease in Feira Grande, a small city in Northeastern Brazil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:A22.
- 37 Agostinho LA, Santos SR, Alvarenga RM, Paiva CLA: A systematic review of the intergenerational aspects and the diverse genetic profiles of Huntington's disease. *Genet Mol Res* 2013;12:1974-1981.
- 38 Castilhos RM, Souza AFD, Furtado GV, Gheno TC, Silva AL, Vargas FR, Lima MAFde, Barsottini O, Pedroso JL, Godeiro C Jr, Salardini D, Pereira ET, Lin K, Toralles M-B, Saute JAM, Rieder CR, Quintas M, Sequeiros J, Alonso I, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB: Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet* 2014;86:373-377.

APÊNDICE C – Trabalho apresentado no “Miami 2014 Winter Symposium - The Molecular Basis of Brain Disorders”

Title:

Molecular and epidemiological study of Huntington's disease in Brazil

Authors & affiliations:

Luciana de A. Agostinho¹, Igor Vaz², Iane dos Santos da Silva², Enrique Medina-Acosta³, Hazel N. Barboza³, Antônio F. A. da Silva⁵, Simão P. F. Pereira⁴, Pedro Hernan Cabello^{5,6}, Susely R. dos Santos², Carmen L. A. Paiva^{1,2,7}

1- Programa de Pós-Graduação em Neurologia, UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ; 2- Departamento de Genética e Biologia Molecular, UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ; 3- Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ; 4- FAMINAS, Muriaé, MG; 5- Laboratório de Genética Humana, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ; 6- Laboratório de Genética Humana, UNIGRANRIO, Duque de Caxias, RJ; and 7 PPGGGBM, UNIRIO, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract: (Your abstract must use Normal style and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Huntington's disease (HD), a severe neurodegenerative disease, results from mutation of the *HTT* gene (4p16.3). The mutation occurs as an abnormal expansion of CAG repeats in exon 1. We investigate the CAG/CCG haplotypes in Brazilians affected by HD and associated risk groups, and the mortality rate of HD in Brazil. We performed a haplotype analysis of the CAG and CCG repeats (both in *HTT*) in 21 Brazilian families. Worldwide, the most common CCG alleles have 7 or 10 repeats. We found 40 different haplotypes and the analysis showed that (CCG)₁₀ was linked to a CAG normal allele in 19 haplotypes and to expanded alleles in two haplotypes. We found that (CCG)₇ was linked to expanded CAG repeats in 40 haplotypes (95.24%) and (CCG)₁₀ was linked to expanded CAG repeats in only two haplotypes (4.76%). Therefore, (CCG)₇ was the most common allele in HD chromosomes. There was a significant association of (CCG)₇ with the expanded CAG alleles ($\chi^2 = 6.97$, $p = 0.0084$). In Western Europe, (CCG)₇ is the most frequent allele, similarly to our findings. We also investigated HD mortality rate in Brazil from 1984 to 2006. Mortality data were obtained from SIM-DATASUS (The Brazilian Mortality Information System) and the population data were provided by IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). The mortality investigation showed that the increase in number of deaths from HD reached 1,300%, ranging from 3 (0,002/100.000) in 1984 to 42(0,022/100.000) in 2006 while the overall population increased 44%. Therefore, the mortality rate increase was not explained by the population increase in the same period. Furthermore, such an increase was not typical of a genetic disease. These results show that the notification of HD as cause of death was well below the expectation reflecting a possible lack of knowledge of the disease in Brazil.

Dear Dr. C.L.A.Paiva,

Your abstract MIAM2014_0095 'Molecular and epidemiological study of Huntington's disease in Brazil' is part of the poster program for **Miami 2014 Winter Symposium**.

The program is now completely finalised and all presentations have been allocated a new reference number, to enable a sequential system at the conference. Your poster is part of **Poster Session 1**.

Your new reference number is: **P1.76**

This number will be used on the poster program and in all documentation at the conference.

Poster Session 1

Date: **Monday, 27 January 2014**

Session Time: **08:00-08:45 & 13:30-14:30**

Please put your poster up from **Sunday 26 January 18:00** and remove it by **17:15 on Monday 27 January**

APÊNDICE D – 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 E – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREÉ E GUINLE
LABORATÓRIO E AMBULATÓRIO DE GENÉTICA/ UNIGEN

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Investigação de mutações novas em pacientes suspeitos e portadores de Doença de Huntington, provenientes da cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio.

I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A Doença de Huntington (DH) é uma doença genética, neurodegenerativa rara, progressiva, fatal e de alta penetrância. A variabilidade clínica na apresentação dos sinais e sintomas da doença, muitas vezes exige uma investigação molecular precisa em nível genético para determinação do diagnóstico definitivo.

O projeto tem como objetivo: 1) investigar, através de estudo molecular, a presença de mutações novas no gene responsável pela DH na população de suspeitos e portadores da DH, provenientes da cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio, atendidos no ambulatório de genética da UNIRIO.

II – PROCEDIMENTOS

Pacientes - Os pacientes suspeitos ou portadores da DH, devidamente esclarecidos, serão submetidos ao preenchimento de um formulário de identificação e protocolo. Caso não possam fazê-lo, os seus responsáveis deverão tomar conhecimento de todas as informações, preencherem o formulário e protocolo. Serão coletadas amostras de sangue (5 mililitros) dos pacientes suspeitos ou portadores da DH.

Famíliares dos pacientes - Se os resultados dos pacientes forem positivos e significantes na causa da doença, o procedimento será oferecido aos familiares.

Os pacientes, provenientes desse estudo, terão todos os dados do estudo, anexos ao prontuário hospitalar.

III – DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS

O desconforto, inerente ao estudo, consiste nas coletas de sangue que deverão ser feitas para a realização do estudo. Os riscos decorrem da necessidade de repetir uma ou mais coletas, por exemplo, quando ocorrerem falhas de técnicas laboratoriais. O benefício do estudo é estabelecer o diagnóstico e permitir o aconselhamento genético para a família.

IV – ESCLARECIMENTOS

Todas as informações serão comunicadas, assim como quaisquer dúvidas serão esclarecidas aos participantes do estudo. O principal investigador é a Biomédica Luciana de Andrade Agostinho e haverá colaboração da equipe médica do referido ambulatório. O ambulatório será nossa referência e situa-se à Rua Maris e Barros, 775 – Tijuca – Rio de Janeiro – RJ, 2264 1595, às segundas e quartas-feiras pela manhã, ou pelo celular da Luciana de Andrade Agostinho (021) 91026645. Se houver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, deve-se entrar em contato com a Comissão de Ética do HUGG pelo telefone (21) 2264-5177.

V – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

A participação do paciente não é obrigatória. A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados para coleta da amostra sanguínea e análise do material genético obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos

conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A autorização de participação no estudo pode ser retirada a qualquer momento, sem prejuízo do paciente com relação aos exames realizados e/ou obtenção destes resultados. A punção venosa e coleta do sangue para análise do DNA não oferecem riscos à sua dignidade ou saúde, pois não fará uso de qualquer substância química ou medicamento. Além de serem realizadas por profissional capacitado e todo material utilizado será descartável.

Toda informação a respeito do participante e seus exames será mantida em sigilo. Somente o (a) pesquisador (a) e o (a) orientador (a) terão conhecimento dos dados. As informações serão fornecidas de maneira atualizada, visando um maior esclarecimento dos familiares e até uma eventual mudança de opinião em continuar ou não participando do projeto. Os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos de forma ética e científica.

VI – GASTOS

Todos os procedimentos médicos e de diagnóstico laboratorial, pertinentes à pesquisa, serão pagos pela Instituição, exceto àqueles correspondentes a passagens nos transportes coletivos urbanos, e/ou serviço de postagem nacional, se houver necessidade.

VII - COMPROMISSOS

O pesquisador responsável se compromete a utilizar os dados obtidos e o material coletado somente para esta pesquisa e publicações científicas decorrentes da mesma. O paciente ou seu responsável se compromete a seguir as orientações médicas e as instruções para a coleta de material, quando tiverem que ser realizadas em casa.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Formulário de consentimento livre e esclarecido para o teste genético diagnóstico para Doença de Huntington

Eu, _____, nascido em _____, declaro ter lido a carta de informação a respeito do projeto de pesquisa:

TÍTULO: Investigação de mutações novas em pacientes suspeitos e portadores de Doença de Huntington, provenientes da cidade do Rio de Janeiro e Grande Rio.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que leram para mim, descrevendo o estudo. Eu discuti com a Luciana sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros os objetivos e os propósitos desta pesquisa, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos, riscos e as garantias de confidencialidade, além de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso à consulta e aconselhamento genético, caso participe do estudo realizado. Concordo voluntariamente em participar e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu entendimento neste serviço.

Nome do participante da pesquisa

Data _____

Assinatura do participante da pesquisa

Nome do responsável legal

Data _____

Assinatura do responsável legal

Nome da testemunha

Data _____

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação deste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data _____

ANEXO I –Carta de colaboração com ABH



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.

ANEXO II – Aprovação do comitê de ética

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

MEMO CEP-HUGG / Nº 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 nº 196/96.

Informamos que, de acordo com a Resolução CNS nº 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