

# Instabilidade meiótica da expansão patogênica (CAG)n=38 no gene HTT em caso familiar de doença de Huntington

Meiotic instability of the pathogenic expansion (CAG)n=38 of the HTT gene in a familial case of Huntington's disease.

Hazel Nunes Barboza<sup>1</sup>, Antônio Francisco Alves da Silva<sup>2</sup>, Filipe Brum Machado<sup>3</sup>, Enrique Medina-Acosta<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bióloga do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

<sup>2</sup> Biólogo do Hospital Escola Álvaro Alvim, Mestrando do curso de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

<sup>3</sup> Mestre em Biociências e Biotecnologia, doutorando do curso de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup> Mestre e Doutor em Parasitologia Médica e Molecular, Professor Associado, Centro de Biociências e Biotecnologia, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, coordenador do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Campos dos Goytacazes, RJ.

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Huntington (DH) é um distúrbio autossômico dominante, neurodegenerativo com perda progressiva de neurônios estriatais, caracterizado por movimentos coreiformes, declínio cognitivo e distúrbios psiquiátricos. Ela é causada pela expansão patogênica da repetição trinucleotídica instável (CAG)n no exón 1 do gene HTT para huntingtina. Os sintomas geralmente se manifestam tarde (35-50 anos), havendo uma correlação inversa significante entre o limiar do número de repetições CAG e a idade em que os sintomas se iniciam.

**Objetivos:** Rastrear alelos com expansões da repetição (CAG)n em um núcleo familiar com suspeita de DH, por meio de análise de segregação meiótica e assistir ao aconselhamento genético.

**Métodos:** Foram incluídos na pesquisa quatro indivíduos (pai, filha 1, filho e filha 2), maiores de idade, sendo pai e filho com achados clínicos sugestivos de DH e as duas filhas assintomáticas. Os alelos (CAG)n foram determinados por meio de ensaio específico da reação em cadeia da polimerase quantitativa por fluorescência.

**Resultados:** A genotipagem dos alelos (CAG)n demonstrou que o

pai, o filho e as duas filhas eram portadores de alelos patogênicos com 38, 45, 40 e 41 repetições CAG, respectivamente.

**Conclusão:** Análise de segregação dos alelos (CAG)n revelou a

transmissão paterna da expansão patogênica instável (CAG)n=38

para os três filhos. Visando ao aconselhamento genético adequado

e precoce nas filhas, o teste permitiu identificar os alelos patogênicos

de maneira rápida e precisa.

**Descritores:** análise de segregação, distúrbio de repetição

trinucleotídica, doença de Huntington, expansão de repetição

trinucleotídica CAG, poliglutamina, teste genético.

## ABSTRACT

**Introduction:** Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder, with progressive loss of striatal neurons, characterized by choreic movements, cognitive deterioration and psychiatric disturbances. HD is caused by the pathogenic expansion of the unstable trinucleotide repeat (CAG)n in exon 1 of the huntingtin HTT gene. The symptoms generally manifest at late age (35-50 years), and there is a significant inverse correlation between the threshold number of CAG repeats and the time of onset of symptoms.

**Objectives:** To screen for alleles with expanded (CAG)n repeats in a nuclear family with clinical suspicion of HD, by meiotic segregation analysis, and to assist genetic counseling.

**Methods:** Four adults (father, daughter 1, son and daughter 2) were included in the study, being father and son referred because of clinical findings suggestive of HD and the daughters asymptomatic. The (CAG)n alleles were determined by a specific quantitative fluorescent polymerase chain reaction assay.

**Results:** Genotyping of (CAG)n alleles showed that the father, son and both daughters carried pathogenic alleles with 38, 45, 40 e 41 CAG repeats, respectively.

**Conclusion:** Segregation analysis of (CAG)n alleles revealed paternal carrier transmission of the pathogenic unstable expansion (CAG)n=38 to the son and both daughters. Aiming at early and adequate genetic counseling in the daughters, the genetic test allowed identifying the pathogenic alleles in a rapid and precise manner.

**Keywords:** Genetic test, Huntington disease, polyglutamine, trinucleotide repeat disorder, trinucleotide repeat expansion CAG, segregation analysis.

Autor para correspondência: Enrique Medina-Acosta, Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (Nudim), sede Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Prédio novo, 1º andar, Pelinca, Campos dos Goytacazes CEP 28035-010, Tel/Fax: (022) 2726 6758; E-mail: [quique@uenf.br](mailto:quique@uenf.br)

## INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (DH; MIM ID #143100) é neurodegenerativa, progressiva e apresenta um padrão de herança autossômica, com dominância completa<sup>1</sup>. As manifestações incluem movimentos desordenados de todo o corpo (coréia, distonia), deterioração cognitiva e distúrbios psiquiátricos. Os sintomas característicos geralmente começam a se manifestar em idades entre 35 e 50 anos, podendo eventualmente acometer crianças (DH juvenil) e idosos<sup>2,3</sup>. A doença ocorre com diferentes taxas de prevalência no mundo; porém, dados a respeito da incidência e genética de populações no Brasil são limitados<sup>4,6</sup>.

A causa genética da DH é a expansão patogênica da repetição trinucleotídica CAG (códon CAG para o aminoácido glutamina) no exôn 1 do gene HTT localizado no braço curto do cromossomo 4 (região 4p16.3). O gene HTT codifica a proteína huntingtina<sup>7</sup>. Contíguo à repetição (CAG)n se encontra uma repetição da trinca CCG, que caracteriza um domínio rico em prolinas na huntingtina; e cuja extensão varia na população humana, mas sua associação com a DH não está esclarecida<sup>8</sup>.

A partir de um limiar, o número de repetições CAG está inversamente correlacionado com a idade em que os sintomas da DH se iniciam<sup>9,10,11</sup>. Neste sentido, a Sociedade Americana de Genética Humana para o diagnóstico genético da DH recomenda adesão às seguintes definições: (i) alelo normal é todo gene HTT com < 35 trincas CAG. Estes alelos não causam doença. Os alelos normais podem exibir instabilidade meiótica, embora infrequente, e somente os alelos intermediários com 27-35 trincas CAG têm mutabilidade demonstrada; estes caracterizam o estado de pré-mutação e por causa da instabilidade intrínseca da pré-mutação há risco para as próximas gerações; (ii) alelo DH é todo gene HTT com > 36 repetições CAG. O fenótipo da DH nem sempre é penetrante para expansões entre 36 e 39 trincas CAG, mas a penetrância é completa para alelos com > 40 trincas CAG<sup>11</sup>. Contudo, é importante destacar que alelos intermediários com 27 a 35 repetições podem causar DH moderada com início na idade avançada<sup>12</sup>. Por outro lado, a DH juvenil é caracterizada por expansões longas (>95 repetições)<sup>3</sup>.

A análise molecular da expansão (CAG)n no gene HTT é o ensaio padrão-ouro em casos de suspeita de DH, proporcionando diagnóstico correto e preciso da doença, além de facilitar e possibilitar o aconselhamento às famílias.

Neste trabalho apresentamos o resultado das análises das repetições polimórficas (CAG)n e (CCG)n em um núcleo familiar acometido pela DH, atendido pelo Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular junto ao Hospital Escola Álvaro Alvim na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

## MÉTODOS

**Sujeitos da pesquisa:** A inclusão no estudo foi voluntária e o atendimento gratuito. Todos os responsáveis legais foram esclarecidos e concordaram em participar mediante assinaturas dos respectivos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido. Os objetivos deste estudo estão contemplados no projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de testes moleculares rápidos, altamente eficientes e econômicos para o diagnóstico de doenças genéticas humanas: Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS",

aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade de Medicina de Campos, sob folha de rosto FR-278769.

**Extração de DNA:** DNA genômico foi extraído de sangue periférico (0,3 mL) utilizando o kit comercial Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare, UK) e subsequentemente armazenado em freezer a -20 °C.

**Tipagem das expansões trinucleotídicas:** Foram utilizados três iniciadores (HD1, HD3 e HD4) para amplificação das repetições trinucleotídicas (CAG)n e (CCG)n no gene HTT (IT15; huntingtina; localização cromossômica 4p16.3). Os iniciadores foram redesenhadados a partir de sequências publicadas<sup>13,14</sup>, utilizando os programas de livre acesso OligoPerfect™ Designer da Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com/>) e OligoCalc Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), adaptados à tecnologia de detecção por fluorescência e validados computacionalmente contra sequências de referência do genoma humano disponíveis em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando os programas online CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) e *in silico* PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>). O iniciador HD1 é na orientação sentido e foi marcado com fluorocromo VIC™ (fluorescência verde); HD3 e HD4 são iniciadores reversos e não foram marcados com fluorescência. Os três iniciadores foram utilizados em ensaios separados com as associações HD1-HD3 (amplificação da repetição (CAG)n e HD1-HD4 (amplificação de ambas as regiões (CAG)n e (CCG)n. Para a tipagem alélica foi utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa por fluorescência (QF-PCR). Os produtos foram separados por eletroforese capilar de alta resolução em analisador genético automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, EUA). Os perfis alélicos foram determinados utilizando os programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 softwares (Applied Biosystems). O estudo aderiu às recomendações laboratoriais da Sociedade Americana de Genética Humana para o diagnóstico genético da DH<sup>11</sup>.

## RESULTADOS

Informações sobre parentesco e a suspeita ou histórico de DH na família foram utilizadas para a elaboração de heredograma mostrado na Figura 1. O núcleo familiar estudado foi composto pelo pai (P) e 3 filhos (F1, F2 e F3) com suspeita de expansão alélica patogênica no gene HTT e histórico familiar de doença psiquiátrica. Pai (67 anos) e filho F2 (34 anos) apresentavam sinais clínicos de DH e vinham sendo tratados há anos como esquizofrênicos. As duas filhas (F1 e F3) assintomáticas, com 36 e 29 anos, respectivamente, relataram histórico de doença similar em outros membros da família já falecidos.

Nesta família foi possível detectar claramente a instabilidade na transmissão paterna da expansão patogênica (CAG)n=38. O teste genético possibilitou a identificação do aumento da expansão do alelo paterno mutado transmitido a todos os filhos testados. Foram identificados quatro diferentes alelos variando de 38 a 45 repetições CAG para os quatro indivíduos testados (tabela 1), com a seguinte distribuição: 38 repetições (P), 40 repetições (F1), 45 repetições (F2) e 43 repetições (F3). As discrepâncias alélicas observadas entre o alelo obrigatoriamente paterno transferido aos três filhos não correspondem a alelos de exclusão dos vínculos de filiação

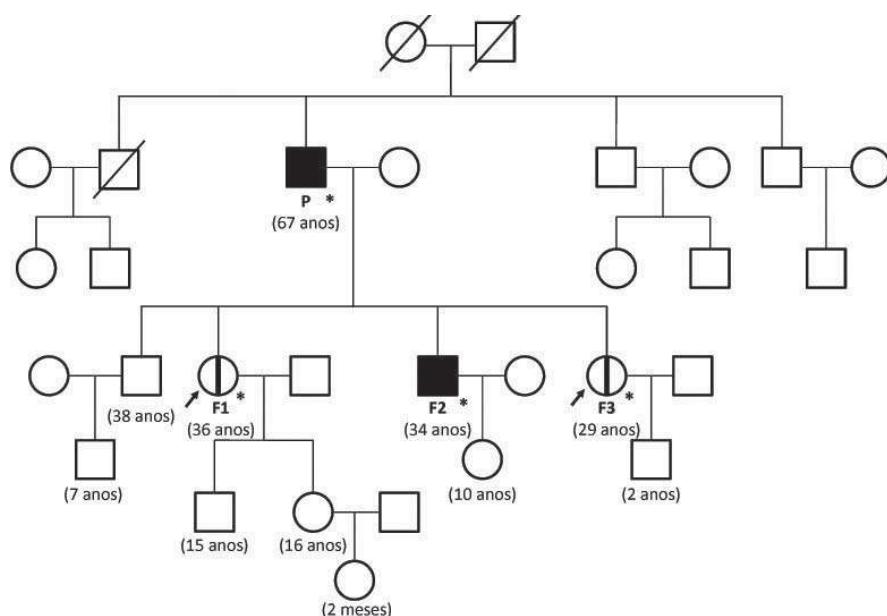


Figura 1. Heredograma do núcleo familiar investigado. Os indivíduos envolvidos no estudo foram o pai (P) com 67 anos, duas filhas (F1 e F3) com 36 e 29 anos respectivamente e um filho (F2) com 34 anos. O estado de portadoras assintomáticas nas duas filhas que procuraram aconselhamento genético é indicado conforme a nomenclatura recomendada pela Sociedade Americana de Conselheiros Genéticos<sup>20</sup>.

paterna, pois estes vínculos foram determinados pelo teste de paternidade utilizando 15 marcadores polimórficos (dados não mostrados), que incluem os 13 marcadores do sistema CODIS (Combined DNA Index System)<sup>15</sup>.

Os genótipos correspondentes à região polimórfica (CCG)n apresentaram 3 alelos variando de 6 a 10 repetições, com a seguinte distribuição: P (7/7 repetições), F1 (10/7 repetições), F2 (10/6\* repetições) e F3 (7/7 repetições) (tabela 1). Os dados indicam transmissão instável do alelo paterno (CCG)n=7 para o alelo (CCG)n=6 observado em F2.

## DISCUSSÃO

Os sintomas da esquizofrenia são raramente encontrados associados à DH<sup>16</sup>. Lovestone e colaboradores (1996) descreveram um núcleo familiar com transmissão de expansão patogênica (CAG)n em que todos os quatro

indivíduos afetados apresentaram uma síndrome psiquiátrica grave, sendo que em três foi de natureza esquizofrênica<sup>16</sup>. Dois outros membros vivos sem sinais motores aparentes de DH tinham recebido tratamento psiquiátrico, sendo um para a esquizofrenia. Daí a importância de se realizar o teste molecular específico que visa confirmar ou afastar a suspeita de DH envolvendo achados clínicos confundidores, proporcionando ao paciente receber o tratamento correto e assim uma melhor qualidade de vida.

Neste trabalho observamos que todos os três filhos herdaram alelos (CAG)n>40 expandidos e segregados de forma instável do alelo patogênico paterno (CAG)n=38, tendo todos apresentado a região poliglutamínica maior que a do pai. Também podemos constatar que o único filho a manifestar até o momento os sintomas foi F2, que herdou o alelo apresentando a maior expansão (CAG)n=45.

Tabela 1. Genótipos relativos às repetições (CAG)n e (CCG)n no gene ITT para o núcleo familiar analisado.

AMOSTRA	MARCADOR	PERFIL ALÉLICO a	(CAG)n	(CCG)n	CONDIÇÃO
P	HD1-HD3	135    180	23    38	--    --	Portador
F1	HD1-HD3	114    186	16    40	--    --	Portador
F2	HD1-HD3	114    201	16    45	--    --	Portador
F3	HD1-HD3	108    189	14    41	--    --	Portador
P	HD1-HD4	179    224	--    --	7    7	Portador
F1	HD1-HD4	167    230	--    --	10    7	Portador
F2	HD1-HD4	167    242	--    --	10    6*	Portador
F3	HD1-HD4	152    233	--    --	7    7	Portador

a Tamanho em nucleotídeos

\* Mutação de um passo do alelo paterno (CCG)n=7 transferida para o filho F2 em que se observou o alelo (CCG)n=6.

Este filho apresentou 7 repetições a mais que o progenitor. O aumento no número de repetições CAG resulta em um fenômeno chamado de antecipação genética, no qual a gravidade da doença está associada ao número de repetições CAG no alelo, o que também se correlaciona com a precocidade de início dos sintomas. Esse fenômeno é observado nas sucessivas gerações<sup>17</sup>. Expansões patogênicas são mais frequentemente observadas durante a espermatogênese, o que resulta em maiores taxas de transmissão paterna<sup>18, 19</sup>.

Também realizamos para essa família a análise da expansão (CCG)n adjacente à expansão (CAG)n. Essa expansão também foi polimórfica, com alelos contendo de 6 a 10 repetições, apresentando um baixo polimorfismo comparado ao (CAG)n. Estas variantes não estão relacionados à doença<sup>8</sup>, uma vez que, tanto indivíduos normais quanto portadores de alelos patogênicos (CAG)n apresentam o mesmo padrão de repetições (CCG)n.

## CONCLUSÃO

A doença de Huntington é relativamente rara, contudo considerando a idade de início dos sintomas e as consequências associadas, é muito importante que se faça o diagnóstico genético. Nesta família encontramos o alelo patogênico paterno (CAG)n=38 que exibiu extrema instabilidade meiótica à transmissão para os três filhos genotipados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a família que participou no desenvolvimento desta pesquisa. O trabalho recebeu apoio logístico do Hospital Escola Álvaro Alvim e econômico do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (Nudim), interveniente do termo aditivo ao convênio no. 020 entre a Fundação Benedito Pereira Nunes e a Universidade Estadual do Norte Fluminense, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ Processo APQ-1 E-26/110.386/2010. EM-A é bolsista de produtividade 2 do CNPq na área de concentração em Genética Humana e consultor para o Hospital Escola Álvaro Alvim.

## REFERÊNCIAS

1. Landles C and Bates GP. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 2004; 5: 958-63.
2. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, and Richardson EP, Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44: 559-77.
3. Andresen JM, Gayan J, Djousse L, Roberts S, Brocklebank D, Cherny SS, et al. The relationship between CAG repeat length and age of onset differs for Huntington's disease patients with juvenile onset or adult onset. *Ann Hum Genet* 2007; 71: 295-301.
4. Lima ESTC, Serra HG, Bertuzzo CS, and Lopes-Cendes I. Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58: 11-7.
5. Raskin S, Allan N, Teive HA, Cardoso F, Haddad MS, Levi G, et al. Huntington disease: DNA analysis in Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58: 977-85.
6. Ruocco HH, Lopes-Cendes I, Laurito TL, Li LM, and Cendes F. Clinical presentation of juvenile Huntington disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2006; 64: 5-9.
7. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993; 72: 971-83.
8. Andrew SE, Goldberg YP, Theilmann J, Zeisler J, and Hayden MR. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 65-7.
9. Norremolle A, Riess O, Epplen JT, Fenger K, Hasholt L, and Sorensen SA. Trinucleotide repeat elongation in the Huntington gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1475-6.
10. Langbehn DR, Hayden MR, and Paulsen JS. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B: 397-408.
11. ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1243-7.
12. Groen JL, de Bie RM, Foncke EM, Roos RA, Leenders KL, and Tijssen MA. Late-onset Huntington disease with intermediate CAG repeats: true or false? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 228-30.
13. Panagopoulos I, Lassen C, Kristoffersson U, and Aman P. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated trinucleotide repeat expansion. *Hum Mutat* 1999; 13: 232-6.
14. Todorov T, Todorova A, Georgieva B, and Mitev V. A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in huntington chorea and CGG repeats in fragile X syndrome. *Mol Biotechnol* 2010; 45: 150-4.
15. Rodrigues EL, Machado FB, Arruda MM, de Moura-Neto RS, and Medina-Acosta E. Genetic data on 15 STR autosomal loci for a sample population of the Northern Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 4: e25-6.
16. Lovestone S, Hodgson S, Sham P, Differ AM, and Levy R. Familial psychiatric presentation of Huntington's disease. *J Med Genet* 1996; 33: 128-31.
17. Orr HT and Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 2007; 30: 575-621.
18. Leeflang EP, Zhang L, Tavare S, Hubert R, Srinidhi J, MacDonald ME, et al. Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1519-26.
19. Yoon SR, Dubeau L, de Young M, Wexler NS, and Amheim N. Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8834-8.
20. Bennett RL, French KS, Resta RG, and Doyle DL. Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* 2008; 17: 424-33.