

PATRÍCIA MARIA DE CARVALHO AGUIAR

TÍTULO: DELEÇÃO GAG NO GENE *DYT1*-ESTUDO DE PACIENTES
BRASILEIROS COM DISTONIA DE TORÇÃO PRIMÁRIA DE INÍCIO
PRECOCE

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo- Escola
Paulista de Medicina Para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ballalai Ferraz
Co-orientadora: Prof. Dra. Laurie Ozelius

São Paulo
2004

de Carvalho Aguiar, Patrícia Maria

Deleção GAG no gene *DYT1*: estudo de pacientes brasileiros com distonia de torção primária de início precoce. / Patrícia Maria de Carvalho Aguiar – São Paulo, 2004.
xi, 63f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Neurologia.

GAG deletion in *DYT1*: study of Brazilian patients with early-onset primary torsion dystonia.

1. Distonia primária. 2. *DYT1*. 3. Marcadores genéticos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Esta tese foi desenvolvida no Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) e no Departamento de Genética Molecular do Albert Einstein College of Medicine, New York (Yeshiva University), no curso de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências, área de Neurologia Clínica, com auxílio da Fundação CAPES.

Chefe do Departamento: Prof. Dra. Débora Amado Scerni

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

PATRÍCIA MARIA DE CARVALHO AGUIAR

TÍTULO: DELEÇÃO GAG NO GENE *DYT1*-ESTUDO DE PACIENTES BRASILEIROS COM DISTONIA DE TORÇÃO PRIMÁRIA DE INÍCIO PRECOCE

Presidente da Banca: Prof. Dr. Henrique Ballalai Ferraz

Banca Examinadora

Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa
Profa. Dra. Elizabeth Quagliato
Prof. Dr. Vitor Tumas
Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Suplentes

Prof. Dr. Gilberto Mastrocola Manzano
Profa. Dra. Maria Fernanda Mendes

Aprovada em: __/__/2004

Dedicatória

Aos meus pais, pelo incentivo.

Agradecimentos

Agradeço de forma especial aos meus orientadores, Dr. Henrique Ballalai Ferraz e Dra. Laurie Ozelius, pelo grande apoio e pela oportunidade de aprendizado junto aos mesmos.

Aos membros da banca examinadora, por sugestões e críticas: Dr. Egberto Reis Barbosa, Dra. Elizabeth Quagliato, Dr. Gilberto Mastrocola Manzano, Dra. Maria Fernanda Mendes, Dr. Vitor Tumas, Dr. Wilson Marques Jr.

Aos colegas da UNIFESP, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho: Dra. Vanderci Borges, Dra. Sonia Maria Azevedo Silva, Dra. Célia Harumi Tengan, Biol. Cláudia Ferreiro Barros, Fga. Lúcia Mourão, Dra. Roberta Arb Saba Pinto, Fga. Denise Knopp, Dr. Orlando Barsottini.

Ao Dr. Alberto Alain Gabbai, chefe da Disciplina de Neurologia Clínica.

À Dra. Débora Amado Scerni, chefe do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia.

Aos pacientes e seus familiares pela colaboração.

Aos meus amigos e à minha família pelo apoio recebido.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Distonia de torção primária: definição e características clínicas.....	1
1.2. Formas geneticamente definidas de distonia de torção primária.....	3
1.2.1. DYT1.....	3
1.2.2. DYT2.....	3
1.2.3. DYT4.....	4
1.2.4. DYT6.....	5
1.2.5. DYT7.....	5
1.2.6. DYT13.....	6
1.3. O papel da deleção GAG no gene <i>DYT1</i> na distonias de torção primária de início precoce em diferentes grupos étnicos.....	7
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. O gene <i>DYT1</i> na DTP de início precoce.....	11
3.2. Torsina A e a DTP de início precoce (DYT1).....	12
3.3. A transmissão dopaminérgica na distonia ligada ao <i>DYT1</i>	14
4. PACIENTES E MÉTODOS	19
4.1. Pesquisa da mutação 904_906 delGAG no gene <i>DYT1</i> em pacientes brasileiros com DTP de início precoce	19
4.1.1. Pacientes.....	19
4.1.2. Avaliação laboratorial.....	26
4.1.2.1. Extração de DNA.....	26
4.1.2.2. Pesquisa da mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i>	27
4.2. Pesquisa dos haplótipos relacionados à mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i>	30
4.2.1. Pacientes.....	30
4.2.2. Genotipagem.....	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Pesquisa da mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i> em pacientes brasileiros com distonia primária de início precoce.....	34
5.2. Pesquisa dos haplótipos relacionados à mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i>	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	51
9. ABSTRACT	60
10. APÊNDICES	61
11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	63

Lista de Figuras e Quadros

Figuras

Figura 1. Faixa etária e distribuição corporal da distonia de torção primária.	2
Figura 2. Sinapse dopaminérgica.	18
Figura 3. Padrões de dHPLC na pesquisa da mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i> .	29
Figura 4. Posição dos marcadores genéticos na região 9q34.	33
Figura 5. Pedigree da família BR 40.	37
Figura 6. Replicação do DNA.	48
Figura 7. Alinhamento das seqüências de DNA na região do éxon 5 do <i>DYT1</i> .	48

Quadros

Quadro 1. Características clínicas dos pacientes brasileiros com Distonia de torção primária de início precoce.	23
Quadro 2 . Características clínicas dos familiares dos probandos brasileiros com Distonia de torção primária de início precoce.	24-25
Quadro 3. Gradientes dos tampões A e B em função do tempo de corrida utilizados em dHPLC para detecção da deleção GAG do <i>DYT1</i> .	28
Quadro 4: Características clínicas de pacientes com distonia de torção primária positivos para a deleção GAG no <i>DYT1</i> .	31
Quadro 5. Primers para amplificação das repetições microsatélites.	33
Quadro 6. Resultado da pesquisa da mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i> em pacientes brasileiros distonia de torção primária de início precoce.	34
Quadro 7: Haplótipos da região 9q34 de pacientes com distonia de torção primária positivos para a mutação 904_906delGAG no <i>DYT1</i> .	36
Quadro 8: Haplótipos ligados à deleção GAG no <i>DYT1</i> descritos em outros grupos populacionais.	46

Lista de abreviaturas e símbolos

A: adenina
AD: autossômico(a) dominante
AECOM: Albert Einstein College of Medicine
AR: autossômico(a) recessivo(a)
ATP: adenosina trifosfato
C: citosina
C. elegans: *Caenorhabditis elegans*
cM: centimorgan
DA: dopamina
Del: deleção
dHPLC: cromatografia líquida desnaturante de alta performance (*denaturing high performance liquid chromatography*)
DNA: ácido desoxiribonucleico
DOPAC: ácido di-hidroxifenilacético
DTP: distonia de torção primária
EDTA: ácido Etilenodiaminatetracético
G: guanina
GFP: *green fluorescent protein*
GTP: guanosina trifosfato
JA: judeu(s) asquenazita(s)
kb: quilobase
kDa: quilodalton
MAO-B: monoamonioxidase B
Min: minutos
mRNA: RNA mensageiro
Pb: pares de base
PET: tomografia por emissão de pósitrons
RE: retículo endoplasmático
RNA: ácido ribonucleico
RPM: rotações por minuto
RSB: *reaction stop buffer*
SDS: dodecil sulfato de sódio
SNc: substância negra pars compacta
SPECT: tomografia computadorizada por emissão de fóton único
T: timina
TAE: tampão tris-ácido acético-EDTA
TBE: tampão tris-ácido bórico-EDTA
TE: tampão tris-EDTA
TEAA: acetato de tetraetilamônio
TH: Tirosina hidroxilase
UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo
V: volts
VMAT2: transportador de monoamina vesicular 2

Glossário

Alelos: variantes de um mesmo locus ou gene.

Centimorgan (cM): unidade de recombinação denominada em homenagem a Thomas Hunt Morgan. Dois *loci* estarão separados por 1 cM caso se detecte recombinação entre eles em 1% das meioses. O cM é uma unidade de medida genética, não física, mas 1 cM equivale aproximadamente a 1 milhão de pares de base.

Desequilíbrio de ligação: tendência para que combinações específicas de alelos em dois ou mais *loci* ligados ocorram juntas num mesmo cromossomo com uma frequência maior do que a esperada ao acaso.

Haplótipo: um grupo de alelos de *loci* estreitamente ligados, em geral herdados como uma unidade.

Hemizigoto: termo que descreve o genótipo de um indivíduo que possui apenas um representante de um cromossomo ou segmento cromossômico, em vez dos dois habituais. O termo se aplica a genes de cromossomos sexuais, mas também a qualquer segmento cromossômico que esteja deletado no cromossomo homólogo.

Heterodúplex: dupla fita de DNA formada pelo anelamento de cadeias que não apresentam pareamento perfeito, podendo ocorrer a formação de alças na região onde o pareamento difere.

Heterogeneidade alélica: situação em que existem diferentes alelos mutantes para um mesmo locus, gerando fenótipos anormais.

Heterogeneidade genética: existência de fenótipos semelhantes a partir de mecanismos genéticos diferentes.

Homodúplex: dupla fita de DNA formada pelo anelamento de cadeias com pareamento perfeito.

Locus: a posição de um gene ou de um fragmento de DNA (por exemplo, um marcador genético) no cromossomo.

Mutação nova (mutação “de novo”): mutação sem histórico progresso dentro de uma família, ocorre pela primeira vez nas células germinativas de um indivíduo, que a transmitirá para a geração seguinte.

Polimorfismo genético: ocorrência de múltiplos alelos num locus, onde pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1%.

Repetições em tandem: duas ou mais cópias idênticas (ou quase) de uma sequência de DNA arranjadas em sucessão direta ao longo de uma fita de DNA.

Resumo

Introdução: A distonia de torção primária (DTP) de início precoce é uma doença de herança autossômica dominante, com penetrância estimada entre 30 e 40%, sendo que a maioria dos casos se inicia na primeira década de vida. Caracteristicamente, inicia-se em um dos membros e tende a generalizar-se. A deleção GAG no *DYT1* é a única mutação até hoje identificada nestes casos. Estima-se que a mesma seja encontrada em cerca de dois terços dos casos de DTP com fenótipo clássico, mas existe um certo grau de heterogeneidade genética, onde mutações neste gene não são encontradas. Entre judeus asquenazitas, cerca de 90% dos casos advêm de um único evento mutagênico ocorrido há cerca de 350 anos, uma mutação fundadora. A mesma mutação já foi descrita em pacientes das mais variadas etnias, mas na literatura não há dados suficientes que nos permitam afirmar se estas mutações são frutos de eventos independentes, o que seria um indício de que este sítio do *DYT1* é particularmente propenso a mutações. No Brasil ainda não há relatos publicados que confirmem a presença desta mutação entre pacientes com DTP de início precoce.

Objetivos: investigar a presença da deleção GAG no *DYT1* em pacientes brasileiros com DTP de início precoce e, através da análise de haplótipos ligados à mutação em pacientes de origens diferentes, verificar se este sítio no *DYT1* é propenso a mutações.

Pacientes e métodos: 14 probandos brasileiros com DTP de início precoce foram investigados para a deleção GAG no *DYT1* através de cromatografia desnatante de alta performance. Quando disponíveis, familiares destes pacientes também foram investigados. Para a pesquisa de haplótipos relacionados à mutação, fizemos genotipagem utilizando marcadores polimórficos próximos do gene. Foram avaliados vinte e oito indivíduos positivos para a mutação, de famílias diferentes e origens étnicas diversas.

Resultados: dentre os 14 probandos brasileiros, 1 foi positivo para a mutação e a investigação de familiares revelou mais dois membros positivos para a mesma. A análise dos haplótipos de 28 pacientes revelou pelo menos 12 tipos diferentes, alguns compartilhados por indivíduos de mesma origem étnica, outros compartilhados por indivíduos de etnias diferentes. A análise dos haplótipos nos permitiu identificar uma mutação nova na família de brasileiros.

Conclusões: a deleção GAG no *DYT1* é encontrada entre brasileiros com DTP de início precoce. Em nosso meio também existe heterogeneidade genética, onde casos com fenótipo típico não apresentam esta mutação. A análise dos haplótipos identificou uma mutação nova e pelo menos 12 haplótipos diferentes num grupo de 28 pacientes, sugerindo que este sítio no *DYT1* é particularmente propenso a mutações.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Distonia de torção primária: definição e características clínicas

Distonia é uma síndrome caracterizada por contrações musculares involuntárias levando a posturas anormais ou a movimentos de torção de forma repetitiva e sustentada (FAHN et al, 1998). As síndromes distônicas são heterogêneas e compreendem um vasto número de patologias, muito embora do ponto de vista fenomenológico os movimentos distônicos sigam um padrão relativamente bem definido.

Quando a distonia não tem por etiologia causas exógenas e nem está associada a outras doenças neurológicas, é chamada de distonia de torção primária (DTP), antigamente conhecida como distonia de torção idiopática (FAHN et al, 1998). O termo “idiopática” vem caindo em desuso, à medida que as causas moleculares dessas doenças vêm sendo identificadas. Pacientes com DTP caracteristicamente não respondem à levodopa e apresentam distonia como a única manifestação fenotípica, exceto pelo tremor, que pode vir acompanhando a distonia. Parte dos casos de DTP caracterizam-se pela presença de história familiar e têm etiologia genética. No entanto, casos esporádicos também podem ter etiologia genética, pois a ausência de história familiar pode ser decorrente da baixa penetrância dos genes, gerando casos pseudo-esporádicos.

O espectro clínico da DTP é bastante variável. A idade de início vai da primeira à nona década de vida, o envolvimento muscular pode ser focal, segmentar ou generalizado, homens e mulheres são igualmente afetados (BRESSMAN et al, 1989). Quanto à idade de início, a distribuição é bimodal, como modas de 9 (início precoce) e 45 anos (início tardio), havendo um nadir aos 27 anos (BRESSMAN et al, 1989). Por este motivo, denomina-se DTP de origem precoce aqueles casos com início da doença antes dos 26 anos e DTP de início tardio quando a doença começa acima desta idade. Existe uma forte correlação entre a idade de início da doença e o padrão de envolvimento muscular (figura 1): quando a DTP é de início precoce, em geral começa em um dos membros e posteriormente se generaliza, havendo pouco ou nenhum acometimento da musculatura crânio-cervical (BRESSMAN et al, 1989); já na DTP de início tardio, é mais comum o acometimento inicial da musculatura crânio-cervical e a distonia apresenta uma maior tendência a permanecer focal (BRESSMAN et al, 1989; GREENE et al, 1995). As formas de início precoce possuem um pior prognóstico, há uma tendência para generalização da distonia dentro de um prazo de 5 anos após o início

da doença, estes casos representam as formas mais graves e incapacitantes da doença (BRESSMAN et al, 1989).

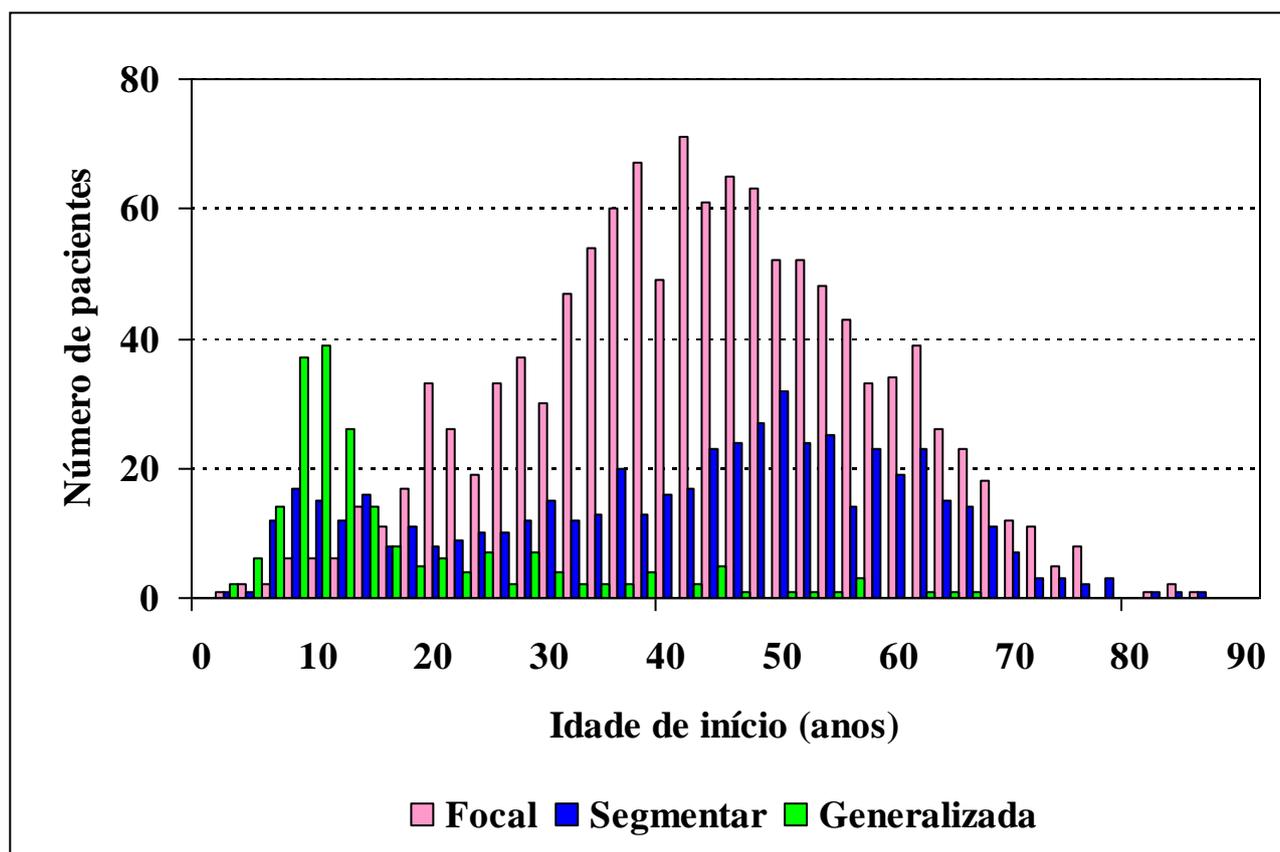


Figura1. Distribuição da distonia primária conforme faixa etária e distribuição corporal. O gráfico baseia-se nos dados de 1939 pacientes com distonia de torção primária do Neurological Institute, Columbia Presbyterian Medical Center, Columbia University, New York, USA (dados fornecidos e utilizados com a permissão de S. Bressman). Os casos de início precoce tendem à generalização, enquanto casos de início tardio tendem a permanecer focais (de Carvalho Aguiar & Ozelius, 2002).

1.2. Formas geneticamente definidas de distonia de torção primária

Até o momento, existem pelo menos seis formas geneticamente definidas de DTP, cujos *loci* são denominados DYT1, DYT2, DYT4, DYT6, DYT7 e DYT13, conforme nomenclatura estabelecida pela Human Genome Organization (HUGO). Parte dos *loci*, DYT1, DYT6, DYT7 e DYT13, foram definidos através de estudos de ligação em uma ou mais famílias (OZELIUS et al, 1989; KRAMER et al, 1990; OZELIUS et al, 1992; KRAMER et al, 1994; ALMASY et al, 1997; LEUBE et al, 1996; VALENTE et al, 2001a,b). A outra parte, DYT2 e DYT4, foi definida tendo por base apenas descrições clínicas

(GIMENEZ-ROLDAN et al, 1976; PARKER, 1985; AHMAD et al, 1993). Dentre estes seis *loci*, somente o DYT1 teve seu gene mapeado, o qual também é chamado de *DYT1* (OZELIUS et al, 1997b), sendo escrito em itálico conforme recomendação da HUGO, para diferenciá-lo do locus de mesmo nome. A base genética da maioria das DTP ainda está por ser identificada.

1.2.1. DYT1

A distonia ligada ao DYT1, também é conhecida como distonia de Oppenheim, que foi quem introduziu o termo distonia pela primeira vez em 1911 (OPPENHEIM, 1911; GOETZ et al, 2001), ou DTP autossômica dominante (AD) de início precoce (BRESSMAN et al, 1989). Apresenta herança AD com penetrância estimada entre 30 e 40% e sua prevalência é estimada em 1:160000 na população geral, podendo chegar até 1:2000 em judeus asquenazitas (JA) (BRESSMAN et al, 1989). A sua alta prevalência nesta população se deve a um efeito fundador, o qual será discutido mais adiante (BRESSMAN et al, 1994a; RISCH et al, 1995). Na maioria dos casos, a idade de início da doença varia entre 9 e 13 anos. A distonia inicialmente é focal, acometendo igualmente o membro inferior ou o membro superior e depois tende a generalizar-se (BRESSMAN et al, 1994a). O gene *DYT1* foi mapeado na região 9q34, tanto em famílias de judeus asquenazitas como em famílias não-judeias com DTP de início precoce, e codifica a proteína torsina A (OZELIUS et al, 1989; KRAMMER et al, 1990; KRAMMER et al, 1994; OZELIUS et al, 1997a; OZELIUS et al, 1997b). Nos casos de distonia, identificou-se uma deleção de 3 pares de base (pb) 904_906delGAG no quinto éxon do gene, levando à perda de um de dois ácidos glutâmicos no terminal carboxila da proteína (OZELIUS et al, 1997b). O papel desta mutação nos casos de DTP de início precoce será discutido em detalhes mais adiante, na seção de revisão bibliográfica.

1.2.2. DYT2

Por mais de 20 anos houve ampla aceitação da idéia originalmente proposta por Eldridge de que a DTP de início precoce era herdada de forma autossômica recessiva (AR) entre judeus asquenazitas e de forma AD entre os não-judeus (ELDRIDGE, 1970). No entanto, vários estudos demonstraram que a DTP é herdada de forma AD em ambos os grupos (ZILBER et al, 1984; BRESSMAN et al, 1989; RISH et al, 1990; PAULS et al, 1990). Uma das únicas evidências de transmissão AR vem da descrição de três famílias de ciganos

espanhóis, onde havia consangüinidade (GIMENEZ-ROLDAN et al, 1976; GIMENEZ-ROLDAN et al, 1988). Em duas das três famílias o fenótipo era semelhante ao da distonia do *DYT1*, com idade de início precoce (média =15,0 anos), acometendo inicialmente o membro inferior e seguida de rápida generalização. Na terceira família, torcicolo e distonia oromandibular foram as manifestações mais proeminentes. O estabelecimento do locus *DYT2* baseou-se nestas descrições clínicas. Estas famílias não foram submetidas a estudos de ligação e nem à pesquisa de mutação no gene *DYT1*. Até o momento, não há evidências de mutações recessivas no gene *DYT1* que possam explicar estas formas de distonia. Recentemente, Khan e colaboradores investigaram uma família de judeus sefaraditas provenientes do Irã onde três irmãos, filhos de pais consangüíneos, desenvolveram distonia na primeira década de vida (KHAN et al, 2003). Todos apresentaram início focal com lenta progressão até a forma generalizada, mas com predomínio de distonia crânio-cervical em dois deles, o que os diferencia da distonia do *DYT1*, onde a região crânio-cervical é relativamente poupada. Esta família foi investigada para a deleção GAG no *DYT1*, para mutações no gene da ϵ - sarcoglicana (*SGCE*), ataxias espino-cerebelares SCA 2, 3, 6 e 7, atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) e estudo de ligação para a região do receptor dopaminérgico D2, mas não foram encontradas alterações. Os autores admitem a hipótese de que a doença desta família possa ter a mesma origem genética daquela descrita por Gimenez-Roldan nos ciganos espanhóis (GIMENEZ-ROLDAN et al, 1988). O termo sefaradita é derivado do Hebreu referente à Espanha, e diz respeito aos descendentes de uma grande comunidade judaica que viveu na Espanha e em Portugal durante a Idade Média. Apenas o mapeamento do locus nestas famílias poderá confirmar se a distonia nestes casos tem ou não uma origem em comum.

1.2.3. DYT4

O termo DYT4 é uma designação generalizada que historicamente vinha sendo utilizado para classificar famílias com DTP AD não ligadas ao *DYT1* (AHMAD et al, 1993; HOLMGREN et al, 1995; BRESSMAN et al, 1994b,c; BRESSMAN et al, 1996; BENTIVOGLIO et al, 1997). No entanto, mais recentemente, este termo tem sido utilizado para descrever apenas uma família australiana que apresenta disфония sussurrante, além de outros sintomas distônicos focais ou generalizados, de herança AD (AHMAD et al, 1993). A idade de início da doença varia entre 13 e 37 anos, disфония é o sintoma predominante na maioria dos pacientes, alguns desenvolvem torcicolo inicialmente e disфония posteriormente.

Vários membros desta família apresentavam também sintomas psiquiátricos e dois foram diagnosticados como Doença de Wilson. Estudos de ligação tanto para o DYT1 quanto para o locus da doença de Wilson foram negativos nesta família. Tanto o sítio Online Mendelian Inheritance in Man (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/) quanto o Genome Database (www.gdb.org) se referem a esta família para caracterizar o locus DYT4. Portanto, o termo DYT4 não deve mais ser utilizado de forma generalizada. A designação correta destas famílias com DTP AD não ligada ao DYT1 virá a longo prazo, à medida que novos *loci* forem encontrados. Isto já vem ocorrendo e, recentemente, Valente e colaboradores identificaram um novo locus denominado DYT13 para uma família com DTP AD previamente descrita por eles (BENTIVOGLIO et al, 1997; VALENTE et al, 2001a). O locus DYT4 ainda não foi mapeado.

1.2.4. DYT6

Bressman e colaboradores descreveram duas famílias de origem menonita-germânica com início da distonia na adolescência e características atípicas para o DYT1 (BRESSMAN et al, 1994b). A herança nestas famílias é AD, com uma penetrância de cerca de 30%. O quadro clínico é amplo e misto, tendo características em comum com outros tipos de distonias. Cerca da metade dos pacientes tiveram início da doença na segunda década de vida, com idade média de 18,6 anos, mas a faixa-etária variou entre 5 e 38 anos. Em metade dos casos a distonia começou em um dos membros e, na outra metade, o início foi crânio-cervical (laringe, língua, musculatura facial ou cervical). A maioria dos pacientes mostrou progressão da doença para uma ou mais partes do corpo, mas apenas em raros casos houve generalização. A incapacidade maior nestes pacientes é na região crânio-cervical, sendo a disфонia muito importante. A doença foi ligada à região 8p21-8q22, de cerca de 40 cM, com haplótipos idênticos segregando com a doença em ambas as famílias, sugerindo um ancestral comum (ALMASY et al, 1997), fato confirmado posteriormente.*

1.2.5. DYT7

O locus DYT7 foi inicialmente mapeado numa família do noroeste da Alemanha, na qual sete membros apresentavam torcicolo de início tardio, sendo que alguns apresentavam também leve acometimento do membro superior, da face e disфонia espasmódica (LEUBE et

* Bressman, comunicação pessoal.

al, 1996). A herança é AD e o locus foi mapeado numa região de 30 cM do cromossomo 18p, entre os marcador D18S1153 e 18pter. Posteriormente, os mesmos autores relataram associação alélica entre diversos marcadores do cromossomo 18 em casos esporádicos de torcicolo do noroeste da Alemanha e em casos familiares da Europa Central. Esses dados sugeriam que o torcicolo de início na idade adulta nesta população seria decorrente de uma mutação que ocorreu num ancestral comum (LEUBE et al, 1997a; LEUBE et al, 1997b). No entanto, outros investigadores não conseguiram replicar este estudo numa população germânica com distonia focal e uma nova análise dos dados do estudo original colocou em dúvida suas conclusões (KLEIN et al, 1998a; KLEIN et al, 1998b). Os autores do estudo original tentaram confirmar seus dados através da análise de marcadores microssatélites altamente polimórficos na região de interesse. Não foi encontrada associação e estes autores questionaram a validade de seu estudo original (LEUBE et al, 1998). Embora um fundador comum para as distonias focais do norte da Alemanha e da Europa central esteja aparentemente descartado, outros achados corroboram com a hipótese da existência de um gene para distonia no cromossomo 18p. Pacientes com deleção do braço curto do cromossomo 18 apresentam distonia, dentre outros sintomas (TEZZON et al, 1998; KLEIN et al, 1999a). Grimes e colaboradores encontraram um novo locus para outra forma de distonia (distonia-mioclonia) na região 18p11 (GRIMES et al, 2002). Até que os genes destas doenças sejam mapeados, não será possível definir se tais patologias são ou não variantes fenotípicas de mutações num mesmo gene.

1.2.6. DYT13

O locus DYT13 foi mapeado numa região de 22 cM no cromossomo 1p36.13-36.32 numa família com distonia da Itália central (VALENTE et al, 2001a,b). A herança é AD e a penetrância é estimada em 58%. A idade de início varia entre 5 e 40 anos (média = 15,6 anos). Na maioria dos casos a distonia é segmentar, acomete a região crânio-cervical e o membro superior. Pode apresentar leve progressão, mas raramente generaliza (BENTIVOGLIO et al, 1997). O fenótipo pode se assemelhar ao do DYT6, exceto pelo fato de o acometimento da laringe e dos membros inferiores serem menos proeminentes no DYT13.

1.3. O papel da deleção GAG no gene *DYT1* na distonias de torção primária de início precoce em diferentes grupos étnicos.

No genoma humano encontramos inúmeras seqüências repetitivas de DNA em diversas regiões, que podem ou não ser codificadoras. Repetições curtas em tandem, mais conhecidas como repetições microssatélites (ou ainda STR, do inglês *short tandem repeats*), são seqüências de até seis nucleotídios que se repetem inúmeras vezes lado a lado na fita de DNA. Exemplificando, chamaríamos de repetição de dinucleotídios uma seqüência do tipo CACACACA, repetição de trinucleotídios algo como ATGATGATG e assim por diante. Em geral, o trecho da repetição microssatélite não vai muito além de 150 pb. Os tamanhos destas repetições variam numa mesma pessoa e entre indivíduos diferentes, por isso elas também são conhecidas como marcadores genéticos polimórficos. Num mesmo locus, um indivíduo apresentará dois alelos diferentes para determinada repetição, um que herdou de seu pai e outro de sua mãe. Por exemplo, no alelo paterno, o tamanho de uma repetição pode ser de 100 pb; no alelo materno, o tamanho pode ser de 108 pb. Quando analisamos estes fragmentos através de eletroforese em gel, conseguimos diferenciá-los pelos seus diferentes tamanhos e assim estudar a herança genética. Estes marcadores polimórficos são ferramentas importantes no estudo do genoma, uma de suas aplicações está nos estudos de ligação (*linkage*), através do qual fazemos o mapeamento genético e podemos definir que região cromossômica está associada à determinada característica fenotípica.

Marcadores genéticos polimórficos que estão muito próximos podem ser herdados em conjunto, a este conjunto damos o nome de haplótipo. Quando estão muito próximos de um gene, podem ser transmitidos com o mesmo, como uma unidade. O estudo dos haplótipos ligados a um gene que apresenta uma mutação também nos permite identificar quantos eventos independentes foram responsáveis pelo aparecimento de uma mesma mutação em pessoas diferentes. No caso com *DYT1*, por exemplo, se dois indivíduos de famílias diferentes têm exatamente a mesma mutação neste gene, mas apresentam haplótipos diferentes na região vizinha do mesmo, significa que esta mutação não veio de um ancestral comum, mas surgiu em dois eventos independentes, de pessoas diferentes. Se, ao estudarmos haplótipos ligados a um gene com a mesma mutação em pessoas de famílias diferentes, identificarmos vários haplótipos diferentes, isto seria um indício de que aquele sítio genético é particularmente propenso a mutações. Este tipo de informação é importante, à medida que

pode nos auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares que levam às mutações. Algumas regiões do genoma são mais propícias a mutações e estes mecanismos mutagênicos não estão totalmente esclarecidos.

Já está bem estabelecido o papel que um efeito fundador teve na maior prevalência da deleção GAG no *DYTI* entre JA em relação a grupos não-judeus (KWIATKOWSKI et al, 1991; OZELIUS et al, 1992; BRESSMAN et al, 1994a; RISCH et al, 1995; OZELIUS et al, 1997). A análise do haplótipo ligado ao gene *DYTI* revelou que 90% dos JA com DTP de início precoce apresentam o mesmo conjunto de marcadores numa região próxima deste gene (OZELIUS et al, 1992). Estima-se que um único evento mutagênico, ocorrido há cerca de 350 anos, veio sendo transmitido ao longo de várias gerações neste grupo étnico (RISCH et al, 1995).

Uma mesma mutação pode surgir em diferentes populações como consequência de eventos migratórios seguidos de miscigenação ou pode ser fruto de eventos independentes. A deleção GAG no *DYTI* foi identificada em pacientes com DTP de início precoce em vários países (GASSER et al, 1998; VALENTE et al, 1998; IKEUSHI et al, 1999; KAMM et al, 1999; KLEIN et al, 1999b; LEBRE et al, 1999; SLOMINSKY et al, 1999; VALENTE et al, 1999; BRASSAT et al, 2000; MAJOR et al, 2001; MATSUMOTO et al, 2001; HJERMIND et al, 2002; IKEUSHI et al, 2002). Muito embora vários estudos tenham sido realizados em diferentes populações desde a identificação do gene *DYTI*, poucos estudaram sistematicamente os haplótipos relacionados à mutação (KLEIN et al, 1998c; LEBRE et al, 1999; KAMM et al, 1999; VALENTE et al, 1999; HJERMIND et al, 2002; IKEUSHI et al, 2002). Como todos estes pacientes apresentam mutações idênticas, o estudo dos haplótipos nesta região nos auxiliaria a identificar se estes indivíduos herdaram a mutação de um ancestral comum, como no caso da maioria dos JA, ou se suas mutações são frutos de eventos independentes que surgiram diversas vezes na história, o que seria um indício de que este sítio genético é propenso a mutações.

Até hoje, após análise sistemática de todos os éxons do *DYTI* em centenas de pacientes com DTP de início precoce e com o fenótipo clássico, apenas a deleção GAG no éxon 5 foi identificada nesta doença (OZELIUS et al, 1997b; OZELIUS et al, 1999; LEUNG et al, 2001; TUFFERY-GIRAUD et al, 2001; KABAKCI et al, 2004). Em um caso atípico de outra forma de distonia, a distonia-mioclonia, foi identificada uma deleção de 18 pb (966_983del) que remove seis aminoácidos próximos do terminal carboxila da torsina A (Phe323_Tyr328 del), incluindo um suposto sítio de fosforilação (LEUNG et al, 2001). No

entanto, neste mesmo paciente, foi identificada uma mutação no gene da ϵ -sarcoglicana (*SGCE*), responsável pela distonia-mioclonia (ZIMPRICH et al, 2001; DOHENY et al, 2002). A deleção no *DYT1* foi herdada pelo lado materno e a mutação no *SGCE* veio pelo lado paterno. Indivíduos desta família que apresentavam apenas a deleção de 18 pb no *DYT1* apresentavam distonia leve com acometimento predominantemente cervical e de início na idade adulta, o que os diferencia do fenótipo clássico do *DYT1* e é uma evidência de heterogeneidade alélica. Recentemente, foi descrita uma nova deleção de 4 pb (934_937delAGAG) no éxon 5 do *DYT1* num indivíduo-controle supostamente saudável (KABAKCI et al, 2004). Teoricamente, esta mutação levaria a um códon de parada prematuro, truncando a proteína. O significado patológico desta mutação, se existe, ainda não está estabelecido. Um estudo desta mutação em células em cultura não revelou as inclusões encontradas no caso da mutação 904_906delGAG (O'FARRELL et al, 2002).

No Brasil, até o momento, ainda não há relato publicado da presença da deleção GAG no *DYT1* em pacientes com DTP de início precoce. É possível que nossos pacientes com fenótipo típico do *DYT1* apresentem esta mutação, mas pode haver certo grau de heterogeneidade genética onde a mesma não seja encontrada, como já foi verificado em outras populações (VALENTE et al, 1998; OZELIUS et al, 1999; LEBRE et al, 1999; KLEIN et al, 1999; TUFFERY-GIRAUD et al, 2001). A presença de mutações nos brasileiros e em indivíduos de outras origens poderia ser decorrente de uma herança de um pequeno grupo de ancestrais comuns, ou poderia ser fruto de novos eventos mutagênicos, se este sítio for propenso a mutações novas. O estudo de haplótipos ligados ao *DYT1* pode nos ajudar a obter esta informação.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Verificar a presença da mutação 904_906delGAG no *DYT1* em pacientes brasileiros com DTP de início precoce.
- Através do estudo dos haplótipos ligados à mutação 904_906delGAG no *DYT1* em indivíduos de famílias diferentes, verificar se este sítio é propenso a mutações novas, que teriam sido introduzidas como eventos independentes ao longo da história, ou se as mutações destes indivíduos poderiam ser atribuídas a um pequeno número de eventos ocorridos em ancestrais comuns.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O gene *DYT1* na DTP de início precoce

O primeiro locus para DTP, denominado DYT1, foi mapeado na região 9q32-34 por Ozelius e colaboradores em 1989 em uma grande família de etnia franco-canadense com DTP de início precoce (OZELIUS et al, 1989). Posteriormente, o mesmo locus foi ligado à DTP em doze famílias de judeus asquenazitas (JA) e, mais tarde, limitado à região 9q34 (KRAMER et al, 1990; OZELIUS et al, 1997a). Ambos os grupos, JA e não-judeus, se assemelhavam clinicamente, com transmissão AD da doença, penetrância estimada entre 30 e 40%, idade média de início da doença entre $13,2 \pm 1,0$ e $14,4 \pm 3,0$ anos, início dos sintomas com distonia focal em um dos membros em 86 a 90% dos casos e uma tendência à generalização da distonia em 70% dos casos num prazo médio de cinco anos após o início da doença (OZELIUS et al, 1989; KRAMER et al, 1990; BRESSMAN et al, 1994a). Em raros casos, o início da distonia se dá no pescoço (3,3%) ou na laringe (2,2%). De uma maneira geral, o acometimento da laringe ou dos músculos cranianos são incomuns nestes pacientes (BRESSMAN et al, 1994a). Essas mesmas características clínicas foram confirmadas entre não-judeus (KRAMER et al, 1994).

Foi verificado que as famílias de JA tinham um haplótipo específico ligado à doença (OZELIUS et al, 1992; BRESSMAN et al, 1994a; RISCH et al, 1995; OZELIUS et al, 1997a). Este compartilhamento de um mesmo haplótipo, com a presença de determinados alelos numa frequência maior do que a esperada ao acaso nesta população, é chamado de desequilíbrio de ligação. Quando os mesmos alelos destes marcadores estão fortemente ligados ao gene de uma doença num determinado grupo populacional, isto sugere que a doença se deve a uma única mutação, ou evento fundador. Risch e colaboradores demonstraram que mais de 90% dos casos de DTP de início precoce entre JA se devem a uma única mutação fundadora e estimam que esta mutação foi introduzida nesta população há cerca de 350 anos, provavelmente na Lituânia ou na Bielo-Rússia (RISCH et al, 1995). A alta prevalência desta mutação entre JA (1:2000 a 1:6000) se deveria a uma rápida expansão populacional deste grupo, entre os séculos XVIII e XIX, a partir de um pequeno grupo fundador e à prática da endogamia. O rápido crescimento de uma população a partir de um grupo limitado de fundadores é uma condição que favorece o aparecimento de determinado evento genético em alta frequência naquela população. Um fenômeno chamado oscilação ou

deriva genética pode ser observado em populações pequenas (Thompson & Thompson, 1991). Nestes grupos pequenos, qualquer evento ao acaso pode produzir alterações importantes na frequência de determinada característica genotípica ao longo de sucessivas gerações. A prática de endogamia em pequenas populações reduz a variabilidade genética e contribui para que determinada alteração genômica, ocorrida ao acaso, se torne mais prevalente. Isto não é observado em grandes populações, com alto grau de miscigenação. Um caso particular de oscilação genética é o princípio do fundador, que se refere ao estabelecimento de uma nova população a partir de poucos indivíduos que vieram da população original. No caso da mutação no *DYT1* em JA, a hipótese de oscilação ou deriva genética parece ser a mais provável para explicar sua alta prevalência neste grupo étnico. Entre JA, estima-se que a mutação surgiu há cerca de 12 ou 13 gerações, o que coincide com o período de diáspora mais recente e com o período de eventos como o massacre de Chmielnicki na Ucrânia, entre 1648 e 1649. Este evento alterou a dinâmica desta população, com um efeito de afunilamento inicial seguido de expansão a partir de um pequeno grupo de sobreviventes (RISCH et al, 1995; OSTRER, 2001).

Em 1997 o gene *DYT1* foi mapeado na região 9q34 e verificou-se que tanto os pacientes com DTP de início precoce como os portadores obrigatórios da mutação com a doença ligada a esta região eram heterozigotos para uma deleção de 3 pb (904_906delGAG) neste gene, independentemente da origem étnica (OZELIUS et al, 1997b). A deleção do fragmento GAG, que corresponde a um códon codificador de ácido glutâmico, não foi encontrada em 260 e 274 cromossomos controles de JA e de não-judeus, respectivamente.

3.2. Torsina A e DTP de início precoce (DYT1)

O gene *DYT1* possui uma matriz de leitura com 998 pb e 5 éxons. Codifica uma proteína de 37 kDa com 332 aminoácidos denominada torsina A (OZELIUS et al, 1997b). Tanto o gene quanto a proteína apresentam homologia em torno de 70% com um gene adjacente, *DQ1* ou *TOR1B*, que codifica a proteína denominada torsina B. Estes dois genes apresentam orientações opostas no cromossomo, com suas respectivas porções 3' adjacentes uma à outra, e acredita-se que sejam produtos evolucionários de uma duplicação em tandem de um único gene precursor. Proteínas com seqüências homólogas foram identificadas em outras espécies, como *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) e *Rattus norvegicus*. O ácido glutâmico deletado na distonia é conservado nestas proteínas, sugerindo que ele seja parte de um domínio funcional importante (OZELIUS et al, 1997b).

A torsina A é um membro da superfamília das ATPases AAA+ (OZELIUS et al, 1997). Tipicamente essas proteínas formam anéis oligoméricos e funcionam como chaperonas numa série de reações intracelulares (NEUWALD et al, 1999; VALE et al, 2000). Através da hidrólise de ATP, as chaperonas exercem funções como dobramento correto de proteínas, degradação de proteínas que estejam incorretamente dobradas, tráfego de membranas e de organelas recém formadas.

A torsina A é encontrada predominantemente nas camadas corticais III e V, no hipocampo, nas células de Purkinje e nos gânglios da base (AUGOOD et al, 1998; AUGOOD et al, 1999; SHASHIDHARAN et al, 2000a; KONAKOVA et al, 2001; WALKER et al, 2001; ROSTASY et al, 2003). Sua expressão predomina em neurônios e é insignificante na glia. Uma grande quantidade de RNA mensageiro (mRNA) foi detectada nos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNc) (AUGOOD et al, 1998; AUGOOD et al, 1999).

Estudos anatomopatológicos de cérebros de pacientes distônicos com a deleção GAG no *DYT1* ainda são escassos (AUGOOD et al, 2002; WALKER et al, 2002; ROSTASY et al, 2003). A comparação da imunoreatividade da torsina A entre cérebros de pacientes com DTP positivos para a mutação 904_906delGAG no *DYT1*, cérebros de pacientes com outras formas de distonia e cérebros normais não mostrou diferença entre os mesmos e nem tão pouco foi observada neurodegeneração em pacientes positivos para esta mutação (AUGOOD et al, 2002; WALKER et al, 2002). No entanto, Rostasy e colaboradores observaram um aumento do tamanho médio dos neurônios pigmentados da SNc no cérebro de pacientes positivos para a mutação do *DYT1* (ROSTASY et al, 2003). As conseqüências funcionais deste achado ainda não foram esclarecidas.

Estudos de localização intracelular em células em cultura demonstraram que a torsina A, quando expressada em excesso, encontra-se no lúmen do retículo endoplasmático (RE), distribuindo-se difusamente ao longo do citoplasma e colocalizando-se com outras proteínas do RE. Porém, sua forma mutante expressada em excesso tende a formar grandes inclusões esféricas ao redor do núcleo (HEWETT et al, 2000; KUSD TEDJO et al, 2000; HEWETT et al, 2003). A análise ultraestrutural destas inclusões demonstrou que se tratam de estruturas membranais multilamelares no citoplasma e ao redor do núcleo. Muito embora se tenha observado um aumento da citotoxicidade em culturas celulares com excesso de expressão de torsina A mutante, é provável que funções processadas no RE estejam comprometidas. Essa inclusões não foram encontradas nos cérebros de pacientes positivos para a mutação no *DYT1*

até hoje estudados e podem ser apenas resultado do excesso de expressão em células em cultura, o significado patológico deste achado ainda não está esclarecido.

Estudos imuno-histoquímicos de cérebros de parkinsonianos revelaram que a torsina A apresenta intensa imunoreatividade nos corpúsculos de Lewy e uma forte associação com a α -sinucleína (SHASHIDHARAN et al, 2000b; SHARMA, et al 2001). Para testar a hipótese de que a torsina A é uma chaperona para a α -sinucleína, células de neuroglioma em cultura foram cotransfectadas com torsina A e uma forma de α -sinucleína modificada em sua porção carboxila para formar agregados. Na presença de torsina A normal, houve uma grande redução dos agregados de α -sinucleína, enquanto que na presença da forma mutada de torsina A não houve redução dos agregados de α -sinucleína e as duas proteínas formaram inclusões citoplasmáticas distintas (McLEAN et al, 2002). Em *C. elegans*, a forma ortóloga da torsina A, TOR-2 aparentemente também está localizada no RE (CALDWELL et al, 2003). Sua expressão em excesso, bem como a da torsina A, reduziu de forma significativa a formação de agregados decorrentes da fusão de GFP (*green fluorescent protein*) com repetições de poliglutamina. A forma mutante da TOR-2, na qual falta uma serina numa região próxima àquela onde, na forma mutante da torsina A, existe a deleção do ácido glutâmico, também não foi capaz de reduzir os agregados protéicos.

Células PC-12 em cultura foram submetidas a estresse oxidativo com pequenas concentrações de H₂O₂, levando a um aumento do peso molecular da torsina A e também a uma mudança de sua localização intracelular (HEWETT et al, 2003). Ainda não está claro se a torsina A tem sua função prejudicada ou modificada sob estresse oxidativo ou se participa da sinalização celular em resposta ao mesmo. Neurônios dopaminérgicos da SNc, os quais apresentam altos níveis de torsina A, sofrem estresse oxidativo em decorrência do metabolismo dopaminérgico. A torsina A poderia funcionar como fator protetor contra efeitos do estresse oxidativo e talvez a forma mutante da proteína não seja capaz de conferir a proteção necessária para o funcionamento normal dessas células. Esta hipótese necessita de mais estudos para sua confirmação.

3.3. A transmissão dopaminérgica na distonia ligada ao *DYT1*

De uma forma geral, as distonias primárias não estão associadas a processos neurodegenerativos. No entanto, através de estudos farmacológicos, genéticos e de neuroimagem de algumas formas de distonias, primárias ou não, acredita-se que a sinalização

dopaminérgica possa estar alterada no estriado destes pacientes. Por exemplo, distonias ligada à deficiência de tirosina hidroxilase (TH) e da guanosina trifosfato (GTP) ciclohidrolase I, ambas transmitidas geneticamente, limitam a síntese dopaminérgica (ICHINOSE et al, 1994; KNAPPSKOG et al, 1995). Polimorfismos na região vizinha do receptor dopaminérgico D5 foram associados à distonia cervical em um grupo de pacientes britânicos (PLACZEK et al, 2001). Lesões estriatais mecânicas ou isquêmicas e agentes farmacológicos que bloqueiam receptores dopaminérgicos D2 podem provocar distonia (PERLMUTTER & MINK, 2004). A figura 2 ilustra alguns aspectos da sinápsis dopaminérgica.

Augood e colaboradores fizeram o estudo de marcadores dopaminérgicos nos cérebros de 3 pacientes com DTP de início precoce positivos para a deleção GAG no *DYT1* (AUGOOD et al, 2002). Estes achados foram comparados a cérebros controles e ao cérebro de um indivíduo com o diagnóstico clínico de parkinsonismo e com história familiar positiva para distonia, o qual também possuía a mutação no *DYT1*. O exame anatomopatológico do cérebro deste indivíduo revelou despigmentação da SNc, mas não foram detectados corpúsculos de Lewy. Observou-se que, nos cérebros dos pacientes com distonia, a concentração de dopamina (DA) estriatal estava reduzida em 23% em relação aos controles e que a concentração de ácido di-hidroxifenilacético (DOPAC) estava elevada em 48% nos distônicos, levando a um aumento da razão estriatal DOPAC/DA. Não foi observada diferença consistente do conteúdo estriatal de ácido homovalínico (HVA) entre distônicos e controles. A razão estriatal HVA/DA estava aumentada nos distônicos, mas não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos controles. Esses dados sugerem que o sistema dopaminérgico nigro-estriatal estaria intacto nestes pacientes distônicos, mas que haveria um aumento do metabolismo dopaminérgico. Por sua vez, o cérebro do paciente parkinsoniano mostrou acentuada redução (> 85%) do conteúdo estriatal de DA, DOPAC e HVA, consistente com degeneração dopaminérgica da via nigro-estriatal. O exame com marcadores pós-sinápticos da transmissão dopaminérgica demonstrou que a ligação aos receptores dopaminérgicos estriatais D1 e D2 estava diminuída nos cérebros dos distônicos, muito embora os valores médios não tenham atingido números estatisticamente significantes. Essas reduções foram semelhantes aos valores observados no estriado do paciente parkinsoniano positivo para a mutação no *DYT1* e consistentes com estudos de tomografia por emissão de pósitrons (PET), que relataram resultados semelhantes em alguns tipos de distonias (NAUMANN et al, 1998; PERLMUTTER et al, 1998). Devido à escassez de

material, os autores não puderam concluir se esta diminuição da ligação aos receptores dopaminérgicos estriatais seria em decorrência de uma diminuição no número de receptores ou de uma diminuição da afinidade da DA pelos mesmos. Porém, os resultados da análise bioquímica, juntamente com o estudo autoradiográfico dos receptores, foram consistentes com a existência de um desequilíbrio na sinalização dopaminérgica estriatal, particularmente um aumento no metabolismo da DA. Este aumento poderia ocorrer em decorrência de uma série de fatores, como aumento da liberação de DA, diminuição do armazenamento vesicular da DA, diminuição da atividade do transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) ou aumento da atividade da monoamonoxidase B (MAO-B). Estudos *in vivo* com tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) em pacientes com DTP não revelaram alterações na ligação dopaminérgica pré-sináptica (NAUMANN et al, 1998). A recaptção estriatal de ¹²³I beta-CIT, marcador que se liga a proteínas transportadoras de DA nos terminais dopaminérgicos, estava normal, sugerindo que a atividade do transportador de DA (DAT) talvez não esteja comprometida nestes pacientes. No entanto, foi observada uma diminuição significativa da ligação D2 pós-sináptica.

A redução da captação estriatal de [¹⁸F]-DOPA *in vivo* também foi observada em pacientes com DTP e história familiar, sugerindo uma diminuição da atividade da enzima DOPA decarboxilase (PLAYFORD et al, 1993). Sendo assim, é possível que haja anormalidades no metabolismo dopaminérgico intraneuronal, bem como um aumento da atividade da MAO-B estriatal. A pargilina, um inibidor não-específico da MAO-B, foi capaz de atenuar a distonia induzida por neurolépticos em primatas (HEINTZ & CASEY, 1987). Porém, o papel de inibidores da MAO como uma possível opção no tratamento das distonias ainda não está bem estabelecido.

Ainda não está claro como uma disfunção dopaminérgica estriatal leva à distonia. Há uma hipótese, baseada num modelo animal de blefaroespasm, de que a disfunção dopaminérgica poderia funcionar como um fator facilitador para que uma agressão secundária levasse à distonia, o mecanismo fisiopatológico se daria em duas etapas (SCHICATANO et al, 1997). Estudos feitos com PET em pacientes assintomáticos portadores da deleção no gene *DYT1* mostrou que eles apresentam a mesma alteração do padrão funcional da rede neuronal encontrada em pacientes sintomáticos, caracterizada por aumento da atividade metabólica nos núcleos lentiformes, no cerebelo e nas áreas motoras suplementares (EIDELBERG et al, 1998). Alterações bilaterais do fluxo sanguíneo também foram demonstradas em pacientes com distonia unilateral (TEMPEL & PERLMUTTER,

1990; TEMPEL & PERLMUTTER, 1993). Uma lesão ou um defeito no processamento sensorial poderiam levar à distonia em pacientes geneticamente predispostos (REILLY et al, 1992; ELBERT et al, 1998; SANGER et al, 2001).

Outros estudos em animais enfocam a modificação da expressão da torsina A em diferentes regiões do cérebro ao longo do desenvolvimento (OBERLIN et al, 2004). Ainda não é possível extrapolar os achados sobre o desenvolvimento do cérebro de ratos para os humanos, pois ainda não existe um consenso sobre qual período do desenvolvimento do cérebro humano corresponderia às três primeiras semanas de desenvolvimento cerebral pós-natal do rato. Oberlin e colaboradores verificaram padrões particularmente interessantes em interneurônios colinérgicos estriatais, estes apresentam intensa expressão da torsina A num período que corresponde à intensa sinaptogênese no estriado (OBERLIN et al, 2004). Pode ser que a torsina A mutada tenha algum efeito sobre a atividade destes interneurônios, os quais recebem inervação de terminais dopaminérgicos. O fato de agentes anticolinérgicos serem de algum benefício terapêutico nas distonias corrobora com a hipótese que interneurônios colinérgicos podem ter um papel relevante na fisiopatologia da DTP.

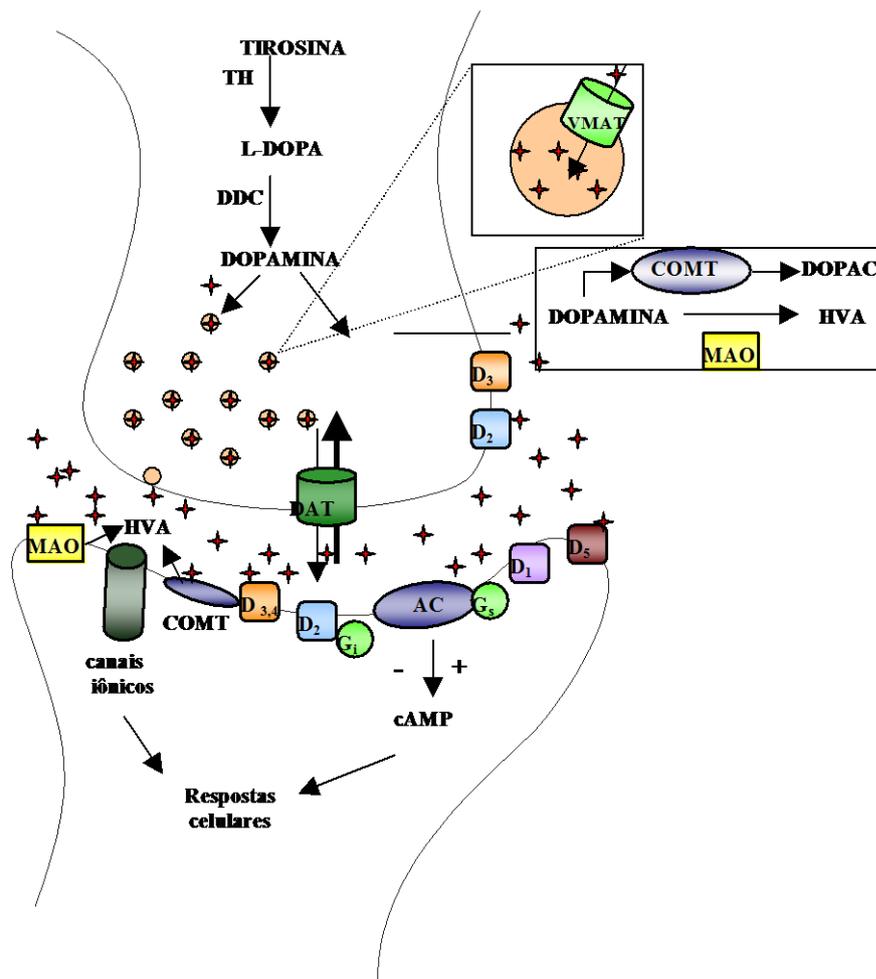


Figura 2. Modelo de sinapse dopaminérgica. Algumas moléculas relacionadas à síntese, liberação, sinalização e recaptação de dopamina estão ilustradas.

AC = adenilil ciclase;
 cAMP = AMP cíclico;
 COMT = catecol-O-metiltransferase;
 DAT = transportador de dopamina;
 DDC = dopa decarboxilase;
 DOPAC = ácido di-hidroxi-fenilacético;
 D1 a D5 = receptores dopaminérgicos;
 Gi e Gs = proteínas G inibidora e estimuladora;
 HVA = ácido homovalínico;
 MAO = monoaminoxidase;
 VAMT= transportador vesicular de monoamina

4. PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o protocolo de número 1017/00 e pelo Clinical Committee on Investigations do Albert Einstein College of Medicine (AECOM) de Nova Iorque –EUA sob o protocolo de número 99-89. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos indivíduos que participaram deste estudo.

A parte clínica desta pesquisa foi realizada no setor de Distúrbios do Movimento da UNIFESP e a parte laboratorial foi realizada no Departamento de Genética Molecular do AECOM.

4.1. Pesquisa da mutação 904_906 delGAG no gene *DYT1* em pacientes brasileiros com DTP de início precoce.

4.1.1. Pacientes

Os pacientes foram selecionados através da revisão de 345 prontuários médicos de indivíduos com o diagnóstico de distonia atendidos entre os anos de 1986 e 2002 no Setor de Distúrbios do Movimento da UNIFESP-Escola Paulista de Medicina.

Critérios de seleção:

- Diagnóstico de DTP definitiva: só foram selecionados pacientes que, de acordo com as anotações no prontuário médico, já haviam sido investigados para afastar outras possíveis causas de distonia, incluindo exames de imagem como tomografia computadorizada (CT) ou ressonância nuclear magnética (RNM) de crânio, e investigação laboratorial para afastar distúrbios de metabolismo que pudessem cursar com distonia, incluindo doença de Wilson. Os pacientes deveriam se encaixar fenotipicamente na definição de distonia primária (FAHN et al, 1998). A categorização de pacientes e familiares como distonia definitiva, distonia provável, distonia possível e não-classificável seguiu os critérios recomendados por Bressman e colaboradores (BRESSMAN et al, 2002), a saber:
 - a) Distonia definitiva: movimentos ou posturas de torção evidentes, com tendências direcionais características, presentes de forma consistente.
 - b) Distonia provável: presença de movimentos ou posturas sugestivas de distonia, mas que são insuficientes em intensidade ou consistência para serem considerados como distonia definitiva (por exemplo: escrita excessivamente tensa ou

trabalhosa, mas com um mínimo de postura anormal; clusters de piscamento, mas sem contração palpebral sustentada; desvio da cabeça leve ou intermitente).

- c) Dystonia possível: contrações musculares não consideradas como anormais, mas que sugerem dystonia remotamente (por exemplo, tensão aumentada à preensão manual, mas sem comprometimento da escrita; aumento da frequência de piscamento, mas sem clusters ou contração palpebral sustentada; postura grosseira à manobra de movimentos rápidos dos pés com uma leve alteração postural se estendendo aos pododáctilos de forma intermitente. Escoliose e tremor (sem tendência direcional sustentada) não são considerados como sinais de dystonia.
- d) Não-classificável: indivíduos com alterações neurológicas que possam mascarar uma dystonia, como hemiparesia em decorrência de acidente vascular cerebral, indivíduos com história de anóxia, exposição a neurolépticos ou traumatismo que possam prejudicar o diagnóstico de dystonia primária.

- Idade de início da doença dos 26 anos para baixo, ou após esta idade caso houvesse história familiar positiva para dystonia, conforme recomendação internacional (BRESSMAN et al, 2000; BRESSMAN et al, 2002).

Critérios de exclusão:

- Foram excluídos todos os pacientes que, muito embora não tivessem história sugestiva de sofrimento perinatal, não souberam informar com precisão as condições de gestação e parto.
- Para o teste genético excluímos familiares menores de idade assintomáticos, nestes indivíduos procedeu-se apenas à avaliação clínica.

Dentro desses critérios, foram selecionados 41 prontuários médicos e foi possível entrar em contato com 21 desses pacientes para reavaliá-los e confirmar os dados obtidos através do prontuário. Destes, 14 probandos participaram do estudo, juntamente com alguns de seus familiares, num total de 44 indivíduos. Todos os 14 probandos foram classificados como tendo dystonia definitiva, de acordo com os critérios estabelecidos por Bressman (BRESSMAN et al, 2002), após serem reexaminados por dois neurologistas do setor, com diagnósticos em total concordância. Com relação à distribuição corporal da dystonia, os pacientes foram classificados conformes os seguintes critérios (FAHN et al, 1998):

- a) Distonia focal: uma única parte do corpo é acometida.
- b) Distonia segmentar: duas ou mais regiões contíguas estão acometidas.
- c) Distonia multifocal: quando duas ou mais regiões não-contíguas estão acometidas.
- d) Distonia generalizada: distonia segmentar crural acompanhada do envolvimento de pelo menos um outro segmento corporal.
- e) hemidistonia: distonia unilateral envolvendo uma metade do corpo.

Os dados clínicos dos probandos se encontram no quadro 1. Foram avaliados 8 pacientes do sexo feminino e 6 do sexo masculino. A idade de início da doença variou entre 4,0 e 23,0 anos (média = 10,0 anos; mediana = 8,0 anos). O tempo de doença variou entre 1,0 e 35,0 anos (média = 13,5 anos; mediana = 11,0 anos).

Familiares dos probandos que se dispuseram a participar do estudo foram submetidos ao mesmo tipo de avaliação clínica. Seus dados clínicos encontram-se no quadro 2.

Avaliamos 31 familiares com idades entre 9 e 68 anos (média = 38,03 anos; mediana = 39,0 anos), sendo 16 do sexo feminino e 15 do sexo masculino. Dois probandos, BR 40 e AE 714, apresentavam história familiar positiva (inicialmente negada na avaliação do probando BR 40, mas posteriormente confirmada pelo exame dos familiares). Um probando apresentava história familiar provável (BR 39) e um apresentava história familiar possível para distonia (BR 11). No caso do probando BR 39, não foi possível examinar o familiar em questão, foi-nos apresentada uma fotografia onde o mesmo apresentava postura distônica cervical e optamos por considerar a história familiar para distonia como provável, e não definitiva. Em uma outra família (BR 11), a irmã do probando (BR 11-C) foi classificada dentro da definição de distonia possível, por apresentar um leve aumento da tensão da mão esquerda, com discreta extensão dos dedos, de forma não sustentada e apenas à extensão do membro superior.

Em relação à presença de outras doenças que não DTP, na família BR 40, o avô materno do probando (BR 40-G) recebeu o diagnóstico de Doença de Parkinson de acordo com os critérios internacionais (Litvan et al, 2003). Um tio paterno (BR 40-E) apresentava movimentos coreoatetóides no membro superior esquerdo (MSE) e discinesia orofacial, sem etiologia definida pela história e por investigação com CT e RNM de crânio.

A confidencialidade sobre os dados dos pacientes foi preservada, os dados da pesquisa foram mantidos em banco informatizado com acesso restrito aos pesquisadores. Aos pacientes foi dada a opção de conhecer ou não o resultado do teste genético para a mutação

no gene *DYT1*, com oferecimento de aconselhamento genético antes e após o teste genético. Os resultados das análises de haplótipos não foram revelados aos pacientes.

Quadro 1. Características clínicas dos pacientes brasileiros com distonia de torção primária de início precoce.

Código de identificação do paciente	Sexo	Idade ao I. exame (anos)	I. Ascendência	Idade de início (anos)	Tempo de doença (anos)	Local de início	Evolução	II.	Classificação	História familiar	Parente acometido
BR 8	F	43	JP	8	35	MIE	generalizou		generalizada	N	
BR 11	F	23	PO	4	19	MSD	generalizou		generalizada	Ps	Irmã**
BR 12	M	26	Brasileiros [†]	23	3	Cervical	generalizou		generalizada	N	
BR 16	F	20	ES/AF	9	11	MIE	generalizou		generalizada	N	
BR 18	M	34	PO/AF	16	18	MSD e tronco	generalizou		generalizada	N	
BR 28	F	20	AF	19	1	Cervical e tronco	cervical e tronco		segmentar	N	
BR 31	M	13	PO/AF	7	6	MSD e tronco	generalizou		generalizada	N	
BR 34	F	22	PO/IND	7	15	MIE	generalizou		generalizada	N	
BR 35	F	23	PO	5	18	MID	generalizou		generalizada	N	
BR 37	M	13	PO/IT	8	5	MID	generalizou		generalizada	N	
BR 36	F	42	IT	7	35	MSD	generalizou		generalizada	N	
BR 39	M	25	PO/AF	13	12	MSD	generalizou		generalizada	Pr	Tia paterna *
BR 40	M	13	ES/HU/IT/RU	8	5	MSD	generalizou		generalizada	S	Irmão
AE 714	F	12	Brasileiros [†]	6	6	MID	generalizou		generalizada	S	Irmão

F = feminino; M = masculino; MSE = membro superior esquerdo; MSD = membro superior direito; MIE = membro inferior esquerdo; MID = membro inferior direito; S = sim; N = não; Ps = possível; Pr = provável; AF = Africanos; ES = Espanhóis; HU = Húngaros; IND = Índios brasileiros; IT = Italianos; JP = Japoneses; PO = Portugueses; RU = Russos.

[†]pacientes não souberam dar maiores detalhes sobre sua ascendência.

* indivíduo não examinado, informação obtida através da história e de fotografia; ** distonia possível

Quadro 2: Características clínicas dos familiares dos probandos brasileiros com DTP de início precoce.

Probando/ Família	Familiar	Parentesco com o probando	Sexo	Idade (anos)	Etnia	III. stonia	Di de início	Idade de início	Local de início	IV. Distri buição	Classificação
BR 11	A	PAI	M	57	PO	N					
BR 11	B	MÃE	F	58	PO	N					
BR 11	C	IRMÃ	F	19	PO	Possível	?*	MSE	MSE		Focal
BR 11	D	IRMÃO	M	23	PO	N					
BR 11	E	IRMÃ	F	22	PO	N					
BR 12	A	IRMÃO	M	23	Brasileiros [†]	N					
BR 16	A	MÃE	F	61	ES/AF	N					
BR 16	B	IRMÃ	F	29	ES/AF	N					
BR 18	A	IRMÃ	F	26	PO/AF	N					
BR 31	A	PAI	M	42	PO/AF	N					
BR 31	B	MÃE	F	37	Brasileiros [†]	N					
BR 34	A	PAI	M	46	PO	N					
BR 34	B	MÃE	F	40	PO/IND	N					
BR 34	C	IRMÃO	M	18	PO/IND	N					
BR 35	A	MÃE	F	44	PO	N					
BR 36	A	MÃE	F	64	PO	N					
BR 37	A	MÃE	F	46	PO/IT	N					
BR 37	B	PAI	M	47	IT	N					
BR 39	A	PAI	M	54	PO	N					
BR 39	B	IRMÃ	F	21	PO/AF	N					

F = feminino; M = masculino; N = não; S = sim; ES = Espanhóis; PO = Portugueses; IT = Italianos; HU = Húngaros; AF = Africanos; RU = Russos; IND = Índios brasileiros; Pt = paterno; Mt = materno; MSD = membro superior direito; MSE = membro superior esquerdo; MID = membro inferior direito; MIE = membro inferior esquerdo.

*Paciente não estava ciente da possível distonia e não teve condições de estabelecer a idade de início.

[†] Pacientes não souberam dar maiores detalhes sobre sua origem étnica.

V.

Quadro 2 (continuação): Características clínicas dos familiares dos probandos brasileiros com DTP de início precoce.

Probando/ Família	Familiar	Parentesco com o probando	Sexo	Idade (anos)	Etnia	VI. stonia	Di idade de início	Local de início	VII. buição	Distri	Classificação	OBS
BR 40	A	PAI	M	36	ES/HU	N						
BR 40	B	MÃE	F	39	IT/RU	N						
BR 40	C	IRMÃO	M	15	ES/HU/IT/RU	S	12	MSD	MSD e MSE		Segmentar	
BR 40	D	IRMÃ	F	9	ES/HU/IT/RU	N						
BR 40	E	TIO Pt	M	46	ES/HU	N						Coreoatetose MSE e discinesia oral, início aos 42 anos
BR 40	F	AVÓ Pt	F	68	HU	N						
BR 40	G	AVÔ Mt	M	62	IT/RU	N						Doença de Parkinson, início aos 60 anos
AE 714	A	PAI	M	45	Brasileiros [†]	N						
AE 714	B	MÃE	F	43	Brasileiros [†]	N						
AE 714	C	IRMÃO	M	21	Brasileiros [†]	S	6	MSE	MSD, MSE, MID, MIE, FACE		generalizada	
AE 714	D	IRMÃO	M	18	Brasileiros [†]	N						

F = feminino; M = masculino; N = não; S = sim; ES = Espanhóis; PO = Portugueses; IT = Italianos; HU = Húngaros; AF = Africanos; RU = Russos;
IND = Índios brasileiros ; Pt = paterno; Mt = materno; MSD= membro superior D; MSE = membro superior esquerdo; MID = membro inferior D; MIE = membro inferior
esquerdo; S = sim; N = não.

*Paciente não estava ciente da possível distonia e não teve condições de estabelecer a idade de início.

[†] Pacientes não souberam dar maiores detalhes sobre sua origem étnica.

4.1.2. Avaliação Laboratorial

Após a avaliação clínica, os pacientes e seus familiares foram submetidos à punção venosa periférica para obtenção de sangue, utilizado para extração de DNA genômico. Familiares assintomáticos menores de 18 anos não foram submetidos à avaliação laboratorial.

Todos os reagentes foram adquiridos através do fornecedor Sigma-Aldrich, exceto quando especificados em contrário. As composições das soluções utilizadas se encontram no apêndice 1.

4.1.2.1. Extração de DNA

Foram coletados 10 ml de sangue em tubos com EDTA, que foram processados entre 24 e 48 horas após a coleta conforme o seguinte protocolo:

1. Centrifugação do sangue total a 3000 rpm por 10 min e subsequente descarte do plasma.
2. Adição de 5 a 10 ml de solução de lise seguida de centrifugação a 5000 rpm por 10 min e descarte do sobrenadante, repetindo-se este processo por duas vezes.
3. Ressuspensão do pellet de glóbulos brancos em 3 ml de solução de lise, redistribuição deste volume em 3 tubos Eppendorf® (1ml em cada tubo) e centrifugação a 5000 rpm por 10 min.
4. Para cada tubo Eppendorf®, efetua-se o descarte do sobrenadante e a seguir adiciona-se 475 µl de RSB e 25 µl de proteinase K (New England Biolabs). Ressuspende-se o pellet nesta solução e adiciona-se 25 µl de SDS 20%. Os tubos são então incubados em banho-maria a 37°C por 12 horas.
5. Adição 20 µl de solução de NaCl 5M e 1 volume de fenol (aproximadamente 500 µl), misturando-se por inversão.
6. Centrifugação a 14000 rpm por 8 minutos.
7. Transferência da fase aquosa a um novo tubo e adição de 250 µl de fenol e 250 µl de Sevag (24 clorofórmio:1 álcool isoamílico), misturando-se por inversão.
8. Centrifugação a 14000 rpm por 8 minutos.
9. Repetição dos itens 7 e 8.
10. Transferência da fase aquosa e adição de 500 µl de Sevag, misturando-se por inversão.
11. Centrifugação a 14000 rpm por 8 min.

12. Transferência da fase aquosa e adição de 500 µl de isopropanol, misturando-se por inversão.
13. Centrifugação a 14000 rpm por 5 min.
14. Descarte do isopropanol e adição de 500 µl de etanol 70% ao pellet.
15. Centrifugação a 14000 rpm por 5min.
16. Descarte do etanol e nova centrifugação rápida a 14000 rpm por 30 segundos.
17. Remoção do excesso de etanol com micropipeta.
18. Secagem do pellet à temperatura ambiente.
19. Ressuspensão do pellet em TE (20 a 100 µl) e estocagem do DNA a – 20°C.

4.1.2.2. Pesquisa da mutação 904_906delGAG no gene *DYT1*

A. Amplificação do DNA através da reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para pesquisa da mutação 904_906delGAG no éxon 5 do gene *DYT1* o DNA foi amplificado através de PCR, utilizando-se os *primers* (Sigma-Genosys) 6419 (5'CCTGGAATACAAACACCTA 3') e 6418 (5'GGTGGAAGGACTGAGTGTTG 3') (OZELIUS et al, 1997), sob as seguintes condições: 10X PCR Buffer (Applied Biosystems), 4,8µl de dNTP (0,2 mM), 9 pmol do *primer* 6419, 9 pmol do *primer* 6418, 10 a 100 ng de DNA, 0,45 U de Taq Polimerase *AmpliTaq Gold*[®] (Applied Biosystems) e H₂O para completar um volume de 20 µl.

Para a reação de PCR foi utilizado o termociclador GeneAmp[®] PCR System 2400 (Applied Biosystems), sob as seguintes condições:

- 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 min
- 35 ciclos subdivididos em 3 etapas:
 - a) desnaturação a 95°C por 30 segundos
 - b) anelamento a 55°C por 30 segundos
 - c) extensão a 72°C por 30 segundos
- 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min

O produto da reação, cujo tamanho esperado é de 253 pb, foi conferido através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (150V/ 30 min), corado com brometo de etídio e visualizado por transiluminação com luz ultravioleta.

B. Cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC)

O método de dHPLC foi utilizada para detecção da mutação 904_906delGAG com o WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, NE). Os produtos da reação de PCR foram eluídos de uma coluna analítica (Transgenomic) com um gradiente binário composto pelos tampões A (0,1 M de acetato de trietilamônio-TEAA) e B (0,1 M TEAA e 0,25% de acetonitrila), a um fluxo de 0,9 ml/min. Os gradientes de eluição e a temperatura ideal (58°C) foram determinados utilizando-se o software Transgenomic WAVEMaker (quadro 3). Sob essas condições, a mutação 904_906delGAG no éxon 5 do gene *DYTI* aparece como a formação de uma heterodúplex conforme ilustra a figura 3. Um controle positivo e um negativo para a deleção GAG foram utilizados em todas as reações.

Quadro 3. Gradientes dos tampões A e B em função do tempo de corrida utilizados em dHPLC para detecção da deleção GAG do *DYTI*.

tempo (min)	% tampão A	% tampão B
0	52	48
0,5	47	53
5,0	38	62
5,1	0	100
5,6	0	100
5,7	52	48
6,6	52	48

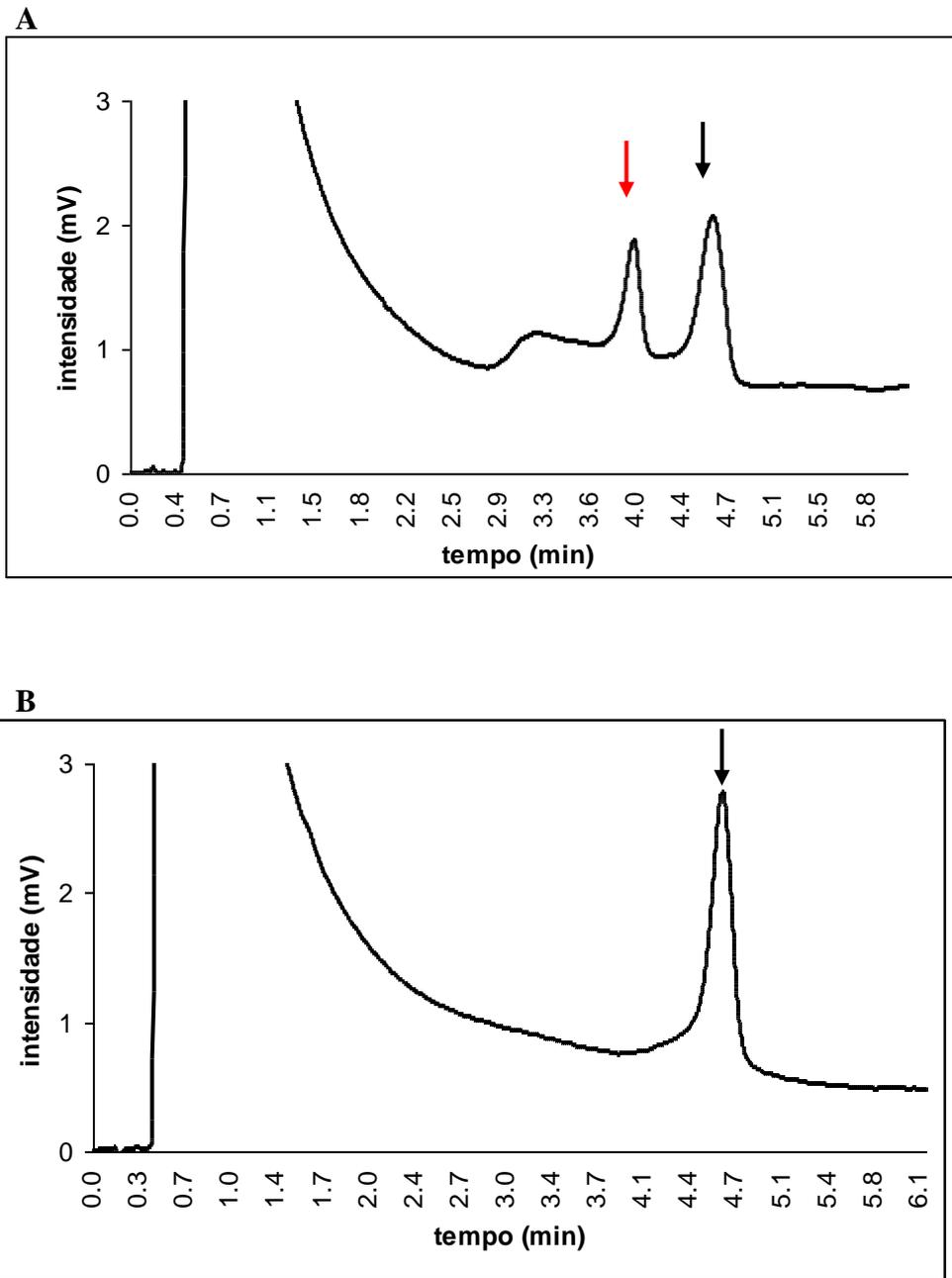


Figura 3. Padrões de dHPLC na pesquisa da mutação 904_906delGAG no *DYTI*. Em **A** vemos o padrão característico da presença na mutação: o primeiro pico, indicado pela seta vermelha, representa a heterodúplex anormal e o segundo pico, indicado pela seta em preto, representa a homodúplex normal. Em **B** vemos o padrão do controle normal, contendo apenas um pico correspondendo à homodúplex, indicado pela seta.

4.2. Pesquisa dos haplótipos relacionados à mutação 904_906delGAG no *DYT1*

4.2.1. Pacientes

Para este estudo, foram utilizadas amostras de DNA extraído de sangue venoso periférico de 28 indivíduos de ascendências diversas com diagnóstico definitivo de DTP de início precoce referidos ao Departamento de Genética Molecular do AECOM para pesquisa genética, incluindo um paciente brasileiro de nossa amostra anteriormente descrita, bem como seus familiares, que foram positivos para a deleção GAG no gene *DYT1*. Estas amostras fazem parte do banco de DNA de pacientes com distonia do Departamento de Genética Molecular do AECOM. Quando disponíveis, DNA dos familiares destes indivíduos foi utilizado para ajudar na construção dos haplótipos. Exceto pelo paciente BR 40, avaliado por nós dentro do grupo de brasileiros anteriormente descritos, os dados clínicos dos demais pacientes foram obtidos através do banco de dados de pacientes referidos ao Departamento de Genética Molecular do AECOM para testes genéticos. Estes dados estão ilustrados no quadro 4.

Quadro 4: Características clínicas de pacientes com distonia de torção primária positivos para a deleção GAG no *DYT1*.

Nº	País de origem	Ascendência judaica	Ascendentes	História familiar	Idade de início (anos)	Local de início (anos)	Idade ao exame	Sexo	Distribuição final
1*	Brasil	N	Espanhóis, Húngaros, Italianos e Russos	S	8	MSD	11	M	generalizada
2	EUA	S	Judeus asquenazitas	S	10	MIE	12	F	generalizada
3	EUA	S	Judeus asquenazitas	S	8	MSD	10	F	generalizada
4	EUA	S	Judeus asquenazitas	S	11	MIE	11	F	generalizada
5	EUA	S	Judeus asquenazitas	S	13	MIE	77	M	generalizada
6	EUA	S	Judeus sefaraditas	S	6	MSD	39	F	generalizada
7	EUA	N	Mexicanos e Estadunidenses	S	20	MID	67	F	multifocal
8	EUA	N	Austríacos, Húngaros e Britânicos	S	15	MSD	56	F	multifocal
9	EUA	N	Alemães, Irlandeses e Britânicos	N	7	MSD	38	M	generalizada
10	EUA	S	Judeus asquenazitas	S	13	MSD	35	M	generalizada
11	EUA	N	Britânicos	S	6	MIE	28	F	generalizada
12	EUA	N	Britânicos	S	7	MSD	27	M	generalizada
13	EUA	N	Estadunidenses (North Carolina)	D	5	MID	12	M	generalizada
14	EUA	N	Britânicos	N	7	MID	29	M	generalizada
15	Canadá	N	Franco-canadenses	S	9	MSE	67	M	generalizada
16	Canadá	N	Franco-canadenses	S	26	MSD	32	F	focal
17	EUA	N	Alemães	S	8	MID	12	M	generalizada
18	EUA	N	Irlandeses	S	9	MIE	12	F	generalizada
19	EUA	S	Judeus asquenazitas	Possível	20	MSD	63	M	segmentar
20	EUA	N	Alemães, Espanhóis, habitantes do sudeste asiático e ilhas do pacífico	S	17	MIE	35	F	generalizada
21	EUA	N	Alemães	S	9	MID	42	M	generalizada
22	EUA	N	Irlandeses	S	6	MID	42	M	generalizada
23	Japão	N	Japoneses	N	10	MSE	32	F	generalizada
24	China	N	Chineses, Japoneses	N	10	MSE	18	M	segmentar
25	Japão	N	Japoneses	N	7	MSD	15	F	generalizada
26	México	N	Mexicanos	S	7	MID	17	F	generalizada
27	EUA	N	Estadunidenses (North Carolina/ Tennessee)	S	7	MSD	27	F	focal
28	EUA	N	Suecos	D	4	MID	8	M	generalizada

S = sim; N = não; D = desconhecida; MSD = membro superior direito; MSE = membro superior esquerdo; MID = membro inferior direito; MIE = membro inferior esquerdo; M = masculino; F = feminino.

* Este paciente corresponde ao probando BR 40, apresentado no quadro 1.

4.2.2. Genotipagem

Para estabelecimento dos haplótipos relacionados à mutação 904_906delGAG no *DYTI*, foram utilizados os seguintes marcadores genéticos (repetições microssatélites) localizados ao longo de uma distância de aproximadamente 400 kb na vizinhança do gene *DYTI*, na região 9q34, com suas respectivas taxas de heterozigosidade entre parenteses: D9S159 (0,79), D9S2160 (0,75), D9S2161 (0,79), D9S63 (0,89), D9S2162 (0,76). A reação de PCR para amplificar cada marcador foi realizada sob as mesmas condições previamente descritas, a não ser pela modificação da temperatura de anelamento de acordo com o par de *primers* e pela utilização de um marcador fluorescente na porção 5' de um dos *primers* de cada par (quadro 5).

O tamanho dos produtos de PCR esperados para cada reação estão ilustrados no apêndice 2. Para fins de praticidade e comparação com a literatura existente (OZELIUS et al, 1997), para cada tamanho de marcador foi atribuído um número específico aleatório, que não corresponde ao tamanho real das repetições (apêndice 2). Por exemplo, o marcador D9S159 com 291 pb foi chamado de número 4, D9S159 com 293 pb foi chamado de 5, e assim por diante. Em todas as reações, utilizamos como controle o DNA de um paciente judeu asquenazita positivo para a deleção GAG e com o haplótipo sabidamente relacionado à mutação fundadora (12-4-5-16-4), já estabelecido por estudos anteriores (OZELIUS et al, 1992; OZELIUS et al, 1997a). A figura 4 ilustra a posição dos marcadores estudados na região 9q34.

Para genotipagem, 1 µl de uma diluição 1:2 do produto de PCR foi misturado a 1,5 µl de uma solução própria para genotipagem contendo o marcador padrão de DNA para determinação do tamanho dos alelos GeneScan®-500 [TAMRA]TM (ABI Prism). Após desnaturação a 95°C por 2 minutos, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e logo a seguir submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 5% em tampão TBE, a 3000V, por 2h30min no seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). Este aparelho promove uma excitação a laser dos marcadores fluorescentes incorporados aos produtos de PCR e permite a análise do tamanho dos alelos através dos softwares GeneScan e Genotyper 2.5 (PerkinElmer, Wellesley, MA). Após a corrida, é possível verificar os tamanhos dos dois alelos que o indivíduo apresenta para cada marcador e compará-los com o de seus pais e irmãos. Por exemplo, se um indivíduo for positivo para a mutação no *DYTI* e sua mãe também o for, sabemos que aqueles alelos herdados dela estão ligados ao gene com mutação. Os alelos que ela tiver neste cromossomo, próximos ao *DYTI*, serão também

repassados para seu filho juntamente com a mutação e, através da análise de haplótipos desta região, é possível estabelecer em qual dos dois cromossomos 9 da mãe e do filho se encontra a mutação.

Quadro 5 : Primers, com suas respectivas temperaturas de anelamento, utilizados na reação de PCR para a amplificação dos marcadores genéticos (repetições microssatélites).

Marcador genético	Primer	Marcador fluorescente	temperatura de anelamento
D9S159	*5'CTTTCTGACGGCAGCCAGGT3' 5'AGCTGGAATGAGTGCTGGGC3'	TET™	59°C
D9S2160	*5'ACCCTGTGTCAAGGAAATGC3' 5'CATGAGCCAATTATATGGCA3'	FAM™	56°C
D9S2161	*5'CAATGTCTGTGCTAAACTACAG3' 5'CATAGATAGAGAGATAGGCAG3'	TET™	56°C
D9S63	*5'CCGGAAGTACTCTAGTCTA3' 5'TTATAATGCCGGTCAACCTT3'	FAM™	55°C
D9S2162	*5'CAAGAGCAAGACCCTGTCTCG3' 5'GATCAGTCTACTACTCAGTGC3'	FAM™	64°C

* primer com marcador fluorescente na posição 5'

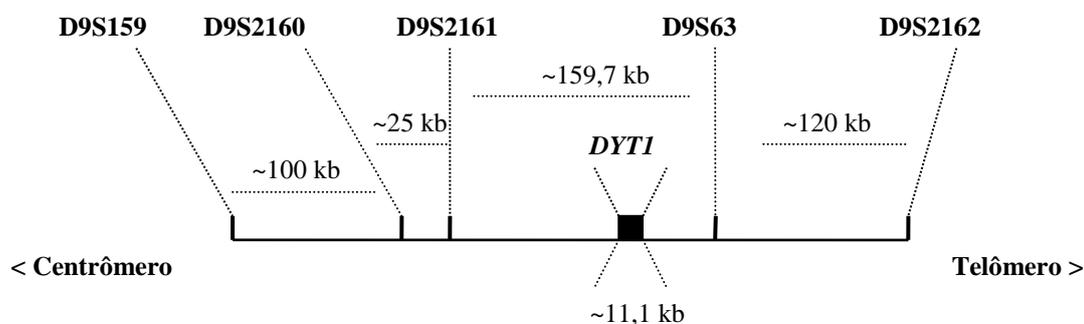


Figura 4: Região cromossômica 9q34 contendo os marcadores genéticos utilizados na construção dos haplótipos e o gene *DYT1*. As distâncias aproximadas entre os marcadores, bem como o tamanho do gene, foram estimados tendo por base os dados de Ozelius e colaboradores (OZELIUS et al, 1997a) e o banco de dados UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>).

5. RESULTADOS

5.1 Pesquisa da mutação 904_906delGAG no *DYTI* em pacientes brasileiros com distonia primária de início precoce.

Os resultados da pesquisa da mutação 904_906delGAG no *DYTI* nos probandos com DTP de início precoce estão ilustrados no quadro 6.

Quadro 6. Resultado da pesquisa da mutação 904_906delGAG no *DYTI* em pacientes brasileiros distonia de torção primária de início precoce.

Paciente	mutação
BR 8	Ausente
BR 11	Ausente
BR 12	Ausente
BR 16	Ausente
BR 18	Ausente
BR 28	Ausente
BR 31	Ausente
BR 34	Ausente
BR 35	Ausente
BR 37	Ausente
BR 36	Ausente
BR 39	Ausente
BR 40	Presente
AE 714	Ausente

Dentre os 14 probandos brasileiros estudados, 1 foi positivo para mutação 904_906delGAG no *DYTI* e os demais foram negativos para a mesma.

Na família do probando positivo para a mutação (BR 40), investigamos a mutação em todos os outros membros maiores de idade (quadro 2). Sua mãe assintomática (BR 40-B) e seu irmão afetado (BR 40-C) revelaram-se positivos para a mesma. Os demais membros foram negativos para a mutação.

5.2. Pesquisa dos haplótipos relacionados à da mutação 904_906delGAG no *DYTI*.

Os haplótipos identificados estão ilustrados no quadro 7. Apesar de não ter sido possível estabelecer a fase para todos os pacientes (devido à ausência de familiares disponíveis ou por estes não terem sido informativos), eles foram divididos em 12 grupos potenciais de acordo com a semelhança entre os marcadores, principalmente os mais próximos ao gene *DYTI* (D9S2160 e D9S63). Identificamos pacientes com ascendências diferentes, mas haplótipos semelhantes e pacientes que, dentro de uma mesma ascendência, possuem haplótipos diferentes.

A análise dos haplótipos revelou uma mutação nova (mutação “de novo”) na família brasileira (BR 40). O avô materno do probando (BR 40-G) possui o haplótipo ligado à doença, mas não a mutação 904_906delGAG no *DYTI* (figura 5). Nesta família, a mutação foi detectada pela primeira vez na geração da mãe do probando (BR 40-B), a qual apresenta o haplótipo da doença e a mutação 904_906delGAG no *DYTI*. Inferimos que a mutação ocorreu pela primeira vez nesta família no processo de gametogênese do indivíduo BR 40-G e foi herdada por sua filha (BR 40-B).

Quadro 7: Haplótipos da região 9q34 de pacientes com distonia de torção primária positivos para a mutação 904_906delGAG no *DYT1*.

Subgrupo	Nº	País de origem	Ascendência judia	Ascendentes	D9S159	D9S2160	D9S2161	D9S63	D9S2162
1	1*	Brasil	N	Espanhóis, Húngaros, Italianos e Russos	18	5	1	0	3
2	2	EUA	S	Judeus asquenazitas	12	4/3	5	16	4
	3	EUA	S	Judeus asquenazitas	12/4	4/5	5/2	16	4
	4	EUA	S	Judeus asquenazitas	12	4	4/2	16	4
	5	EUA	S	Judeus asquenazitas	12	4	4	16	4
	6	EUA	S	Judeus sefaraditas	12	4	5	16	4
	7	EUA	N	Mexicanos e Estadunidenses	12	4	5	16	4
	8	EUA	N	Austríacos, Húngaros e Britânicos	12	4	5/2	16	4
	9	EUA	N	Alemães, Irlandeses e Britânicos	6/22	4/3	5/1	16/16	4/2
	3	10	EUA	S	Judeus asquenazitas	12	3	5	18
4	11	EUA	N	Britânicos	12	5	5	2	4
	12	EUA	N	Britânicos	12	5/3	5	2	4
	13	EUA	N	Estadunidenses (North Carolina)	12	5	5	2	6
	14	EUA	N	Britânicos	16/18	5/6	5/3	2/0	4/1
5	15	Canadá	N	Franco-canadenses	14	4	2	14	4
	16	Canadá	N	Franco-canadenses	14	4	2	14	4
6	17	EUA	N	Alemães	16	5	4	14	4
	18	EUA	N	Irlandeses	16	5	4	14	4
	19	EUA	S	Judeus asquenazitas	16/14	5	4/5	14/18	4/2
	20	EUA	N	Alemães, Espanhóis, habitantes do sudeste asiático e ilhas do pacífico	4/12	5/2	4/2	14/16	2/5
7	21	EUA	N	Alemães	16	5	2	6	5
	22	EUA	N	Irlandeses	4	5	2	6	5
8	23	Japão	N	Japoneses	4	5	2	0	4
	24	China	N	Chineses, Japoneses	14	1	2/4	0	4
9	25	Japão	N	Japoneses	4	3	4	-1	2
10	26	México	N	Mexicanos	16	5	5	12	2
11	27	EUA	N	Estadunidenses (North Carolina/ Tennessee)	16	5	2	16	-1
12	28	EUA	N	Suecos	12/16	3/4	4	2/6	2/3

S = sim; N = não

* Este paciente corresponde ao probando BR 40, apresentado no quadro 1.

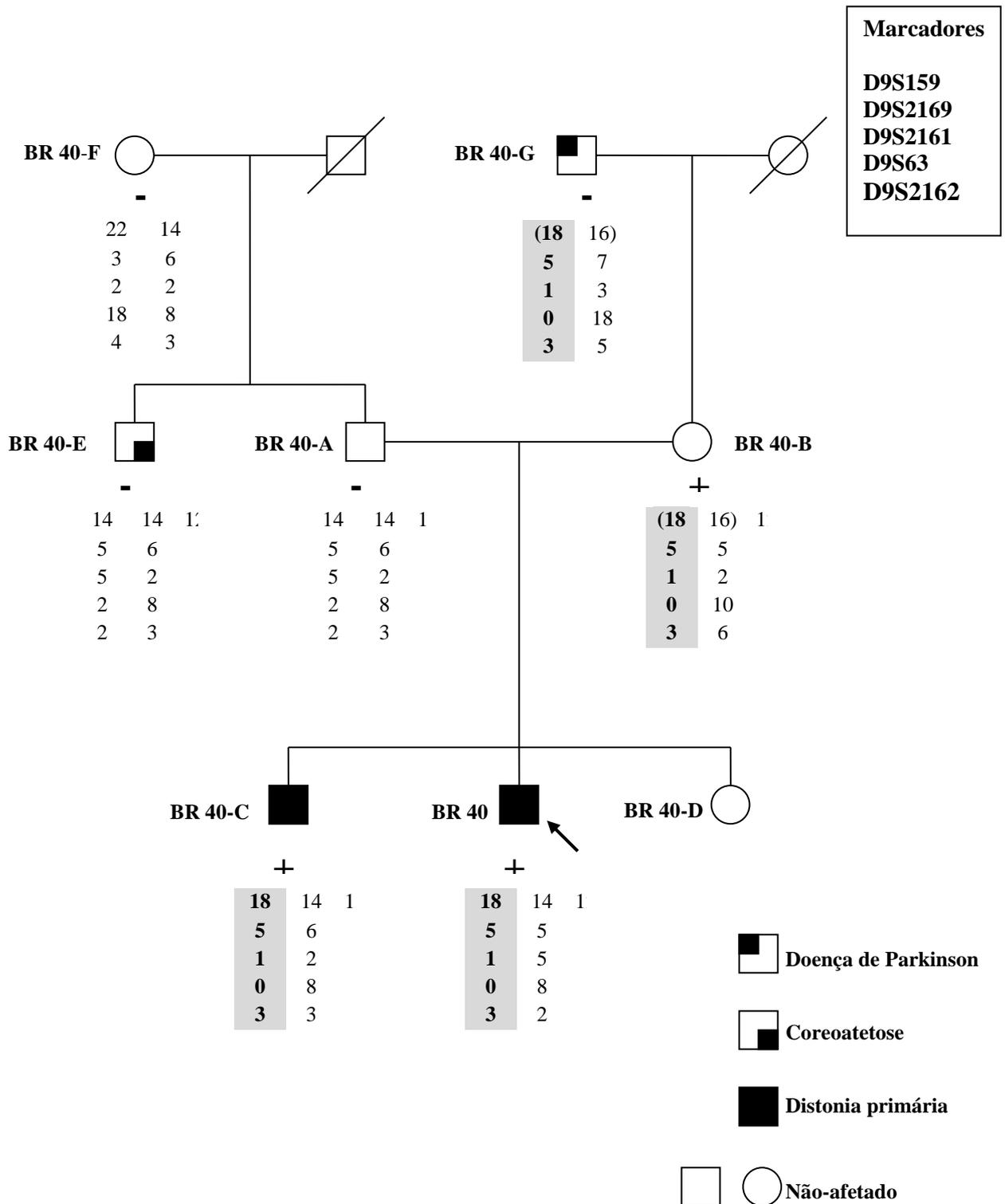


Figura 5. Pedigree da família BR 40 e haplótipos na região 9q34. A seta indica o probando, indivíduos positivos para a deleção GAG no *DYT1* são indicados pelo sinal “+” e os negativos para a mutação são indicados pelo sinal “-”. O indivíduo BR 40-D não foi submetido à análise genética. A ordem dos marcadores genéticos no cromossomo é mostrada no quadro-chave. Haplótipos destacados em cinza estão ligados à presença da deleção GAG no *DYT1*. O indivíduo BR 40- G apresenta o haplótipo relacionado à mutação, mas não apresenta a mesma, indicando que esta apareceu pela primeira vez em suas células germinativas e foi herdada pelo indivíduo BR 40-B.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular das DTP é uma ferramenta importante na compreensão da fisiopatologia desta vasta gama de doenças. Muito embora ainda não haja um tratamento curativo para essas doenças, o diagnóstico molecular abre perspectivas do ponto de vista do aconselhamento genético e da busca de novas terapêuticas.

Desde a sua descoberta em 1997 (OZELIUS et al, 1997), a deleção GAG no *DYTI* vem sendo pesquisada em pacientes com DTP de início precoce no mundo todo (VALENTE et al 1998; GASSER et al, 1998; KAMM et al, 1999; KLEIN et al, 1999b; LEBRE et al, 1999; VALENTE et al, 1999; BRASSAT et al, 2000; MAJOR et al, 2001; MATSUMOTO et al, 2001; HJERMIND et al, 2002; IKEUSHI et al, 2002; ZORZI et al, 2002). Até hoje, esta é a única mutação descrita neste gene relacionada aos casos de DTP de início precoce, a investigação de outras regiões do *DYTI* em pacientes com o fenótipo típico e negativos para a deleção GAG nunca revelou outros tipos de mutações (OZELIUS et al, 1997; OZELIUS et al, 1999; TUFFERY-GIRAUD et al, 2001; KABAKCI et al, 2004).

Estima-se que a deleção GAG no *DYTI* seja responsável pelos casos de DTP de início precoce em 50 a 60% entre os não-judeus e por 90% dos casos entre judeus asquenazitas (OZELIUS et al, 1999). De acordo com alguns estudos, cerca de 20 a 50% dos casos típicos de DTP de início precoce não apresentam mutações no *DYTI*, o que demonstra a heterogeneidade genética e a complexidade desta doença (VALENTE et al, 1998; OZELIUS et al, 1999; LEBRE et al, 1999; KLEIN et al, 1999; TUFFERY-GIRAUD et al, 2001). É provável que haja outros genes envolvidos com diferentes mutações determinando fenótipos semelhantes.

Numa grande coorte de 550 pacientes pesquisados para mutação no *DYTI*, um dos maiores estudos realizados até hoje, foram avaliados 36 pacientes com fenótipo típico, 293 casos de distonia focal de início tardio, 7 casos de distonia segmentar de início tardio, 149 casos de distúrbios do movimento não-classificáveis (“unclassified movement disorders” – *sic*), 31 indivíduos não-afetados em risco de serem portadores da mutação e 7 casos de diagnóstico pré-natal (KLEIN et al, 1999). Na categoria de “não-classificáveis” foram incluídos indivíduos sobre os quais não se obteve informações clínicas detalhadas, não sendo possível inferir quantos deles realmente possuíam distonia. Dos 36 pacientes com fenótipo típico, 26 (72,2%) foram positivos para a mutação (KLEIN et al, 1999). Dos outros 10 indivíduos negativos para a mutação, a revisão clínica de 5 deles revelou que, na verdade, se tratavam de casos atípicos. Dentre os 293 casos de distonia focal de início tardio, apenas 2

carregavam a mutação (< 1%) e ambos tinham história familiar de distonia. Dos 7 indivíduos com distonia segmentar de início tardio, apenas 1 foi positivo para a mutação, também com história familiar positiva. Dos 149 casos de distúrbios do movimento não-classificáveis, 19 (12,8%) foram positivos para a mutação. Entre os 31 indivíduos em risco, 17 foram positivos, assim como 3 dos 7 casos submetidos a diagnóstico pré-natal. Klein e colaboradores encontraram a mutação no *DYT1* em 72,2% dos casos típicos de DTP de início precoce e em apenas 0,09% dos casos considerados atípicos (casos atípicos com início precoce, casos com início tardio focal, multifocal ou segmentar). Esses dados reforçaram o que já havia sido proposto por Bressman e colegas, que os critérios clínicos para classificação do fenótipo como sendo típico (início em um membro com generalização posterior e pouco ou nenhum acometimento crânio-cervical) e o início precoce da doença são bastante sensíveis e específicos para indicação de teste genético para mutações no *DYT1* em pacientes com DTP (BRESSMAN et al, 1994a). A aplicação de critérios clínicos rigorosos leva a uma previsão correta dos portadores desta mutação em mais de dois terços dos casos.

De uma maneira geral, 57,4% dos casos positivos para a mutação na coorte estudada por Klein e colaboradores apresentavam história familiar positiva para distonia, sendo 26,8% deles pertencentes ao grupo étnico de JA (KLEIN et al, 1999). Dos casos com início tardio positivos para a mutação, todos apresentavam história familiar positiva, o que corrobora com outros estudos mostrando que, nos casos de início tardio, existe alguma chance de se encontrar a mutação, desde que haja história familiar de distonia (BRESSMAN et al, 1994a; OZELIUS et al, 1997b). Dos 26 pacientes com início precoce e fenótipo clássico positivos para a mutação, 11 tinham história familiar negativa para distonia e 3 apresentavam história desconhecida (KLEIN et al, 1999). Isso demonstra que a ausência de história familiar nos casos de início precoce não deve ser um critério de contra-indicação para a pesquisa de mutação no *DYT1*. A ausência de história familiar pode ser decorrente da baixa penetrância da mutação e da ocorrência de mutações novas (KLEIN et al, 1998a; OZELIUS et al, 1998b; HJERMIND et al, 2002).

Em nossa amostra de 14 pacientes, 10 apresentavam fenótipo clássico da distonia ligada ao *DYT1*: idade de início abaixo dos 26 anos, variando entre 4 e 13 anos (média = 7,5 anos), início focal, acometendo o membro superior ou inferior, progredindo posteriormente para a forma de distonia generalizada. Quatro pacientes apresentaram início da doença um pouco atípico, 2 com acometimento inicial simultâneo do MSD e do tronco, 1 com

acometimento inicial da região cervical e do tronco e 1 com acometimento cervical inicial. Neste grupo, a idade de início da doença variou entre 7 e 23 anos (média = 16,25 anos) e todos evoluíram para a forma generalizada da doença, exceto pelo paciente BR 28, que mantém a forma segmentar, mas como sua história de evolução é de apenas um ano, não é possível estabelecer desde já se a doença apresentará progressão para a forma generalizada ou não.

À anamnese, apenas dois dentre os 14 pacientes referiram história familiar positiva para distonia (BR 39 e AE 714). Todos os outros pacientes negavam história familiar, mas o exame de familiares do probando BR 40 revelou que seu irmão mais velho (indivíduo BR 40-C na figura 5) era portador de distonia definitiva nos membros superiores, caracterizada por câimbra do escrivão bilateral, fato até então desconhecido pela família. Este fato ilustra a importância do exame de familiares mesmo quando há uma história aparentemente negativa para distonia.

Apenas um dos probandos de nossa amostra revelou-se positivo para a mutação no *DYT1* (BR 40). Este paciente preencheu todos os quesitos que definem o fenótipo clássico da distonia ligada ao *DYT1* e apresentou história familiar positiva. A mutação foi encontrada também em seu irmão afetado e em sua mãe assintomática. Esta família é particularmente interessante por apresentar mais dois distúrbios do movimento, além da distonia, em indivíduos negativos para a mutação no *DYT1*. O avô materno do probando apresenta Doença de Parkinson e o tio paterno apresenta coreoatetose de membro superior e discinesia oral. É possível que outros fatores facilitadores genéticos ou ambientais estejam envolvidos nestas patologias.

Nenhum dos outros 9 pacientes com fenótipo clássico, bem como todos os outros 4 com fenótipo ligeiramente atípico, apresentou a mutação. Inicialmente, poderíamos atribuir a diferença entre os nossos achados e os da literatura ao baixo número de pacientes com história familiar claramente positiva em nossa amostra. Nos grandes estudos, onde dois terços dos indivíduos com DTP de início precoce apresentam a deleção GAG no *DYT1*, cerca de 60% a 88% destes têm história familiar positiva para distonia (VALENTE et al, 1998; OZELIUS et al, 1999; KLEIN et al, 1999; KABACKCI et al, 2004). É possível que obtivéssemos resultados semelhantes aos destes estudos se o número de casos familiares em nossa amostra fosse maior. O paciente AE714 apresenta fenótipo clássico e história familiar positiva, mas não possui a deleção GAG no *DYT1*. Ainda não há dados consistentes na

literatura que nos permitam inferir qual a porcentagem aproximada de pacientes com fenótipo clássico e história familiar positiva que não apresentam esta mutação.

Com relação aos casos esporádicos com fenótipo típico esperávamos que, pelo menos, uma pequena porcentagem destes fossem positivos para a mutação, de acordo com os achados da literatura (KLEIN et al, 1999). Porém, isto não foi observado em nossa amostra. É pouco provável que estes sejam casos de distonia secundária, já que os critérios de seleção foram bastante rigorosos no sentido de excluir pacientes que não tivessem sido investigados para afastar causas secundárias ou cujas histórias tivessem elementos que dessem margem a dúvidas quanto à possibilidade de causas secundárias. O pequeno tamanho da nossa amostra não nos permite extrapolar esses dados para a população de pacientes brasileiros com DTP, porém nosso resultado sugere que esta mutação não seja comum em pacientes com fenótipo clássico da distonia ligada ao *DYTI* sem história familiar. Neste aspecto, nossos resultados contrastam com os de Klein e colegas (KLEIN et al, 1999): numa mostra um pouco maior do que a nossa, estes investigadores estudaram 36 pacientes com fenótipo clássico (sendo que, posteriormente, 5 foram reavaliados e receberam outros diagnósticos), 26 pacientes foram positivos para a mutação no *DYTI* e 11 destes não tinham história familiar positiva para distonia. Em um outro estudo feito com pacientes em sua maioria britânicos, dos 25 casos considerados como tendo o fenótipo típico da distonia ligada ao *DYTI*, 10 foram negativos para a mutação (VALENTE et al, 1998). No entanto, este estudo não deixa claro quantos destes 10 casos com fenótipo clássico tinham história familiar positiva para distonia. Os autores referem que, dentre os casos positivos para a mutação, com ou sem o fenótipo clássico, 88% apresentavam história familiar positiva. As diferenças entre os nossos achados e os descritos por Klein e colaboradores poderiam ser atribuídas às diferenças étnicas entre os grupos estudados. No entanto, como não há relato de que estes autores tenham estudado outros membros das famílias dos indivíduos positivos para a mutação, mas sem história familiar, talvez eles sejam casos pseudo-esporádicos, uma vez que a penetrância do gene com esta mutação é incompleta. Só poderíamos afirmar que se tratam de casos esporádicos reais se os pais ou outros membros da família destes pacientes tivessem sido estudados. Portanto, é possível que esta mutação seja realmente pouco freqüente nos casos esporádicos. Porém, o pequeno número de nossa amostra não nos permite afirmar com segurança que a ausência de história familiar positiva para distonia deva ser um critério de exclusão na indicação de testes genéticos para o *DYTI* entre brasileiros com DTP de início precoce e fenótipo clássico.

A presença de mais de um caso de distonia na família do probando AE 714 e a história fortemente sugestiva de distonia em mais de um membro da família do probando BR 39, que têm o fenótipo clássico e não apresentam a deleção GAG no *DYT1*, é mais uma evidência da heterogeneidade genética desta doença. Existe ainda a hipótese de estes pacientes possuírem outro tipo de mutação no gene *DYT1*, ou serem hemizigóticos na região deste gene. Porém, de acordo com estudos já realizados, onde centenas de pacientes com fenótipo clássico foram submetidos ao exame deste gene em toda sua extensão sem que nenhuma outra mutação fosse encontrada, esta hipótese é pouco provável (OZELIUS et al, 1997b; OZELIUS et al, 1999; LEUNG et al, 2001; TUFFERY-GIRAUD et al, 2001; KABACKCI et al, 2004). Levando-se em conta os dados negativos destas pesquisas anteriores e questões referentes ao alto custo envolvido na investigação, o exame do gene *DYT1* em toda sua extensão não tem sido indicado rotineiramente nos laboratórios que oferecem este tipo de investigação. Mesmo em casos com história familiar positiva para DTP, até hoje não se encontrou outro tipo de mutação no *DYT1*. Do ponto de vista da prática clínica, na ausência de uma terapêutica eficaz baseada no diagnóstico molecular até o presente momento, não se indicam testes para o estudo do *DYT1* em toda sua extensão, devido ao alto custos dos mesmos sem que até agora haja indícios de que possam trazer informações adicionais. A partir do momento em que existir uma terapêutica eficaz baseada no diagnóstico molecular, associada ao barateamento dos custos de testes genéticos, acreditamos que esta tendência mundial atual deverá ser revista.

Nos primeiros estudos de ligação em pacientes com DTP de início precoce, detectou-se desequilíbrio de ligação entre marcadores na região 9q32-34 entre AJ (KRAMER et al, 1990; OZELIUS et al, 1992). Diversas famílias desta etnia carregavam o mesmo haplótipo na região do gene, indicando que, nesta população, a grande maioria dos casos é decorrente de uma única mutação fundadora que ocorreu num ancestral comum (BRESSMAN et al, 1994a; RISCH et al, 1995). Posteriormente, com a identificação do gene *DYT1*, verificou-se que estas famílias possuíam exatamente a mesma mutação, 904_906delGAG (OZELIUS et al, 1997b). Estima-se que, entre JA, a deleção GAG no *DYT1* tenha ocorrido pela primeira vez há cerca de 350 anos na região da Lituânia e na Bielo-Rússia (RISCH et al, 1995). Cerca de 90% dos casos desta mutação teriam sido herdados de um ancestral comum, onde ela apareceu pela primeira vez (BRESSMAN et al, 1994a; RISCH et al, 1995). No entanto, desde a descoberta do *DYT1*, inúmeras pessoas com DTP de início precoce no mundo todo vêm

sendo identificadas como sendo portadoras desta mesma mutação (VALENTE et al, 1998; GASSER et al, 1998; KAMM et al, 1999; KLEIN et al, 1999b; LEBRE et al, 1999; VALENTE et al, 1999; BRASSAT et al, 2000; MAJOR et al, 2001; MATSUMOTO et al, 2001; HJERMIND et al, 2002; IKEUSHI et al, 2002). Pacientes com origens étnicas bastante diferentes tornam pouco provável a hipótese de que esta mutação teria ocorrido raras vezes como evento independente e se disseminado no mundo inteiro através de eventos migratórios seguidos de miscigenação populacional. Além dos estudos originais de Ozelius e Kramer (OZELIUS et al, 1989; KRAMER et al, 1990; OZELIUS et al, 1992; KRAMER et al, 1994), foram poucos os que analisaram os haplótipos destes indivíduos de maneira sistemática, portanto é difícil definir qual a frequência de eventos independentes nestes diferentes grupos e qual seria a incidência de mutações novas (KLEIN et al, 1998a; LEBRE et al, 1999; KAMM et al, 1999; VALENTE et al, 1999; HJERMIND et al, 2002; IKEUSHI et al, 2002). A deleção GAG no *DYTI* é um dos raros exemplos de uma única mutação que aparece de forma recorrente em diferentes grupos populacionais, causando uma doença AD.

Com o objetivo de averiguar a ocorrência de eventos independentes gerando o mesmo tipo de mutação, avaliamos os haplótipos na região 9q34 de 28 pacientes portadores da deleção GAG no *DYTI* e para tal utilizamos repetições microssatélites na vizinhança deste gene (D9S159, D9S2160, D9S2161, D9S63 e D9S2162). Sete destes pacientes referiram ascendência judia, os outros referiam ascendências variadas, conforme ilustram os quadros 4 e 7. Levando-se em conta a semelhança entre os alelos encontrados, particularmente os mais próximos ao *DYTI*, D9S2161 e D9S63, observamos que este grupo apresenta, no mínimo, 12 haplótipos diferentes (quadro 7). Não foi possível estabelecer a fase para todos os marcadores em alguns pacientes, algumas vezes por falta de familiares disponíveis para ajudar na definição dos haplótipos, outras vezes porque os familiares não foram suficientemente informativos. Nestes casos, optamos por colocar estes pacientes em grupos onde houvesse a maior semelhança, fosse pela similaridade entre os haplótipos propriamente, ou porque os pacientes apresentavam ascendências semelhantes.

Dentre os 6 pacientes que referiam ascendência judia asquenazita, quase todos apresentaram o haplótipo relacionado à mutação fundadora nesta população: 12-4-5-16-4 (OZELIUS et al, 1992). Os pacientes 4 e 5 apresentavam o alelo 4 em vez do 5 no marcador D9S2161, e estes resultados foram confirmados por genotipagens realizadas em 3 momentos diferentes. Devido à pequena distância entre os marcadores, um evento de dupla

recombinação acima e abaixo deste marcador seria pouco provável, porém não impossível. Acreditamos que a explicação mais provável para esta discrepância de tamanhos em apenas um dos marcadores tenha sido um deslizamento do DNA durante o processo de replicação. O marcador D9S2161 é uma repetição de tetranucleotídeos, não é tão incomum que ocorra deleção de uma das repetições durante o processo de replicação, levando a uma banda com o tamanho menor do que o esperado (neste caso, levando ao aparecimento do alelo 4 com 158 pb ao invés do alelo 5 com 162 pb. Dois pacientes deste grupo étnico, 10 e 19, não apresentavam o haplótipo fundador. O paciente 19 poderia se encaixar no subgrupo 6, mas como não foi possível estabelecer a fase, não podemos fazer esta afirmação com certeza. Estima-se que 90% dos JA com DTP ligada ao *DYTI* apresentam o haplótipo fundador (BRESSMAN, et al 1994a; RISCH et al, 1995), esses pacientes com haplótipos diferentes fazem parte de uma pequena porcentagem de indivíduos e demonstram que, mesmo entre JA, a deleção GAG é fruto de mais de um evento independente. Curiosamente, os pacientes 7 e 8, que negavam ser descendentes de JA, apresentaram o haplótipo fundador deste grupo étnico. Neste caso, seria mais provável a explicação de que eles desconheciam sua origem étnica em detalhes, sendo possível que tivessem um ancestral JA. Na população em geral, podemos encontrar alguns alelos de tamanhos semelhantes aos encontrados entre JA, mas seria pouco provável que estes indivíduos apresentassem exatamente todos os alelos correspondentes ao haplótipo fundador dos JA sem que pertencessem a este grupo étnico. Esta região já foi estudada entre judeus e não-judeus e este haplótipo específico só foi encontrado em desequilíbrio de ligação entre JA com DTP de início precoce (OZELIUS et al, 1989; KRAMER et al, 1990; OZELIUS et al, 1992; KRAMER et al, 1994). Não pudemos estabelecer a fase para os marcadores do paciente 9, mas potencialmente ele poderia apresentar o mesmo haplótipo dos JA, na região abaixo do marcador D9S159. O paciente 6, que acreditava ser descendente de judeus sefaraditas, na verdade apresentou o haplótipo dos JA.

O grupo 4 é composto por pacientes com ascendência britânica e por um estadunidense que não soube informar detalhes sobre sua ascendência (indivíduo 13). Não foi possível estabelecer a fase do paciente 14, mas potencialmente ele poderia se encaixar neste grupo. Todos os pacientes apresentam alelos em comum entre os marcadores D9S2160 e D9S63, 3 deles possuem também alelos em comum na região do marcador D9S159 ou na região do D9S2162, nem todos têm os mesmos alelos nestas regiões que delimitam o

haplótipo, provavelmente por recombinações históricas. Comparamos os nossos dados aos de Valente e colaboradores, que estudaram os haplótipos de britânicos com DTP e deleção GAG no *DYT1*, utilizando parte dos marcadores por nós estudados: D9S2160, D9S2161, D9S63 e D9S2162 (VALENTE et al, 1999). Entre britânicos não-judeus, 2 indivíduos apresentavam haplótipos idênticos ao que nós encontramos em nossos pacientes: 5-5-2-4, destacado em cinza no quadro 8. É provável que os pacientes estadunidenses com este haplótipo descendam de um grupo de britânicos que já possuíam esta mutação quando imigraram para os EUA.

Pacientes do grupo 5, com ascendência franco-canadense, apresentaram o mesmo haplótipo, uma evidência de que a mutação surgiu num ancestral comum. Não encontramos semelhanças deste haplótipo com os dos pacientes franceses descritos por Lebre e colaboradores (quadro 8) (LEBRE et al, 1999). Os pacientes franco-canadenses provavelmente descendem de um outro grupo de franceses diferentes daqueles pesquisados por Lebre e colaboradores, não temos elementos suficientes para estabelecer se a mutação nos franco-canadenses foi introduzida neste grupo antes da imigração dos franceses ou se surgiu no próprio Canadá, como um evento independente mais recente.

Pacientes do grupo 8 apresentam alelos em comum do marcador D9S2161 ao D9S2162. Através da análise de haplótipos observamos que o paciente 24, com ascendência chinesa e japonesa, herdou o cromossomo com a mutação de sua mãe, de etnia japonesa. A semelhança entre parte dos alelos destes marcadores sugere que os indivíduos deste grupo têm um ancestral em comum, onde a mutação surgiu pela primeira vez. No entanto, um paciente de origem japonesa, no grupo 9, apresentou um haplótipo diferente deste. Exceto pelo alelo 4 no marcador D9S2162, todos os haplótipos diferem daqueles até hoje descritos em japoneses (quadro 8), sendo esta uma evidência de mais dois eventos independentes que levaram à mutação neste grupo étnico (IKEUCHI et al, 2002).

Quadro 8: Haplótipos ligados à deleção GAG no *DYTI* descritos em outros grupos populacionais.

	D9S2160	D9S2161	D9S63	D9S2162
Britânicos	5	4	6	4
(VALENTE et al, 1999)	5	4	5	1
	2	4	16	3
	5	3	1	3
	2	3	1	3
	4	6	1	3
	4	4	1	3
‡	5	5	2	4
Japoneses	10	2	16	4
(IKEUCHI et al, 2002)	8	2	16	4
	2	2	6	9
	10	5	4	2
Franceses	4	3	18	4
(LEBRE et al, 1999)	5	1	0	3
	6	5	8	2
	2	4	14	4
	4/5	5/2	16/8	4

‡ Haplótipo encontrado nos pacientes do grupo 4, com ascendência britânica.

Tanto no grupo 6 quanto no 7 há pacientes com ascendências diferentes com haplótipos semelhantes, o que sugere que houve uma miscigenação entre estes grupos étnicos em algum ponto de sua história. Para confirmar esta hipótese, seria necessário que tivéssemos acesso a um grande número de controles em cada uma destas populações isoladamente, para estabelecer a frequência de cada alelo nas mesmas, o que não foi possível fazer neste estudo. Pacientes de outros grupos apresentam haplótipos únicos, com pouca semelhança entre os marcadores mais próximos do *DYTI*, sugerindo que essas mutações são frutos de eventos independentes.

Em resumo, num grupo de 28 indivíduos de famílias diferentes, identificamos pelo menos 12 haplótipos diferentes ligados à deleção GAG no *DYTI*, com a possibilidade de este número ser ainda maior, se considerarmos outros possíveis haplótipos naqueles pacientes onde não foi possível estabelecer a fase. Além disso, identificamos uma mutação nova na família do probando BR 40. Nossos achados sugerem que a deleção GAG apareceu como evento independente inúmeras vezes na história, e que este sítio no gene *DYTI* é particularmente propenso a mutações.

As duas fitas de DNA que formam a estrutura de dupla-hélice estão pareadas em sentidos opostos ($5' \rightarrow 3'$ e $3' \rightarrow 5'$). Durante o processo de replicação, a dupla hélice se abre e o novo DNA começa a ser sintetizado tendo estas duas fitas como matriz. Porém, a extensão da nova cadeia de DNA se dá apenas num sentido, a replicação ocorre sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$. Sendo assim, uma das fitas será copiada de forma contínua numa direção, à medida que a dupla-hélice vai se abrindo, e a outra fita-matriz será copiada de forma descontínua, na direção oposta (replicação semi-discontínua). Esta síntese descontínua é feita através da ligação de pequenos fragmentos de DNA (fragmentos de Okazaki), à medida que a porção 3' da matriz vai sendo exposta. Estes fragmentos têm de 1000 a 2000 pb, aproximadamente. No final do processo de replicação estes fragmentos serão interligados, formando uma cópia contínua (Lewin, 2000).

Mutações e rearranjos genéticos estão frequentemente associados a seqüências repetitivas de DNA. Estas alterações têm em comum o pareamento incorreto da fita de DNA que está sendo sintetizada com seqüências complementares alternativas em sua vizinhança (Lovett, 2004). Estes desalinhamentos podem envolver desde um pequeno número até centenas de nucleotídios. O par de trinucleotídios GAG, onde ocorre a deleção nos casos de distonia, se encontra numa região onde existe uma repetição imperfeita em tandem, composta de 24 pb, contento 5(T), 4(C) e 3(A) (figura 7). O alinhamento direto desta região contendo a repetição com a seqüência de DNA que vem logo depois dela mostra uma identidade de 54%, ao passo que, na presença da deleção GAG, esta homologia sobe para 65%. Teoricamente, esta maior homologia poderia facilitar um deslizamento dos *primers* de RNA dos fragmentos de Okazaki durante a replicação da fita de DNA, favorecendo uma deleção (KLEIN et al, 1998a).

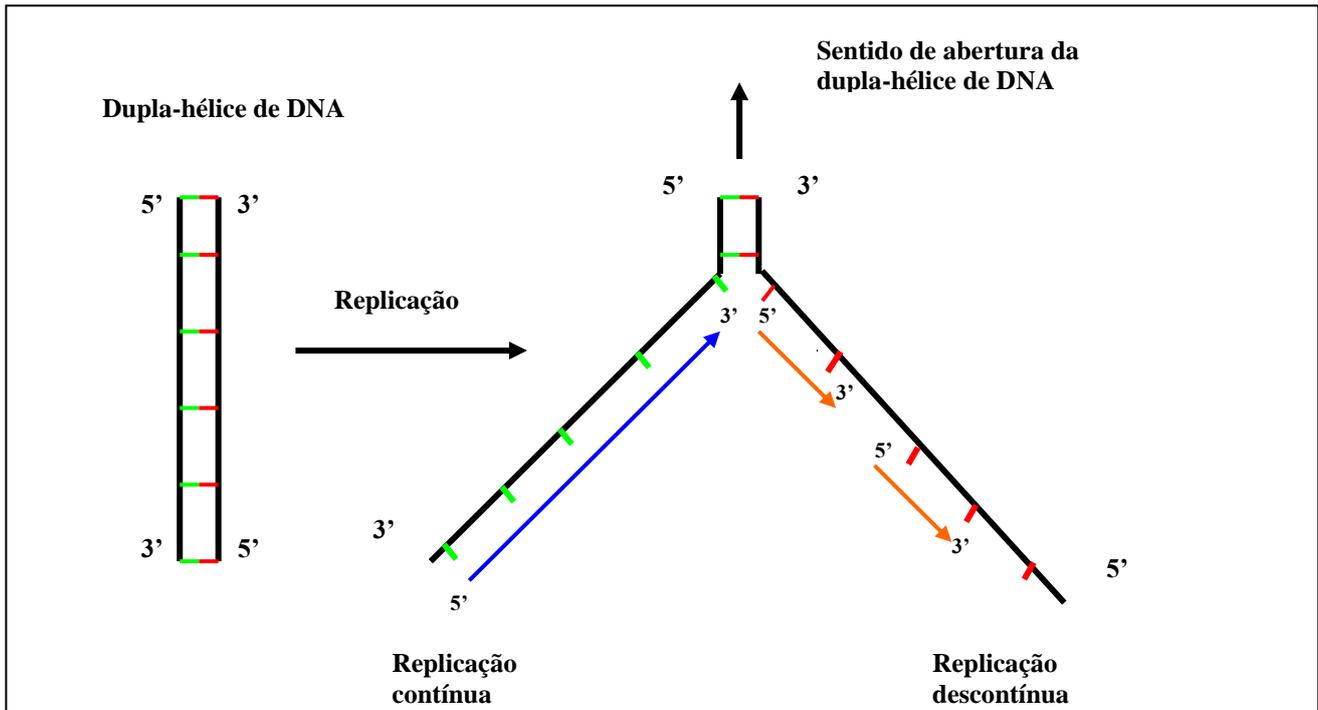


Figura 6: O DNA é composto por 2 fitas, com orientações opostas. Durante o processo de replicação, a extensão das novas fitas de DNA sempre se dá do sentido 5' para 3'. Durante o processo de abertura da dupla-hélice, a fita-matriz com orientação 3' para 5' terá sua cópia feita de forma contínua de 5' para 3' (seta azul). A fita matriz com orientação 5' para 3' terá sua cópia feita de forma descontínua no sentido 5' para 3' (setas em laranja). À medida que esta fita-matriz com orientação 5' para 3' vai se abrindo, a ela vão se ligando pequenos fragmentos de DNA (fragmentos de Okazaki), que ao final do processo serão interligados para formar uma cópia contínua da matriz.

A	
904	<u>GAGGAGATGACATTTTTCCCCAAAGAGGAGAGAGTTTTCTCAGATAAA</u> 951
928	<u>GAGGAGAGAGTTTTCTCAGATAAA</u> 951 13/24 (54%)
B	
907	<u>GAGATGACATTTTTCCCCAA</u> 926
928	<u>GAGGAGAGAGTTTTCTCAGA</u> 947 13/20 (65%)

Figura 7. Alinhamento das seqüências de DNA na região do éxon 5 do *DYTI* que contém o par de trinucleotídios GAG e a repetição imperfeita em tandem (nucleotídeos 904 a 951). Em **A** vemos a seqüência sem a deleção 904_906GAG e uma homologia de 54% entre os fragmentos, em **B** vemos que a deleção GAG aumenta a homologia entre os fragmentos vizinhos para 65%.

A confirmação de sítios particularmente propensos a mutações neste e em outros genes possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos de mutagênese, abrindo o

caminho para possíveis terapias preventivas no futuro. Até o presente momento, esta ainda é uma perspectiva bastante remota. Aparentemente, para a distonia ligada ao *DYT1*, o mais viável a longo prazo serão abordagens terapêuticas no sentido de silenciar a torsina A mutante, pois acredita-se que esta exerça sua ação através de um efeito dominante-negativo ou citotóxico (BREAKEYFIELD et al, 2001). Moléculas curtas de RNA interferente (siRNA) direcionadas à torsina A mutante foram capazes de suprimir a expressão desta em células em cultura (GONZALES-ALEGRE et al, 2003). O uso de siRNA poderia, potencialmente, vir a ser uma ferramenta terapêutica na prevenção das distonias, se conseguirmos superar as barreiras ainda existentes para que consigamos seu funcionamento *in vivo*, por tempo prolongado e de forma eficaz. Mesmo antes de dispormos de terapêuticas moleculares eficazes, é importante que estejamos capacitados a oferecer diagnóstico molecular, conhecendo o perfil genético de nossos pacientes para que possamos determinar quais deles poderão se beneficiar de terapêuticas mais específicas no futuro.

7. CONCLUSÕES

A mutação 904_906 delGAG no *DYT1* está presente em pacientes brasileiros com DTP de início precoce. Entre os pacientes brasileiros, há indivíduos com o fenótipo clássico do *DYT1*, porém sem esta mutação, o que é uma evidência de que a DTP de início precoce também apresenta heterogeneidade genética em nosso meio.

Identificamos pelo menos 12 haplótipos diferentes em 28 indivíduos com a mutação 904_906 delGAG no *DYT1* e uma mutação nova numa família de brasileiros, favorecendo a hipótese de que este sítio é particularmente propenso a mutações.

8. REFERÊNCIAS

Ahmad F, Davis M B, Waddy HM, Oley CA, Marsden CD, Harding AE. Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant torsion dystonia. *Genomics* 1993;15:9-12.

Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, Ford B, Yount J, de Leon D, Chouinard S, Saunders-Pullman R, Brin MF, Kapoor RP, Jones AC, Shen H, Fahn S, Risch NJ, Nygaard TG. Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol* 1997;42:670-3.

Augood SJ, Penney JB Jr, Friberg IK, Breakefield XO, Young AB, Ozelius LJ, Standaert DG. Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain. *Ann Neurol* 1998;43:669-73.

Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ, Breakefield XO, Penney JB Jr, Standaert DG. Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann Neurol* 1999;46:761-9.

Augood SJ, Hollingsworth Z, Albers DS, Yang L, Leung JC, Muller B, Klein C, Breakefield XO, Standaert DG. Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology* 2002;59:445-8.

Bentivoglio AR, Del Grosso N, Albanese A, Cassetta E, Tonali P, Frontali M. Non-DYT1 dystonia in a large Italian family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:357-60.

Brassat D, Camuzat A, Vidailhet M, Feki I, Jedynak P, Klap P, Agid Y, Durr A, Brice A. Frequency of the DYT1 mutation in primary torsion dystonia without family history. *Arch Neurol* 2000;57:333-5.

Breakefield XO, Kamm C, Hanson PI. TorsinA: movement at many levels. *Neuron* 2001;31(1):9-12.

Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Risch N, Burke RE, Greene PE, Shale H, Fahn S. Idiopathic torsion dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol* 1989;26:612-20.

Bressman SB, de Leon D, Kramer PL, Ozelius LJ, Brin MF, Greene PE, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ. Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol* 1994a;36:771-7.

Bressman SB, Heiman GA, Nygaard TG, Ozelius LJ, Hunt AL, Brin MF, Gordon MF, Moskowitz CB, de Leon D, Burke RE. A study of idiopathic torsion dystonia in a non-Jewish family: evidence for genetic heterogeneity. *Neurology* 1994b;44:283-7.

Bressman SB, Hunt AL, Heiman GA, Brin MF, Burke RE, Fahn S, Trugman JM, de Leon D, Kramer PL, Wilhelmsen KC, et al. Exclusion of the DYT1 locus in a non-Jewish family with early-onset dystonia. *Mov Disord* 1994c;9:626-32.

Bressman SB, Warner TT, Almasy L, Uitti RJ, Greene PE, Heiman GA, Raymond D, Ford B, de Leon D, Fahn S, Kramer PL, Risch NJ, Maraganore DM, Nygaard TG, Harding AE. Exclusion of the DYT1 locus in familial torticollis. *Ann Neurol* 1996;40:681-4.

Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, Brin MF, Fahn S, Breakefield X, Ozelius LJ, Risch NJ. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology* 2000;54:1746-52.

Bressman SB, Raymond D, Wendt K, Saunders-Pullman R, De Leon D, Fahn S, Ozelius L, Risch N. Diagnostic criteria for dystonia in DYT1 families. *Neurology* 2002;59:1780-2.

Caldwell GA, Cao S, Sexton EG, Gelwix CC, Bevel JP, Caldwell KA. Suppression of polyglutamine-induced protein aggregation in *Caenorhabditis elegans* by torsin proteins. *Hum Mol Genet* 2003;12:307-19.

De Carvalho Aguiar PM, Ozelius LJ. Classification and genetics of dystonia. *Lancet Neurol*. 2002;1:316-25.

Doheny D, Danisi F, Smith C, Morrison C, Velickovic M, De Leon D, Bressman SB, Leung J, Ozelius L, Klein C, Breakefield XO, Brin MF, Silverman JM. Clinical findings of a myoclonus-dystonia family with two distinct mutations. *Neurology* 2002;59:1244-6.

Eidelberg D, Moeller JR, Antonini A, Kazumata K, Nakamura T, Dhawan V, Spetsieris P, deLeon D, Bressman SB, Fahn S. Functional brain networks in DYT1 dystonia. *Ann Neurol* 1998;44:303-12.

Elbert T, Candia V, Altenmuller E, Rau H, Sterr A, Rockstroh B, Pantev C, Taub E. Alteration of digital representations in somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Neuroreport* 1998;9:3571-5.

Eldridge R. The torsion dystonias: literature review and genetic and clinical studies. *Neurology* 1970;20:1-78.

Fahn S, Bressman SB, Marsden CD. Classification of dystonia. *Adv Neurol* 1998;78:1-10.

Gasser T, Windgassen K, Bereznai B, Kabus C, Ludolph AC. Phenotypic expression of the DYT1 mutation: a family with writer's cramp of juvenile onset. *Ann Neurol* 1998;44:126-8.

Gimenez-Roldan, S.; Lopez-Fraile, I. P.; Esteban, A. Dystonia in Spain: study of a gypsy family and general survey. *Adv Neurol* 1976;14:125-36.

Gimenez-Roldan S, Delgado G, Marin M, Villanueva JA, Mateo D. Hereditary torsion dystonia in gypsies. *Adv Neurol* 1988;50:73-81.

Goetz CG, Chmura TA, Lanska DJ. History of dystonia: part 4 of the MDS-sponsored history of movement disorders exhibit, Barcelona, June, 2000. *Mov Disord* 2001;16(2):339-45.

Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, Paulson HL. Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Ann Neurol*. 2003;53:781-7.

Greene P, Kang UJ, Fahn S. Spread of symptoms in idiopathic torsion dystonia. *Mov Disord* 1995;10:143-152.

Grimes DA, Han F, Lang AE, St George-Hyssop P, Racacho L, Bulman DE. A novel locus for inherited myoclonus-dystonia on 18p11. *Neurology* 2002;59:1183-6.

Heintz R, Casey DE. Pargyline reduces/prevents neuroleptic-induced acute dystonia in monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;93:207-13.

Hewett J, Gonzalez-Agosti C, Slater D, Ziefer P, Li S, Bergeron D, Jacoby DJ, Ozelius LJ, Ramesh V, Breakefield XO. Mutant torsinA, responsible for early-onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells. *Hum Mol Genet* 2000;9:1403-13.

Hewett J, Ziefer P, Bergeron D, Naismith T, Boston H, Slater D, Wilbur J, Schuback D, Kamm C, Smith N, Camp S, Ozelius LJ, Ramesh V, Hanson PI, Breakefield XO. TorsinA in PC12 cells: localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J Neurosci Res* 2003;72:158-68.

Hjermind LE, Werdelin LM, Sorensen SA. Inherited and de novo mutations in sporadic cases of DYT1-dystonia. *Eur J Hum Genet* 2002;10:213-6.

Holmgren G, Ozelius L, Forsgren L, Almay BG, Holmberg M, Kramer P, Fahn S, Breakefield XO. Adult onset idiopathic torsion dystonia is excluded from the DYT 1 region (9q34) in a Swedish family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:178-81.

Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet*. 1994;8:236-42.

Ikeuchi T, Shimohata T, Nakano R, Koide R, Takano H, Tsuji S. A case of primary torsion dystonia in Japan with the 3-bp (GAG) deletion in the DYT1 gene with a unique clinical presentation. *Neurogenetics* 1999;2:189-90.

Ikeuchi T, Nomura Y, Segawa M, Ozelius LJ, Shimohata T, Tsuji S. Multiple founder effects in Japanese families with primary torsion dystonia harboring the GAG deletion in the Tor1A (DYT1) gene. *Neurogenetics*. 2002 Oct;4(2):105-6.

Kabakci K, Hedrich K, Leung JC, Mitterer M, Vieregge P, Lencer R, Hagenah J, Garrels J, Witt K, Klostermann F, Svetel M, Friedman J, Kostic V, Bressman SB, Breakefield XO, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C. Mutations in DYT1: extension of the phenotypic and mutational spectrum. *Neurology*. 2004;62:395-400.

Kamm C, Castelon-Konkiewitz E, Naumann M, Heinen F, Brack M, Nebe A, Ceballos-Baumann A, Gasser T. GAG deletion in the DYT1 gene in early limb-onset idiopathic torsion dystonia in Germany. *Mov Disord* 1999;14:681-3.

Khan NL, Wood NW, Bhatia KP. Autosomal recessive, DYT2-like primary torsion dystonia: a new family. *Neurology* 2003;61:1801-3.

Klein C, Ozelius LJ, Hagenah J, Breakefield XO, Risch NJ, Vieregge P. Search for a founder mutation in idiopathic focal dystonia from Northern Germany. *Am J Hum Genet* 1998a;63:1777-82.

Klein C, Pramstaller PP, Castellan CC, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ. Clinical and genetic evaluation of a family with a mixed dystonia phenotype from South Tyrol. *Ann Neurol* 1998b;44:394-8.

Klein C, Brin MF, de Leon D, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Bressman SB, Friedman A, Markova ED, Risch NJ, Breakefield XO, Ozelius LJ. De novo mutations (GAG deletion) in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia. *Hum Mol Genet* 1998c;7:1133-6.

Klein C, Page CE, LeWitt P, Gordon MF, de Leon D, Awaad Y, Breakefield XO, Brin MF, Ozelius LJ. Genetic analysis of three patients with an 18p- syndrome and dystonia. *Neurology* 1999a ;52:649-51.

Klein C, Friedman J, Bressman S, Vieregge P, Brin MF, Pramstaller PP, De Leon D, Hagenah J, Sieberer M, Fleet C, Kiely R, Xin W, Breakefield XO, Ozelius LJ, Sims KB. Genetic testing for early-onset torsion dystonia (DYT1): introduction of a simple screening method, experiences from testing of a large patient cohort, and ethical aspects. *Genet Test* 1999b;3:323-8.

Knappskog PM, Flatmark T, Mallet J, Ludecke B, Bartholome K. Recessively inherited L-DOPA-responsive dystonia caused by a point mutation (Q381K) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet* 1995;4:1209-12.

Konakova M, Huynh DP, Yong W, Pulst SM. Cellular distribution of torsin A and torsin B in normal human brain. *Arch Neurol* 2001;58:921-7.

Kramer PL, de Leon D, Ozelius L, Risch N, Bressman SB, Brin MF, Schuback DE, Burke RE, Kwiatkowski DJ, Shale H, et al. Dystonia gene in Ashkenazi Jewish population is located on chromosome 9q32-34. *Ann Neurol* 1990;27:114-20.

Kramer PL, Heiman GA, Gasser T, Ozelius LJ, de Leon D, Brin MF, Burke RE, Hewett J, Hunt AL, Moskowitz C, Nygaard TG, Wilhelmsen KC, Fahn S, Breakefield XO, Risch NJ, Bressman SB: The DYT1 gene on 9q34 is responsible for most cases of early limb-onset idiopathic torsion dystonia in non-Jews. *Am J Hum Genet* 1994;55:468-75.

Kustedjo K, Bracey MH, Cravatt BF. Torsin A and its torsion dystonia-associated mutant forms are luminal glycoproteins that exhibit distinct subcellular localizations. *J Biol Chem* 2000;275:27933-9.

Kwiatkowski DJ, Ozelius L, Kramer PL, Perman S, Schuback DE, Gusella JF, Fahn S, Breakefield XO. Torsion dystonia genes in two populations confined to a small region on chromosome 9q32-34. *Am J Hum Genet* 1991;49:366-71.

Lebre AS, Durr A, Jedynak P, Ponsot G, Vidailhet M, Agid Y, Brice A. DYT1 mutation in French families with idiopathic torsion dystonia. *Brain* 1999;122 (Pt 1):41-5.

Leube B, Rudnicki D, Ratzlaff T, Kessler KR, Benecke R, Auburger G. Idiopathic torsion dystonia: assignment of a gene to chromosome 18p in a German family with adult onset, autosomal dominant inheritance and purely focal distribution. *Hum Mol Genet* 1996;5:1673-7.

Leube B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G. Sporadic focal dystonia in northwest Germany: molecular basis on chromosome 18p. *Ann Neurol* 1997a;42:111-4.

Leube B, Hendgen T, Kessler KR, Knapp M, Benecke R, Auburger G. Evidence for DYT7 being a common cause of cervical dystonia (torticollis) in Central Europe. *Am J Med Genet* 1997b;74:529-32.

Leube B, Auburger G. Questionable role of adult-onset focal dystonia among sporadic dystonia patients. *Ann Neurol* 1998;44:984-5.

Leung JC, Klein C, Friedman J, Vieregge P, Jacobs H, Doheny D, Kamm C, DeLeon D, Pramstaller PP, Penney JB, Eisengart M, Jankovic J, Gasser T, Bressman SB, Corey DP, Kramer P, Brin MF, Ozelius LJ, Breakefield XO. Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* 2001;3:133-43.

Lewin, B. DNA replication. In: Lewin B. *Genes VII*. New York: Oxford University Press Inc., 2000;385-413.

Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, Quinn N, Sethi KD, Shults C, Wenning GK; Movement Disorders Society Scientific Issues Committee. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003; 18:467-86.

Lovett ST. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol.* 2004 Jun;52(5):1243-53.

McLean PJ, Kawamata H, Shariff S, Hewett J, Sharma N, Ueda K, Breakefield XO, Hyman BT. TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem.* 2002;83:846-54.

Major T, Svetel M, Romac S, Kostic VS. DYT1 mutation in primary torsion dystonia in a Serbian population. *J Neurol* 2001;248:940-3.

Matsumoto S, Nishimura M, Kaji R, Sakamoto T, Mezaki T, Shimazu H, Murase N, Shibasaki H. DYT1 mutation in Japanese patients with primary torsion dystonia. *Neuroreport* 2001 26;12:793-5.

Naumann M, Pirker W, Reiners K, Lange KW, Becker G, Brucke T. Imaging the pre- and postsynaptic side of striatal dopaminergic synapses in idiopathic cervical dystonia: a SPECT study using [¹²³I] epidepride and [¹²³I] beta-CIT. *Mov Disord* 1998;13:319-23.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 1999;9:27-43.

Oberlin SR, Konakova M, Pulst S, Chesselet MF. Development and anatomic localization of torsinA. *Adv Neurol* 2004;94:61-5.

O'Farrell C, Hernandez DG, Evey C, Singleton AB, Cookson MR. Normal localization of deltaF323-Y328 mutant torsinA in transfected human cells. *Neurosci Lett*. 2002 Jul 19;327(2):75-8.

Oppenheim H. Uber eine eigenartige krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen alters (dysbasia lordotica progressiva, dystonia musculorum deformans) *Neurol Centrabl* 1911;30:1090–1107.

Ostrer H. A genetic profile of contemporary Jewish populations. *Nat Rev Genet* 2001;2:891-8.

Ozelius L, Kramer PL, Moskowitz CB, Kwiatkowski DJ, Brin MF, Bressman SB; Schuback DE, Falk CT, Risch N, de Leon D, Burke RE, Haines J, Gusella JF, Fahn S, Breakefield XO. Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32- 34. *Neuron* 1989;2:1427-34.

Ozelius LJ, Kramer PL, de Leon D, Risch N, Bressman SB, Schuback DE, Brin MF, Kwiatkowski DJ, Burke RE, Gusella JF, et al. Strong allelic association between the torsion dystonia gene (DYT1) and loci on chromosome 9q34 in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 1992;50:619-28.

Ozelius LJ, Hewett J, Kramer P, Bressman SB, Shalish C, de Leon D, Rutter M, Risch N, Brin MF, Markova ED, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, McCormick MK, Fahn S, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO. Fine localization of the torsion dystonia gene (DYT1) on human chromosome 9q34: YAC map and linkage disequilibrium. *Genome Res* 1997a;7:483-94.

Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL; Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Rish NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO. The early-onset dystonia gene (DYT1) encodes an ATP- binding protein. *Nat genetics* 1997b;17:40-8.

Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Jacoby D, Penney J, Risch NJ, Fahn S, Gusella JF, Breakefield XO. The gene (DYT1) for early-onset torsion dystonia encodes a novel protein related to the Clp protease/heat shock family. *Adv Neurol* 1998a;78:93-105.

Ozelius, Laurie J.; Klein, Christine; de Leon, Deborah; Breakefield, Xandra O.; Bressman, Susan B. A De Novo Mutation (GAG Deletion) in the DYT1 Gene in a Patient of Mennonite Origin. *Neurology* 1998b; 50 (Suppl4):A118.

Ozelius LJ, Page CE, Klein C, Hewett JW, Mineta M, Leung J, Shalish C, Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Fahn S, Corey DP, Breakefield XO. The TOR1A (DYT1) gene family and its role in early onset torsion dystonia. *Genomics* 1999;62:377-84.

Parker N. Hereditary whispering dysphonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;48:218-24.

Pauls DL, Korczyn AD. Complex segregation analysis of dystonia pedigrees suggests autosomal dominant inheritance. *Neurology* 1990;40:1107-10.

Perlmutter JS, Stambuk MK, Markham J, Black KJ, McGee-Minnich L, Jankovic J, Moerlein SM. Decreased [18F]spiperone binding in putamen in dystonia. *Adv Neurol* 1998;78:161-8.

Perlmutter JS, Mink JW. Dysfunction of dopaminergic pathways in dystonia. *Adv Neurol* 2004;94:163-70.

Placzek MR, Misbahuddin A, Chaudhuri KR, Wood NW, Bhatia KP, Warner TT. Cervical dystonia is associated with a polymorphism in the dopamine (D5) receptor gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:262-4.

Playford ED, Fletcher NA, Sawle GV, Marsden CD, Brooks DJ. Striatal [18F]dopa uptake in familial idiopathic dystonia. *Brain* 1993;116:1191-9.

Reilly JA, Hallett M, Cohen LG, Tarkka IM, Dang N. The N30 component of somatosensory evoked potentials in patients with dystonia. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1992;84:243-7.

Risch NJ, Bressman SB, deLeon D, Brin MF, Burke RE, Greene PE, Shale H, Claus EB, Cupples LA, Fahn S. Segregation analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews suggests autosomal dominant inheritance. *Am J Hum Genet* 1990;46:533-8.

Risch N, deLeon D, Ozelius L, Kramer P, Almasy L, Singer B, Fahn S, Breakefield X, Bressman S. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nature Genet* 1995;9:152-9.

Rostasy K, Augood SJ, Hewett JW, Leung JC, Sasaki H, Ozelius LJ, Ramesh V, Standaert DG, Breakefield XO, Hedreen JC. TorsinA protein and neuropathology in early onset generalized dystonia with GAG deletion. *Neurobiol Dis* 2003;12:11-24.

Sanger TD, Tarsy D, Pascual-Leone A. Abnormalities of spatial and temporal sensory discrimination in writer's cramp. *Mov Disord* 2001;16:94-9.

Schicatano EJ, Basso MA, Evinger C. Animal model explains the origins of the cranial dystonia benign essential blepharospasm. *J Neurophysiol.* 1997;77:2842-6.

Sharma N, Hewett J, Ozelius LJ, Ramesh V, McLean PJ, Breakefield XO, Hyman BT. A close association of torsinA and alpha-synuclein in Lewy bodies: a fluorescence resonance energy transfer study. *Am J Pathol* 2001;159:339-44.

Shashidharan P, Kramer BC, Walker RH, Olanow CW, Brin MF. Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Res* 2000a;853:197-206.

Shashidharan P, Good PF, Hsu A, Perl DP, Brin MF, Olanow CW. TorsinA accumulation in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Brain Res* 2000b;877:379-81.

Slominsky PA, Markova ED, Shadrina MI, Illarioshkin SN, Miklina NI, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA. A common 3-bp deletion in the DYT1 gene in Russian families with early-onset torsion dystonia. *Hum Mutat* 1999;14:269.

Tempel LW, Perlmutter JS. Abnormal vibration-induced cerebral blood flow responses in idiopathic dystonia. *Brain* 1990;113:691-707.

Tempel LW, Perlmutter JS. Abnormal cortical responses in patients with writer's cramp. *Neurology* 1993;43:2252-7.

Tezzon F, Zanoni T, Passarin MG, Ferrari G. Dystonia in a patient with deletion of 18p. *Ital J Neurol Sci* 1998;19:90-3.

Thompson & Thompson. *Genética Médica*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

Tuffery-Giraud S, Cavalier L, Roubertie A, Guittard C, Carles S, Calvas P, Echenne B, Coubes P, Claustres M. No evidence of allelic heterogeneity in the DYT1 gene of European patients with early onset torsion dystonia. *J Med Genet* 2001;38:E35

Vale RD. AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 2000;150:F13-9.

Valente EM, Warner TT, Jarman PR, Mathen D, Fletcher NA, Marsden CD, Bhatia KP, Wood NW. The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe. *Brain* 1998;121:2335-9.

Valente EM, Povey S, Warner TT, Wood NW, Davis MB. Detailed haplotype analysis in Ashkenazi Jewish and non-Jewish British dystonic patients carrying the GAG deletion in the DYT1 gene: evidence for a limited number of founder mutations. *Ann Hum Genet* 1999;63:1-8.

Valente EM, Bentivoglio AR, Cassetta E, Dixon PH, Davis MB, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Wood NW, Albanese A. Identification of a novel primary torsion dystonia locus (DYT13) on chromosome 1p36 in an Italian family with cranial-cervical or upper limb onset. *Neurol Sci* 2001a;22:95-6.

Valente EM, Bentivoglio AR, Cassetta E, Dixon PH, Davis MB, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Wood NW, Albanese A. DYT13, a novel primary torsion dystonia locus, maps to chromosome 1p36.13--36.32 in an Italian family with cranial-cervical or upper limb onset. *Ann Neurol* 2001b;49:362-6.

Walker RH, Brin MF, Sandu D, Gujjari P, Hof PR, Warren Olanow C, Shashidharan P. Distribution and immunohistochemical characterization of torsinA immunoreactivity in rat brain. *Brain Res* 2001;900:348-54.

Walker RH, Brin MF, Sandu D, Good PF, Shashidharan P. TorsinA immunoreactivity in brains of patients with DYT1 and non-DYT1 dystonia. *Neurology* 2002;58:120-4.

Ziefer P, Leung J, Razzano T, Shalish C, LeDoux MS, Lorden JF, Ozelius L, Breakefield XO, Standaert DG, Augood SJ. Molecular cloning and expression of rat torsinA in the normal and genetically dystonic (dt) rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;101:132-5.

Zilber N, Korczyn AD, Kahana E, Fried K, Alter M. Inheritance of idiopathic torsion dystonia among Jews. *J Med Genet* 1984;21:13-20.

Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Muller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Muller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 2001;29:66-9.

Zorzi G, Garavaglia B, Invernizzi F, Girotti F, Soliveri P, Zeviani M, Angelini L, Nardocci N. Frequency of DYT1 mutation in early onset primary dystonia in Italian patients. *Mov Disord* 2002;17:407-8.

9. ABSTRACT

Introduction: Early-onset primary torsion dystonia (PTD) is an autosomal dominant disease, with 30 to 40 % penetrance. It usually starts in a limb, during the first decade of life, and later tends to generalize. To date, the GAG deletion in the *DYT1* gene is the only mutation identified in cases of early-onset PTD. Two-thirds of the early-onset PTD cases are estimated to carry this mutation. There is some degree of genetic heterogeneity, where patients with typical phenotypes have no mutations in this gene. In Ashkenazi Jews, it is estimated that 90% of the cases are due to a founder mutation, a single event that took place around 350 years ago. This same mutation is described in early-onset PTD cases worldwide, but there is not enough data to establish whether these identical mutations were due to a limited number of founder mutations or came from independent events, which would be an indication that this site is a hot-spot on this gene. In Brazil there are no published reports of this mutation in cases of early-onset PTD.

Objectives: the first aim of this study is to screen Brazilian patients with early-onset PTD for the GAG deletion in the *DYT1* gene. The second aim is to investigate if this site is a hot-spot for mutations, studying the haplotypes of mutation-positive patients from different ethnical backgrounds to establish whether these mutations were due to a limited number of founder mutations or were due to independent events.

Patients and methods: fourteen Brazilian patients with early-onset PTD were screened for the GAG deletion in the *DYT1* gene, using denaturing high performance liquid chromatography. Available family members were also investigated. Through polymorphic markers genotyping in the *DYT1* region, we studied the haplotypes of 28 mutation-positive patients from different ethnical backgrounds.

Results: one Brazilian proband was positive for the mutation, as well as 2 other family members. We identified at least 12 different haplotypes in the 28 mutation-positive patients and a *de novo* mutation in the Brazilian family.

Conclusions: the *DYT1* GAG deletion is found among Brazilian patients with early-onset PTD. There is also genetic heterogeneity among these patients. We identified at least 12 different mutation-related haplotypes and a *de novo* mutation in a Brazilian family, which are indications that this site on the *DYT1* gene is a hot-spot for mutations.

10. APÊNCICES

Apêndice 1. Composição de géis e soluções

Gel de agarose 1%

Agarose: 0,5 g
TAE: 50 ml

Gel de poliacrilamida 5%

Uréia: 18g
Long Ranger® 50% gel solution (Cambrex Bio Science Rockland, Inc): 5 ml.
10x TBE: 5 ml
Persulfato de amônia 20%: 250 µl
TEMED: 25 µl
H₂O: 26 ml

10x PCR Buffer (Applied Biosystems)

Tris-Cl (pH 8,4): 20 mM
KCl: 50 mM
MgCl₂: 1,5 mM

RSB

Tris-Cl (pH 7,4): 10 mM
NaCl: 10 mM
EDTA: 25 mM

SDS 20%

SDS: 20 g
H₂O completar para 100 ml
HCl para pH 7,2

Solução de genotipagem (300 ul)

Formamida 200 µl
GeneScan®-500 [TAMRA]TM (ABI Prism): 40 µl
Loading dye (ABI Prism): 60 µl

Solução de lise

NH₄HCO₃: 10 mM
NH₄Cl: 144 mM

TAE

Tris-acetato: 40 mM
EDTA: 2 mM (pH 8.0)

TBE

Tris-Cl (pH 8,3): 89 mM
Ácido bórico: 89 mM
EDTA: 2mM

TE

Tris-Cl (pH 7,5): 10 mM
EDTA: 1 mM

Apêndice 2. Tamanho e numeração dos alelos dos marcadores genéticos

D9S159	
pb	número
291	4
293	6
295	8
297	10
299	12
301	14
303	16
305	18
307	20
309	22

D9S2160	
pb	número
104	0
108	1
112	2
116	3
120	4
124	5
128	6
132	7

D9S63	
pb	número
114	0
116	2
118	4
120	6
122	8
124	10
126	12
128	14
130	16
132	18
134	20
136	22
138	24
140	26

D9S2162	
pb	número
79	0
82	1
85	2
88	3
91	4
94	5
97	6
100	7

D9S2161	
pb	número
146	1
150	2
154	3
158	4
162	5
166	6
170	7

pb = tamanho em pares de base

11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001.