

Vicente Manuel Santos Marques

Doenças de Repetição de Trinucleótidos – Doenças de Antecipação

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2013

Vicente Manuel Santos Marques

Doenças de Repetição de Trinucleótidos – Doenças de Antecipação

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2013

Vicente Manuel Santos Marques

Doenças de Repetição de Trinucleótidos – Doenças de Antecipação

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Vicente Marques

Resumo

As mutações dinâmicas envolvem a expansão do número de unidades repetitivas, presentes em determinado gene ou sua vizinhança, consistindo em unidades repetidas de três ou mais nucleótidos em *tandem* (isto é, adjacentes uma à outra). A repetição de tripletos pode ocorrer em diversos genes e codificar vários aminoácidos.

A instabilidade do tamanho das repetições de tripletos poderá conduzir à sua expansão gradual, podendo os efeitos dessa expansão levar a doenças.

De acordo com o tamanho das expansões podem surgir portadores não afetados (portadores de pré-mutações) e, como o tamanho da expansão pode crescer ao longo de gerações consecutivas, pode resultar em doenças cuja gravidade, apresentação clínica e idade de início da doença são variáveis.

A expansão no número de repetições triplas através das gerações conduz ao fenómeno de antecipação. A antecipação genética é caracterizada por existir uma redução na idade do aparecimento da doença e também por um agravamento dos sintomas nas pessoas afetadas em gerações sucessivas.

A presente monografia descreve detalhadamente as mutações dinâmicas com ênfase nas doenças de repetição de trinucleótidos, fazendo o paralelismo com as doenças de antecipação.

Primeiramente são discutidas as mutações dinâmicas do genoma humano, dando ênfase às repetições de trinucleótidos e classes de doenças associadas. É prestada particular atenção às doenças de X frágil, ataxia de Friedreich, distrofia miotónica, ataxia associada ao X frágil, doença de Huntington e ataxias espinocerebelares.

Por último, discute-se as doenças de antecipação fazendo a ponte com as doenças de repetição de trinucleótidos.

Esta monografia apresenta como principais objetivos:

- Descrever de forma sucinta os diferentes mecanismos causadores das doenças de expansões repetidas instáveis.
- Distinguir as classes de RNAs nas doenças de repetições de tripletos.

- Identificar e descrever minuciosamente as doenças causadas pela repetição de trinucleótidos.
- Correlacionar as doenças de repetições triplas com a antecipação genética.
- Elucidar o processo de antecipação genética.

A elaboração da revisão bibliográfica foi realizada através da pesquisa em publicações científicas, artigos de revisão, livros da especialidade e monografias. A consulta foi efetuada em motores de busca da Universidade Fernando Pessoa, Universidade do Porto, Universidade de Coimbra e Universidade de Aveiro. As palavras-chave utilizadas foram as seguintes: “genoma humano”, “antecipação genética”, “doenças de repetição de trinucleotídeos”, “doenças neurodegenerativas”, “ataxia espinocerebelar”, “doença de Huntington”, “doença de X frágil”, “distrofia miotónica”, “ataxia de Friedrich”, “ataxia associada ao X frágil”.

Abstract

Dynamic mutations involve expansion of the number of repeat units, present in a given gene or its neighborhood, consisting of repeating units of three or more nucleotides in tandem (i.e., adjacent to one another). Triplet repeats may occur in different genes and encode different amino acids.

The instability of triplet repeat size can lead to gradual expansion and the effects of this expansion can lead to disease.

According to expansions sizes, unaffected individuals may appear (carriers of pre-mutations) and, as the expansion size grows through consecutive generations, it may result in diseases that vary in severity, age and clinical presentation. The expansion in repeat number through generations leads to the phenomenon of anticipation. Genetic anticipation is characterized by the reduction in the age of onset of the disease and also by a worsening of symptoms in individuals affected in successive generations.

This work describes dynamic mutations giving emphasis on triplet repeats diseases, making the parallel with disease anticipation.

First we discussed dynamic mutations of the human genome, giving emphasis to trinucleotide repeats and types of associated diseases. Special attention is given to fragile X's disease, Friedreich's ataxia, myotonic dystrophy, fragile X associated with ataxia, Huntington's disease and spinocerebellar ataxias.

Finally we discuss anticipation diseases relating it with trinucleotide repeat diseases. This work has as main goals:

- To describe briefly different mechanisms of unstable repeat expansions causing diseases.
- To distinguish classes of RNAs in triplet repeat diseases.
- To identify and describe diseases caused by trinucleotide repeats.
- To correlate triplet repeat diseases with genetic anticipation.
- To elucidate the process of genetic anticipation.

Literature review search was mainly performed by research in scientific publications, review papers, books and thesis. The query was made in search engines at Fernando Pessoa University, Porto University, University of Coimbra and Aveiro University. Keywords used were as follows: "genome", "genetic anticipation", "trinucleotide repeat diseases", "neurodegenerative diseases", "spinocerebellar ataxia", "Huntington's disease", "fragile X disease", "myotonic dystrophy", "Friedrich's ataxia", "ataxia associated with the fragile X".

... E é justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante. E quando se quer alguma coisa, de todo coração, todo o universo conspira para que possa consegui-la... Paulo Coelho

Agradecimentos

Ao meu pai, Manuel Marques por me ter proporcionado a oportunidade de me formar como aluno e como pessoa, de escrever e concluir a monografia.

À minha mãe, Fernanda Marques pelo carinho, amor e dedicação ao longo da minha vida.

Ao meu irmão João Marques, pela cumplicidade, amizade e dedicação ao longo de todo tempo.

Aos amigos e familiares pelo incentivo da conclusão da monografia.

Aos funcionários e professores da Universidade Fernando Pessoa pelo convívio e amizade ao longo dos anos passados na faculdade.

À Dr.^a Inês Lopes pela paciência e incansável orientação ao longo de todas as etapas da realização da monografia.

I. Introdução	9
II. Genoma humano	10
1. Estrutura do DNA	10
2. Organização dos Cromossomas Humanos	11
3. Mutações Dinâmicas.....	12
III. Doenças de Repetição de Trinucleótidos	13
1.Densidade e distribuição das Repetições de Tripletos	14
2. Distribuição das Repetições de Tripletos nas várias regiões genómicas	15
3. Associação das Repetições de Tripletos com Genes	15
4. Associação de Repetições de Tripletos com o Promotor.....	15
5. A Repetição de Tripletos na Transcrição Humana.....	16
6. Quatro classes estruturais de RNA na Repetição de Tripletos	18
7. A Repetição de Tripletos na Interação com Proteínas.....	19
8. Terapias Experimentais Direcionadas contra Repetições de Tripletos.....	20
9. Classificação das Doenças de Repetição de Tripletos	22
10. Classe 1: Doenças de Repetições de Tripletos Traduzidas (poliglutamina)...	22
10.1. Doença de Huntington.....	23
10.1.1. Patogenia	23
10.1.2. Fenótipo	24
10.1.3. Diagnóstico e Tratamento	27
10.2. Atrofia Dentatorubral-pallidolusian (DRPLA)	28
10.3. Ataxia espinocerebelar (SCA1)	29

10.4. Ataxia espinocerebelar 2 (SCA2)	30
10.5. Ataxia espinocerebelar 3 (SCA3) - Doença de Machado-Joseph (MJD)	30
10.6. Ataxia espinocerebelar 6 (SCA6)	31
10.7. Ataxia espinocerebelar 7 (SCA7)	32
10.8. Ataxia espinocerebelar 17 (SCA17)	33
11. Classe 2: doenças de repetições de tripletos não traduzidas	33
11.1. Síndrome de X frágil	34
11.1.1. Patogenia	34
11.1.2. Fenótipo.....	37
11.1.3. Diagnóstico e Tratamento	40
11.2. Síndrome do Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS)	40
11.2.1. Patogenia	40
11.2.2. Fenótipo.....	42
11.3. Ataxia espinocerebelar 8 (SCA8)	43
11.4. Ataxia de Friedreich	43
11.4.1. Patogenia	43
11.4.2. Fenótipo.....	45
11.4.3. Diagnóstico e Tratamento	46
11.5. Distrofia Miotónica	47
11.5.1. Patogenia	47
11.5.2. Fenótipo.....	49
11.5.3. Diagnóstico e Tratamento	50
IV. DOENÇAS DE ANTECIPAÇÃO	52

1. Antecipação Genética em Doenças Não-Mendelianas	52
2. Antecipação genética na doença de Crohn	54
3. Antecipação genética na Artrite Reumatóide	54
V. CONCLUSÃO.....	55
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	59
VI. BIBLIOGRAFIA.....	60

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da estrutura de DNA.....	11
Figura 2 – Relação direta entre a repetição de trinucleótidos e o fenótipo.....	13
Figura 3 – Representação de repetições de trinucleótidos.....	17
Figura 4 – 20 RNAs de diferentes repetições de tripletos.....	18
Figura 5 – Estratégias terapêuticas que têm como alvo as Repetições de Tripletos.....	21
Figura 6 – Heredograma representativo de indivíduos portador e não portador do alelo HD	27
Figura 7 – Aparência citogenética do cromossoma X na SFX.....	36
Figura 8 – Fenótipo dos portadores da SXF em adulto e criança.....	37
Figura 9 – Heredograma representativo de uma família com dois irmãos afetados e respetivo tamanho dos alelos.....	46
Figura 10 – Fenótipo da DM.....	50
Figura 11 – Heredograma de uma família com distrofia miotónica mostrando antecipação genética (idade em anos).....	50

Índice de tabelas

Tabela 1 – Localização das repetições de tripletos em diversas doenças	23
Tabela 2 – Número de repetições presentes em diversas doenças de repetições de tripletos (poliglutamina).....	24
Tabela 3 – Fármacos candidatos ao tratamento da HD.....	28
Tabela 4 – Localização das repetições de tripletos em diversas doenças de repetição de tripletos não traduzidas.....	34
Tabela 5 – Número de repetições nas doenças de repetição de tripletos não traduzidas.....	35
Tabela 6 – Descrição clínica das etapas da FXTAS.....	44
Tabela 7 – Sintomas clínicos da DM1 e DM2.....	50
Tabela 8 – Idade do início da doença (anos).....	53
Tabela 9 – Análise de dados do NARAC e ARC.....	55

Abreviaturas

A: adenina

BDFN: *brain-derived neurotrophic factor*

C: citosina

CGG: citosina – guanina – guanina

CAG: codão que codifica a glutamina

AF: Ataxia de Friedreich

AFF2: AF4/FMR2 family, member 2

AR: receptor do androgénio

ARC: campanha de pesquisa da Artrite Reumatóide do Reino Unido

ATN1: atrofina 1

ATXN: ataxina

ATXN8OS: *ATXN8 opposite strand (non-protein coding)*

CACNA1A: *calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit*

CNBP: *CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein*

DM: distrofia miotónica

DM1: distrofia miotónica tipo 1

DM2: distrofia miotónica tipo 2

DMPK: *myotonic dystrophy protein kinase*

DMWD: *myotonic dystrophy containing WD repeat motif*

DRPLA: *dentatorubral-pallidolusian atrophy*

DNA: ácido desoxirribonucleico

FMR1: *fragile X mental retardation 1*

FRAX-E: *mental retardation, X-linked*

FRDA: gene codificante da proteína associada a ataxia de Friedreich

FXN: frataxina

FXTAS: síndrome do Tremor/Ataxia associada ao X Frágil

FMR1: *fragile X mental retardation 1 gene*

FMRP: *fragile X mental retardation 1 protein*

G: guanina

HD: doença de Huntington;

HDL2: Huntington's disease-like 2

HTT: huntingtina

JPH3: junctophilin 3

M: maternal

NARAC: Consórcio Norte-Americano da Artrite Reumatóide

OPMD: distrofia oculofaríngeal muscular

P: paternal

PABPN1: *poly(A) binding protein nuclear 1*

Pb: pares de base

Poli-Ala: poli-alanina

Poli-Gln: poli-glutamina

Poli-Glu: poli-ácido glutâmico

Poli-Leu: poli-leucina

PPP2R2B: *protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta isoform*

RNAm: RNA mensageiro

SCA: Ataxia Espinocerebelares

Six5: *homologue of Drosophila sine oculis homeobox 5*

SMBA: spinomuscular bulbar atrophy

SNC: sistema nervoso central

SXF: síndrome de X frágil

TBP: *TATA-box binding protein*

T: tiamina

U: uracilo

I. Introdução

O genoma dos eucariotas apresenta vários tipos de sequências repetitivas, tais como repetições longas, DNA satélite e muitas outras sequências de vários tamanhos e níveis repetitivos ainda não classificados (Boeva *et al.*, 2006; Huntley & Golding, 2004). As repetições de sequências simples ou de microssatélites são encontradas abundantemente em muitos genomas procariotas e eucariotas (Subramanian *et al.*, 2003; McConnell *et al.*, 2007). Segundo McMurray (2010) as sequências repetitivas constituem 30% do genoma humano e, na maioria das espécies, as alterações no comprimento do DNA repetitivo durante a evolução geram diversidade dentro da espécie.

No início dos anos noventa a identificação de uma nova classe de mutações causadora de doenças provocou entusiasmo considerável entre a comunidade que se dedica ao estudo da genética médica (Kryzosiak *et al.*, 2012). Esta classe de mutações é a repetição de trinucleótidos que pertence a uma família de microssatélites também conhecida como sequências de repetição em *tandem* e demonstra alta taxa de mutação, encontrando-se tanto em genomas procariotas como em eucariotas (Sobczak *et al.*, 2010; Huntley & Golding, 2004).

A instabilidade genética da repetição de tripletos é uma característica comum de certo tipo de doenças neurológicas hereditárias (Jakupciak & Wells, 1999). Aproximadamente 20 desordens neurológicas e neuromusculares são causadas pela expansão das repetições de trinucleótidos, e embora nos últimos anos se tenham verificado avanços, muitos mecanismos permanecem enigmáticos (McMurray, 2010; Jung *et al.*, 2011). As doenças de repetições de tripletos incluem a distrofia miotônica, ataxia espinocerebelar tipos 1, 2, 3, 6, 7 e 8, doença de Huntington, síndrome de X frágil, ataxia de Friedreich, síndrome de Haw River, e síndrome de Jacobsen. A causa destas doenças tem sido atribuída à variação genética no número de repetições de tripletos CTG-CAG, CGG-CCG ou GAA-TTC nos genes associados (Jakupciak & Wells, 2000; Jung *et al.*, 2011).

A idade de manifestação dos sintomas destas doenças segue um padrão genético fora do comum chamado de antecipação, em que a doença se torna mais severa e assume expressão mais precoce de geração em geração (Jakupciak & Wells, 2000; Jung *et al.*, 2011). Estes fenómenos de antecipação têm sido descritos em doenças geneticamente

complexas, tais como transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, doença de Crohn e psoríase (Deighton *et al.*, 2007; Lima, 1999).

Segundo Wells (2000) todas as doenças de repetições de tripletos identificadas até à data demonstram antecipação. Devido a esta correlação entre a repetição de tripletos e antecipação, muitas outras doenças podem ser identificadas, uma vez que existem mais de 40 genes que estão associados à repetição de tripletos.

Apesar de os investigadores terem vindo a fazer esforços no desenvolvimento de tratamentos para as expansões repetidas instáveis há quase duas décadas, as doenças de repetição de tripletos permanecem incuráveis (Krzyszosiak *et al.*, 2012).

II. Genoma humano

1. Estrutura do DNA

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é considerado uma macromolécula de ácido nucléico polimérica, sendo cada unidade monomérica, o nucleótido, composta por um açúcar com cinco carbonos (desoxirribose), um grupo fosfato, e uma base azotada (Nussbaum *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2003). Estas bases azotadas podem ser púricas (adenina (A) e guanina (G)) ou pirimídicas (citosina (C) e tiamina (T)) (Regateiro, 2007). Os nucleótidos ligam-se por intermédio de ligações 5'-3' fosfodiéster que se estabelecem entre unidades de desoxirribose adjacentes (Nussbaum *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2003).

A molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas ligadas entre si por pontes de hidrogénio estabelecidas entre as bases azotadas de cada cadeia, estando estas orientadas para o interior da cadeia dupla (Nussbaum *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2003). A ligação entre as bases azotadas não é feita ao acaso, há complementariedade entre as cadeias que resulta do emparelhamento entre A e T (duas ligações de hidrogénio) e entre G e C (três ligações de hidrogénio) (Videira, 2001). Assim sendo, as regiões da dupla hélice que contenham maior quantidade de pares de bases G-C são mais estáveis do que aquelas em que predominam os pares de bases A-T (Figura 1) (Regateiro, 2007).

Segundo Wang e colaboradores (2009) o DNA não é uma molécula uniforme podendo adotar mais que 10 tipos de conformações diferentes da estrutura clássica do DNA proposta por Watson e Crick.

A estrutura anatômica do DNA suporta a informação química que permite a transmissão exata da informação genética de uma célula para as suas células-filhas, e de uma geração à próxima geração (Nussbaum *et al.*, 2007).

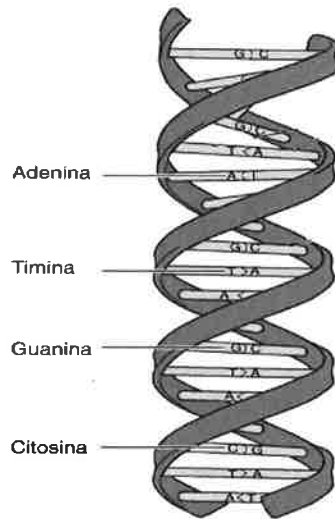


Figura 1 – Esquema representativo da estrutura de DNA (adaptado e modificado de Videira, 2001).

2. Organização dos Cromossomas Humanos

O genoma humano tem uma componente mitocondrial e uma componente nuclear, encontrando-se o genoma nuclear nos 23 pares de cromossomas presentes no ovo ou zigoto e o genoma mitocondrial nas mitocôndrias do ovo (Regateiro, 2007). Cada cromossoma humano consiste numa dupla hélice de DNA única e contínua totalizando mais de 6 bilhões de nucleótidos, havendo regiões cromossômicas ricas em genes e outras pobres em genes (Nussbaum *et al.*, 2007).

Segundo Baldi e Baisnée (2000), a estrutura da cromatina (DNA) e o posicionamento dos nucleossomas ao longo do genoma, estão relacionados com a regulação da transcrição dos genes.

Somente cerca de metade do comprimento total linear do genoma consiste em DNA único, isto é DNA cuja sequência de nucleótidos aparece representada somente uma vez,

o restante genoma consiste em várias classes de DNA repetitivo e inclui DNA cuja sequência de nucleótidos é repetida centenas de milhões de vezes no genoma (Nussbaum *et al.*, 2007; Calabrese *et al.*, 2001). Estas repetições contribuem para a variação entre indivíduos diferentes, para além da recombinação genética e das mutações que são as principais causas de diversidade genética (Regateiro, 2007).

3. Mutações Dinâmicas

Segundo Videira (2001) as mutações são alterações permanentes do genoma de uma célula relativamente a uma sequência de DNA de referência, sendo transmissíveis às células filhas. Esta alteração pode ser de apenas um único nucleótido ou ser mais extensa.

As mutações dinâmicas envolvem a expansão do número de unidades repetitivas, presentes em determinado gene ou na sua vizinhança, consistindo em unidades repetidas de três ou mais nucleótidos em *tandem* (isto é, adjacentes uma à outra) (Regateiro, 2007). A presença destas repetições leva a uma maior possibilidade de ocorrência de deslizamentos da enzima DNA polimerase, podendo esta inserir nucleótidos a mais nesse segmento durante a replicação do DNA (Lima, 1999).

Segundo Boeva *et al.* (2006) as repetições em *tandem* são geralmente classificadas em microssatélites (1-6 pb), minissatélites (6-24 pb, e em alguns casos mais longas) e os satélites clássicos. Este tipo de repetições em *tandem* tem sido encontrado na regulação de regiões de genes eucariotas, interagindo com os fatores de transcrição (McConnell *et al.*, 2007).

O grau de propagação da repetição de trinucleótidos varia de genoma para genoma, e resulta de rearranjos e erros durante a replicação. Nesta perspetiva, grande parte do DNA genómico repetitivo pode ser considerado como não informativo, no entanto a presença de *tandems* pode estar relacionada com uma função biológica. Por exemplo, longas repetições em *tandem* constituem uma grande função da heterocromatina e estão envolvidos na formação e função do centrómero (Boeva *et al.*, 2006).

A repetição de trinucleótidos polimórficos é melhor tolerada do que a repetição de sequências traduzidas de dinucleótidos e tetranucleótidos porque a variação no comprimento não altera o quadro de leitura (Sobczak *et al.*, 2010).

Em indivíduos normais, os cromossomas contêm um determinado número de repetições de tripletos (geralmente 5-37), que são polimórficos na população geral (Figura 2) (Jakupciak & Wells, 2000). O aumento no número de repetições de tripletos para um valor de 50-120 está associado com algumas doenças/síndromes (Jakupciak & Wells, 1999).

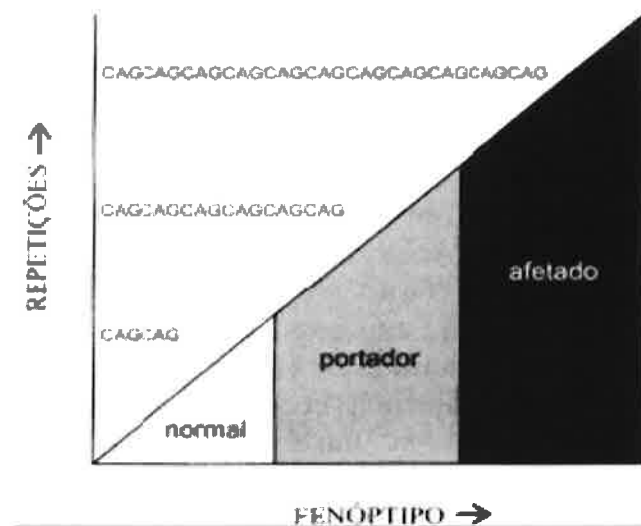


Figura 2 – Relação direta entre a repetição de trinucleótidos e o fenótipo (adaptado de Lima, 1999).

Segundo Krzyzosiak *et al.* (2012) cada doença está associada a mutações num único gene, o que desencadearia o processo de patogénia através de expressão aberrante ou através de propriedades tóxicas e proteínas mutantes. Este mesmo estudo revelou que o RNA mutante e a proteína mutante podem agir em paralelo exercendo os efeitos patogénicos nas doenças de repetição de tripletos de forma independente (Krzyzosiak *et al.*, 2012).

III. Doenças de Repetição de Trinucleótidos

As doenças de repetição de trinucleótidos são a classe de microssatélites mais variada e interessante da sequência genómica (Young, *et al.*, 2000; Calabrese *et al.*, 2001).

Existem 64 tripletos de nucleótidos classificados como repetições de mononucleótidos como é o caso de AAA, TTT, GGG, ou CCC (Young, *et al.*, 2000). É considerado que a repetição do triplete AGC é o mesmo que o triplete GCA ou CAG, o mesmo acontece com as outras repetições de tripletos (Young, *et al.*, 2000). O anexo 1 demonstra a posição de 9 de 10 tipos diferentes de repetições de trinucleótidos na *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Densidade e distribuição das Repetições de Tripletos

Um estudo realizado por Subramanian e colaboradores (2003) analisou as sequências de DNA humano a partir do *Genbank* com o propósito de analisar tipos de repetições de tripletos AAC, AAG, AAT, ACC, ACG, ACT, CAG, AGG, ATC e CCG. Este estudo foi realizado utilizando um programa informático desenvolvido para detetar a abundância e distribuição das repetições de tripletos nas porções codificantes e não codificantes do genoma. Posteriormente, foi calculada a densidade de repetições para cada tipo de repetição e a densidade de repetições (pb/Mb) em cada cromossoma.

O cromossoma 1 apresentou o maior número de repetições de tripletos enquanto o cromossoma Y apresentou o menor número. A repetição AAT foi a que apresentou maior densidade na totalidade do genoma. A média de comprimento desta repetição foi de 282 pb/Mb por sequência. Em segundo lugar estavam as repetições de tripletos AAC (média de 193 pb/Mb), AAG e AGG (ambas com 77 pb/Mb). As repetições ACG registaram a menor densidade (a média variou entre 0 e 1 pb/Mb) na maioria dos cromossomas, seguida das repetições ACT como as segundas menos densas com uma média de 9 pb/Mb (Subramanian *et al.*, 2003).

O número de repetições é inversamente proporcional à ocorrência, verificando-se a seguinte distribuição de repetições de tripletos: AAT (26 037), AAC (18 707), seguido por AGG (10 245) que registou o número máximo de ocorrências para 4 repetições em *tandem*. No entanto, comprimentos mais curtos de 4 repetições em *tandem* de ACG e ACT não são encontrados predominantemente no genoma humano (Subramanian *et al.*, 2003).

2. Distribuição das Repetições de Tripletos nas várias regiões genômicas

A análise dos tipos de repetições de tripletos em termos de ocorrência foi conclusiva quanto à abundância de repetições AAT nos intrões comparativamente à sua ocorrência nos exões e regiões UTRs (Subramanian *et al.*, 2003; Young, *et al.*, 2000).

As repetições AAC são as segundas mais abundantes e as repetições ACG e ACT revelaram uma presença pobre em todas as regiões analisadas. Isto sugere que a ocorrência destas repetições é geralmente menos abundante (Subramanian *et al.*, 2003; Young, *et al.*, 2000).

Nas regiões exônicas, as repetições de tripletos, tais como AGC, AGG, CCG, são respectivamente as mais abundantes, enquanto nas UTRs, os tripletos, tais como CCG e AAT seguidos por AAC mostraram ocorrência predominante, embora sejam valores relativamente baixos quando comparados com a sua ocorrência em regiões exônicas (Subramanian *et al.*, 2003; Young, *et al.*, 2000).

3. Associação das Repetições de Tripletos com Genes

A análise por Subramanian e colaboradores (2003) apurou que cerca de 2135 genes continham pelo menos um tipo de repetição de tripletos nos seus exões com pelo menos quatro repetições em *tandem*. Destes 2135 genes, foram identificados 171 genes que continham repetições de comprimento de pelo menos 30 pb.

A análise revelou que os genes apresentam sobretudo repetições AGC e CCG. Já as repetições dos tipos AAC, AAT, AAG, ACC e ATC não são predominantemente encontradas em genes. Mais ainda, repetições de tripletos ACT e ACG estão completamente ausentes (Subramanian *et al.*, 2003; Young, *et al.*, 2000).

4. Associação de Repetições de Tripletos com o Promotor

A análise de sequências de 500 pb no promotor dos genes revelou a existência de associações preferenciais de certas repetições com este tipo de sequências. A grande parte das sequências do promotor contém repetições em *tandem* CCG (Subramanian *et al.*, 2003). O segundo tipo de repetição mais abundante nas regiões promotoras é a

sequência AGG seguida pela sequência AAT e AAC (Subramanian *et al.*, 2003; Young, *et al.*, 2000). A abundância destas duas últimas repetições pode ser explicada com base na sua predominância global no genoma, mas isto não é verdade no caso das repetições CCG e AGG (Subramanian *et al.*, 2003). Por esta razão não é fácil explicar a predominância da sequência CCG no promotor, no entanto como as regiões promotoras dos genes contêm ilhas CpG, é significativo que a maioria das sequências do promotor contenha repetições CCG (Subramanian *et al.*, 2003).

Dos 269 genes que continham pelo menos uma repetição de tripletos na região do promotor, nenhuma sequência do promotor continha repetições ACT (Subramanian *et al.*, 2003).

5. A Repetição de Tripletos na Transcrição Humana

A grande abundância de algumas repetições de trinucleótidos no genoma das células, levanta questões sobre quais os papéis que estas sequências podem desempenhar na transcrição. As repetições de trinucleótidos diferem em comprimento, sendo que o nível de expressão genética depende das estruturas secundárias que se podem formar nestas regiões mas também da presença de repetições que quebram a homogeneidade do trato da repetição (Krzyzosiak *et al.*, 2012; Rolfsmeier *et al.*, 2001).

De facto, uma pesquisa recente relativa ao genoma humano demonstrou que este possui mais de 32000 extensões de ininterruptas repetições de trinucleótidos compostas por seis ou mais unidades repetidas (Sobczak *et al.*, 2010). Mesmo os exões humanos, que representam menos de 3% da sequência genómica, exibem até 1030 extensões de repetições de trinucleótidos. Estas foram identificadas em sequências exónicas de 878 genes (Krzyzosiak *et al.*, 2012). As repetições de trinucleótidos que estão fortemente representadas em exões são do tipo CNG (onde N representa qualquer nucleótido), CGA e AGG (Krzyzosiak *et al.*, 2012; Rolfsmeier *et al.*, 2001). No entanto, as repetições CTT, CAT, CAA, TAA e TTA encontram-se sub-representadas (Krzyzosiak *et al.*, 2012; Rolfsmeier *et al.*, 2001).

Sequências de repetições de trinucleótidos ricas em AT, como CTT, AAC e AAT estão particularmente sub-representadas nos exões enquanto repetições ricas em GC (CGG, CAG e CCG) estão altamente representadas sugerindo assim um significado funcional

para estas sequências (Figura 3) (Sobczak *et al.*, 2010; Young, *et al.*, 2000). Mais ainda, as sequências mais curtas são mais prevalentes, e a frequência da repetição de trinucleótidos diminui exponencialmente com o seu comprimento (Krzyzosiak *et al.*, 2012).

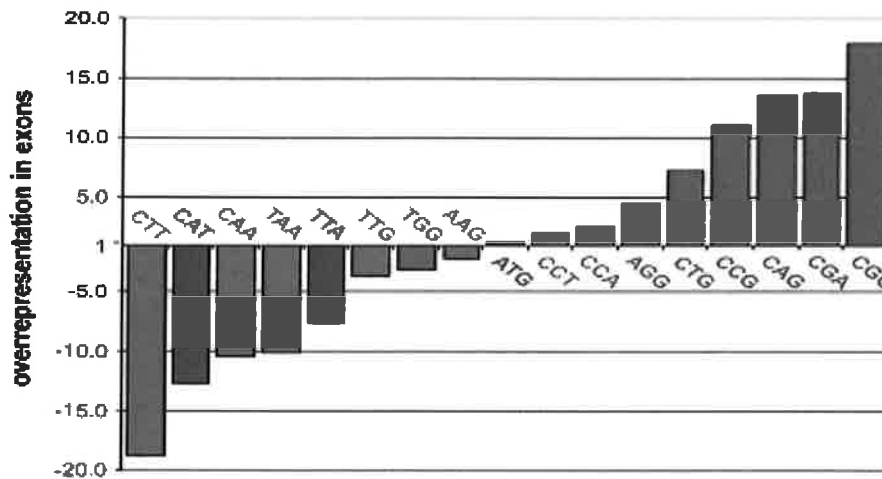


Figura 3 – Representação de repetições de trinucleótidos compostas por pelo menos seis unidades repetitivas. As cores das barras demonstram os quatro tipos de estrutura secundária do RNA representados na Figura 4 (Krzyzosiak *et al.*, 2012).

Nos exões, cerca de 60% da sequência de repetição de trinucleótidos está localizada na região de quadro de leitura aberto, sendo que os codões de repetição são traduzidos em extensões de poli-Gln, poli-Ala, poli-Glu e poli-Leu (Sobczak *et al.*, 2010). Verifica-se que as repetições de trinucleótidos CCA, CAG, CTG CCT AGG AAG ATG ocorrem frequentemente na região de quadro de leitura aberto (Krzyzosiak *et al.*, 2012). Para além disso, cerca de 28% das repetições presentes nos genes estão localizadas na região 5'-UTR (sendo mais frequentes as repetições CCG e CGG com uma frequência de 52% e 62%, respetivamente) e 13% na região 3'-UTR (sendo abundantes as repetições de trinucleótidos ricas em AT) (Krzyzosiak *et al.*, 2012).

Estudos funcionais têm sido realizados com o intuito de clarificar os papéis desempenhados pela repetição de trinucleótidos presentes em genes. Krzyzosiak e colaboradores (2012) verificaram que estes genes codificam (i) proteínas com funções relacionadas com a transcrição e (ii) proteínas que interagem com os ácidos nucleicos.

Segundo Sobczak e colaboradores (2010) a repetição de trinucleótidos e sequências não estruturadas podem desempenhar um papel importante na regulação de numerosos processos celulares, tais como a reparação no decurso da replicação do DNA, e várias etapas da expressão genética.

6. Quatro classes estruturais de RNA na Repetição de Tripletos

A análise funcional da repetição de tripletos em RNAs, através de estruturas de oligorribonucleótidos (ORNs) compostas por muitas repetições de tripletos específicos tem sido investigada em diferentes condições experimentais. Os ORNs examinados primeiro foram do tipo GNC (N=A, C, G, ou U). Todos estes ORNs foram encontrados a formar estruturas em gancho (*hairpin*) como demonstrado pela estrutura química e enzimática (Figura 4) (Kryzosiak *et al.*, 2012; Rolfsmeier *et al.*, 2001).

O gancho constituído por repetições GNC demonstrou ser composto periodicamente por pares de bases C-G e pares de bases G-C, sendo o *loop* do gancho formado por quaisquer quatro ou sete nucleótidos (Kryzosiak *et al.*, 2012). À exceção do gancho CGG, todas as outras repetições CNG formam ganchos “escorregadios”, isto é têm tendência a formar alinhamentos alternativos a menos que seja fixada uma conformação por uma braçadeira G-C (Kryzosiak *et al.*, 2012).

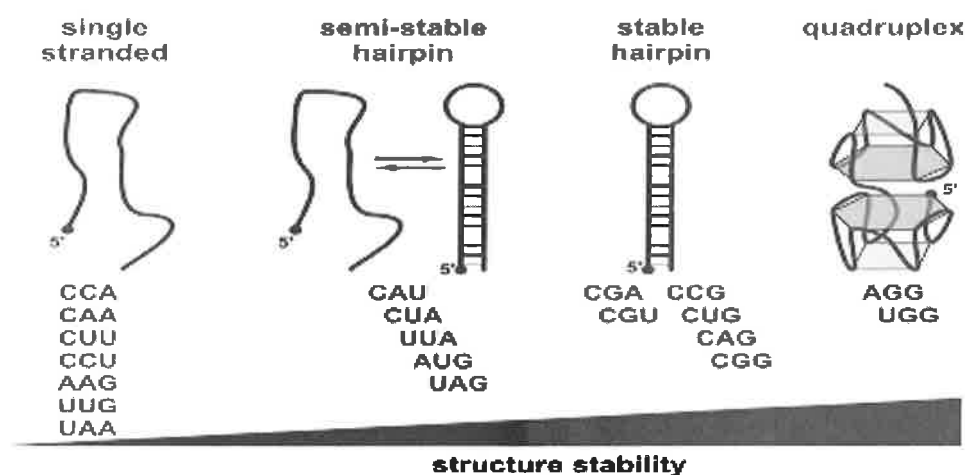


Figura 4 – 20 RNAs de diferentes repetições de tripletos pertencem a quatro classes estruturais. No diagrama, estão ordenados da esquerda para a direita de forma crescente de acordo com a estabilidade termodinâmica da sua estrutura secundária: sete repetições de tripletos são de cadeia simples mesmo a

baixa temperatura (4°C), cinco repetições ricas em AU formam ganchos (*hairpins*) semi-estáveis em condições fisiológicas, as outras seis repetições de tripletos ricas em GC formam estruturas em forma de gancho estáveis, as últimas duas repetições de tripletos formam estruturas quadruplexos que são as mais estáveis.

Um estudo realizado por Sobczak e colaboradores (2010) realizou uma análise comparativa de 20 repetições de tripletos usando uma estrutura bioquímica bem como a análise da mobilidade em gel formando estruturas de RNA de quatro classes. As repetições AGG e UGG formam estruturas quadruplexos consideradas as estruturas mais estáveis, seguido das repetições CGA, CGU e as repetições CNG formam ganchos que são mais estáveis que repetições UAG, AUG, UUA, CUA e CAU enquanto repetições CAA, UUG, AAG, CUU, CCU, CAA e UAA não formam nenhuma estrutura de ordem superior (Rolfsmeier *et al.*, 2001; Sobczak *et al.*, 2010). Através da análise de repetições de gancho e quadruplexos com o auxílio de métodos biofísicos revelaram a seguinte ordem de estabilidade para repetições CNG: CGG>CAG>CUG>CCG. A estabilidade das estruturas quadruplexos AGG e UGG é semelhante (Rolfsmeier *et al.*, 2001; Sobczak *et al.*, 2010).

7. A Repetição de Tripletos na Interação com Proteínas

O estudo das proteínas resultantes da sequência de trinucleótidos presente nas doenças de repetição de tripletos, tem tido particular interesse no estudo das características tóxicas dos transcritos mutantes (Stevens *et al.*, 2013). Os estudos realizados direcionaram-se sobretudo para a identificação e caracterização estrutural das proteínas que resultam da repetição de tripletos (Stevens *et al.*, 2013).

As proteínas celulares que ajudam na formação ou no processamento de *hairpins* são apontadas como um dos responsáveis para a expansão da repetição de trinucleótidos (Stevens *et al.*, 2013).

Usando ratinhos como modelo, verificou-se que a proteína de reconhecimento de erros de emparelhamento MutS β é um agente causador da expansão de tripletos em doenças como HD e DM1 (Stevens *et al.*, 2013). A grande maioria das expansões somáticas herdadas está bloqueada por *knockout* dos genes Msh2 ou Msh3 que codificam as duas

subunidades da proteína MutS β (Stevens *et al.*, 2013). Estudos efetuados em ratos demonstraram que a reparação de erros de emparelhamento executada pelo complexo Msh2-Msh3 é essencial para a expansão da repetição CAG em células germinativas e em células somáticas (Liu & Wilson, 2012). Esta evidência suporta a hipótese de que a reparação de erros de emparelhamento no DNA é uma importante fonte de expansão especialmente em tecidos não-proliferativos em que a replicação é reduzida (Stevens *et al.*, 2013).

8. Terapias Experimentais Direcionadas contra Repetições de Tripletos

O desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos baseia-se nas diferenças existentes entre os transcritos normais e os mutantes no que diz respeito ao comprimento da sequência de repetição e a estruturas secundárias que esta sequência pode originar (Kryzosiak *et al.*, 2012).

Até ao momento, foram desenvolvidas três estratégias principais direcionadas contra a repetição de tripletos. A primeira estratégia baseia-se na degradação dos transcritos mutantes utilizando RNA de interferência (RNAi) ou oligonucleótidos complementares ao RNA mutante (*antisense*, AON). A segunda estratégia utiliza repetições específicas em forma de gancho (*hairpin*) ou oligómeros *antisense* para inibir interações patogênicas entre as repetições do RNA e proteínas nucleares. Por fim, a terceira estratégia visa bloquear a síntese de proteínas tóxicas através da ligação de oligómeros *antisense* modificados quimicamente a repetições ou visando repetições com siRNAs mutantes atuando como miRNAs (Figura 5) (Kryzosiak *et al.*, 2012).

Uma questão importante na terapia direcionada às repetições de tripletos é o requisito para a seletividade do gene e do alelo. Embora existam numerosos RNAs contendo repetições de tripletos no transcriptoma humano, a inibição específica da expressão do gene mutante alvejando certas regiões de repetição é uma terapêutica promissora para doenças causadas por repetições CAG e CUG (Kryzosiak *et al.*, 2012).

De acordo com o seu mecanismo de ação, reagentes *antisense* podem ser divididos em duas categorias: *Cutters* que se ligam a alvos complementares e induzem a sua clivagem (exemplo: RNaseH ou Argonaute 2 (AGO2), AON ou siRNA); e *blockers* que são oligómeros que se ligam a alvos complementares, quer isoladamente ou em complexos

proteicos, mas que não induzem a clivagem do seu “alvo complementar” (exemplo: PNAs, LNA, morfolino e miRNA). Os mecanismos de ação dos reagentes descritos não são ainda conhecidos ao pormenor.

A necessidade de inibição seletiva da expressão do alelo mutante pode não ter a mesma importância para todas as doenças de repetição de poliglutamina, no entanto, preservar a expressão do alelo normal levando à produção da proteína parece ser uma característica vantajosa de qualquer estratégia terapêutica (Krzyszosiak *et al.*, 2012).

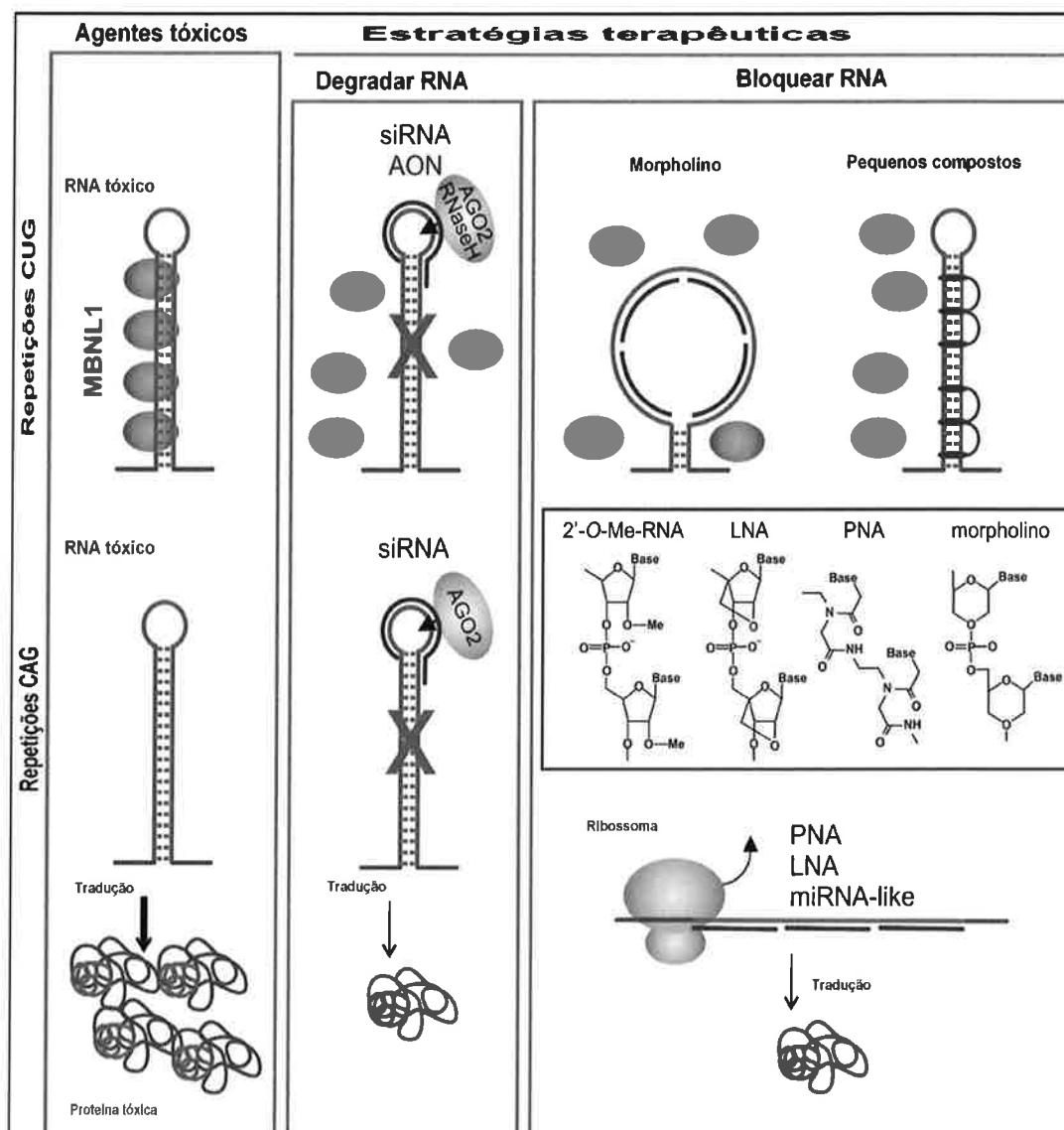


Figura 5 – Estratégias terapêuticas que têm como alvo os transcritos das Repetições de Tripletos.

9. Classificação das Doenças de Repetição de Tripletos

O número de doenças neurodegenerativas de repetição de trinucleótidos está a aumentar, tal como a complexidade das suas patologias moleculares (Everett & Wood, 2004).

Mais de 20 genes diferentes contendo repetições de tripletos instáveis têm provocado a patogénese de doenças neurológicas em humanos. Repetições como CTG, CGG, GAA e repetições de CAG, são fontes de alterações degenerativas levando a doenças como distrofia miotónica 1 (DM1), ataxia associada ao X frágil (FXTAS), ataxia de Friedreich (FRDA), bem como a doença de Huntington (HD) e uma alargada gama de ataxias espinocerebelares (SCAs) (Krzyzosiak *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2002).

Existem duas classes de doenças de repetições de tripletos. A primeira classe corresponde ao grupo de doenças em que a repetição de tripletos expandida é traduzida numa cadeia de glutaminas (poliglutamina), o que resulta na formação de agregados proteicos dentro da célula (Everett & Wood, 2004; Krzyzosiak *et al.*, 2012). A presença destes agregados leva ao aparecimento da função tóxica da proteína mutante (Everett & Wood, 2004) Na segunda classe a repetição de trinucleótidos encontra-se em regiões não traduzidas de um gene. Esta segunda classe apresenta mecanismos mais variados, incluindo a repressão genética (Everett & Wood, 2004).

10. Classe 1: Doenças de Repetições de Tripletos Traduzidas (poliglutamina)

Tabela 1 – Localização das repetições de tripletos (poliglutamina) em diversas doenças.

DOENÇA	SEQUÊNCIA	LOCALIZAÇÃO	ORIGEM DA EXPANSÃO PARENTAL
DRPLA	CAG	<i>ATN1</i> (exão 5)	P
HD	CAG	<i>HTT</i> (exão 1)	P
SCA1	CAG	<i>ATXN1</i> (exão 8)	P
SCA2	CAG	<i>ATXN2</i> (exão 1)	P
SCA3 (Doença Machado-Joseph)	CAG	<i>ATXN3</i> (exão 8)	P
SCA6	CAG	<i>CACNA1A</i> (exão 47)	P
SCA7	CAG	<i>ATXN7</i> (exão 3)	P

SCA17	CAG	<i>TBP</i> (exão 3)	P > M
SMBA	CAG	<i>AR</i> (exão 1)	P
OPMD	GCN	<i>PABPN1</i> (exão 1)	P e M

Tabela 2 - Número de repetições presentes em diversas doenças de repetições de tripletos (poliglutamina).

DOENÇA	NÚMERO DE REPETIÇÕES (NORMAL)	NÚMERO DE REPETIÇÕES (PRÉ-MUTAÇÃO)	NÚMERO DE REPETIÇÃO (DOENÇA)	INSTABILIDADE SOMÁTICA
DRPLA	6–35	35–48	49–88	Sim
HD	6–29	29–37	38–180	Sim
SCA1	6–39	40	41–83	Sim
SCA2	<31	31–32	32–200	Desconhecido
SCA3 (Doença Machado–Joseph)	12–40	41–85	52–86	Desconhecido
SCA6	<18	19	20–33	Não encontrado
SCA7	4–17	28–33	>36 a >460	Sim
SCA17	25–42	43–48	45–66	Sim
SMBA	13–31	32–39	40	Não encontrado
OPMD	10	12–17	>11	Não encontrado

10.1. Doença de Huntington

10.1.1. Patogenia

A doença de Huntington é um distúrbio autossômico dominante, neurodegenerativo progressivo, causado por uma mutação no gene HD (Jeong *et al.*, 2009; Paulsen *et al.*, 2006). Ambos os sexos são afetados pela doença com a mesma frequência e a prevalência varia de 5 a 10 casos por 100.000 entre europeus ocidentais e América do Norte (Borrell-Pagès *et al.*, 2007).

Mutações no gene HD resultam geralmente da expansão da sequência de repetição CAG codificante de uma sequência poliglutamina no exão 1 (Nussbaum *et al.*, 2007). Os alelos normais de HD apresentam entre 6 e 29 repetições, enquanto alelos mutantes apresentam mais de 38 repetições (McMurray, 2010).

A huntingtina, proteína codificada pelo gene HD é expressa de forma ubíqua, encontrando-se abundantemente distribuída no cérebro (Thieben *et al.*, 2002; Krobitch & Kazantsev, 2011).

A primeira e mais visível alteração neurológica na doença de Huntington é encontrada no córtex cerebral mesmo antes dos sintomas aparecerem (Krobitch & Kazantsev, 2011). Esta alteração envolve neurónios com a proteína mutante huntingtina (Krobitch & Kazantsev, 2011). Esta proteína mutante é apontada como responsável pela disfunção a nível neuronal e em último caso pela morte das células (Krobitch & Kazantsev, 2011; Thieben *et al.*, 2002).

No cérebro, a proteína huntingtina encontra-se altamente expressa no neocórtex, no córtex cerebral, e no hipocampus (Borrell-Pagès *et al.*, 2007). Estudos indicam que a proteína está envolvida em várias funções celulares no citoplasma e no núcleo (Borrell-Pagès *et al.*, 2007). O papel molecular da proteína huntingtina permanece ainda incerto nas células neuronais e não neuronais, assim como a relevância da poliglutamina na doença de huntington (Krobitch & Kazantsev, 2011). No entanto, a função da proteína huntingtina está associada ao desenvolvimento embrionário e neurogénese, assim como a vários processos celulares tais como o transporte de ferro, produção e transporte do fator BDNF, transcrição neuronal, em processos anti-apoptóticos e na transmissão sinática (Krobitch & Kazantsev, 2011).

Um estudo efectuado por Paulsen e colaboradores (2006) no estágio pré-clínico da doença mostrou a existência de anomalias na morfologia cerebral incluindo uma distribuição anormal com volume reduzido da matéria branca e aumento do volume de matéria cinzenta cortical. Este tipo de alterações verifica-se a nível geral e não numa região específica do cérebro.

10.1.2. Fenótipo

A idade do paciente no início da doença é inversamente proporcional ao número de repetições CAG presentes no gene HD (Nussbaum *et al.*, 2007). Pacientes que apresentam o início da doença em idade adulta, possuem geralmente 40-55 repetições e pacientes com início da doença em idade juvenil possuem mais de 60 repetições (Nussbaum *et al.*, 2007). Pacientes que apresentem entre 36-41 repetições CAG exibem

penetrância reduzida, ou seja podem ou não desenvolver a doença de Huntington durante a sua vida.

Para além da relação com a idade de início dos sintomas, o número de repetições não se encontra relacionado com quaisquer outras características da doença (Nussbaum *et al.*, 2007; McMurray, 2010).

Devido à correlação inversa entre o comprimento da repetição CAG e a idade de início, indivíduos que herdaram a mutação do pai, possuem um maior risco de desenvolver a doença com início precoce. Estudos mostraram que cerca de 8% dos pacientes juvenis herdaram o gene HD mutante do pai (Nussbaum *et al.*, 2007).

A instabilidade e expansão das repetições CAG nos alelos HD mutantes resultam frequentemente no fenómeno de antecipação, ou seja idades de início da doença progressivamente mais baixas em gerações sucessivas (Nussbaum *et al.*, 2007). Geralmente, o comprimento das repetições expande-se durante a transmissão paterna. Já na transmissão materna a expansão ocorre com menor frequência do que a expansão na transmissão paterna (Nussbaum *et al.*, 2007; McMurray, 2010).

A idade média dos pacientes quando começam a manifestar-se os sintomas da doença é de aproximadamente entre os 35-50 anos de idade (Aylward *et al.*, 2000). Um quarto dos pacientes desenvolve a doença após os 50 anos de idade e cerca de um décimo dos pacientes apresenta sintomas antes dos 20 anos de idade (Nussbaum *et al.*, 2007).

A sobrevida média após o diagnóstico é aproximadamente de 15 a 18 anos, e a idade média de morte é por volta dos 54-55 anos (Nussbaum *et al.*, 2007).

A doença de Huntigton é caracterizada sobretudo por anomalias motoras e anomalias psiquiátricas progressivas. Os distúrbios motores envolvem tanto os movimentos voluntários como os involuntários. Inicialmente esses movimentos pouco interferem nas actividades diárias, mas tornam-se incapacitantes com a progressão da doença. Geralmente, passados 15 anos desde o início da manifestação dos sintomas o paciente morre (Jeong *et al.*, 2009).

Aproximadamente um terço dos pacientes manifesta anomalias psiquiátricas e dois terços dos pacientes manifestam distúrbios cognitivos e motores (Nussbaum *et al.*, 2007).

A coréia, que esta presente em mais de 90% dos pacientes, é o movimento involuntário mais comum da doença e é caracterizada por movimentos espasmódicos não repetitivos e não periódicos e que não podem ser suprimidos voluntariamente (Nussbaum *et al.*, 2007; Aylward *et al.*, 2004).

As anomalias cognitivas manifestam-se desde cedo na doença afetando todos os aspetos da cognição. De forma geral, a linguagem é afetada mais tardiamente do que as outras funções cognitivas. Distúrbios comportamentais, que geralmente se desenvolvem no decurso da doença, incluem desinibição social, agressão, explosões de temperamento, apatia, desvio sexual e aumento do apetite. As manifestações psiquiátricas que podem desenvolver-se a qualquer momento da doença, incluem alterações de personalidade, como psicose afetiva e esquizofrenia (Nussbaum *et al.*, 2007; Thieben *et al.*, 2002).

Nos estágios finais da doença, os pacientes geralmente desenvolvem incapacidades motoras tão graves que passam a ser totalmente dependente de outros (Nussbaum *et al.*, 2007).

Aproximadamente 3% dos pacientes desenvolvem a doença de Huntington como resultado de uma nova expansão da repetição CAG, e 97% herdaram um alelo mutante de um dos pais afetados. Genes mutantes surgem a partir de uma expansão na pré-mutação até se tornar numa mutação completa. Todos os pacientes descritos na literatura herdaram mutações completas do pai (Nussbaum *et al.*, 2007; McMurray, 2010).

Cada descendente de um pai portador da doença de Huntington tem cerca de 50% de risco de herdar o alelo HD mutante, à exceção dos alelos com penetrância incompleta. Todas as crianças que herdaram um alelo HD mutante desenvolverão a doença se tiverem tempo de vida normal (Nussbaum *et al.*, 2007; McMurray, 2010).

Crianças que têm pais portadores de uma pré-mutação possuem um risco de cerca de 3% de herdarem um alelo HD no qual a pré-mutação se expandiu a uma mutação completa (Nussbaum *et al.*, 2007) (Figura 6).

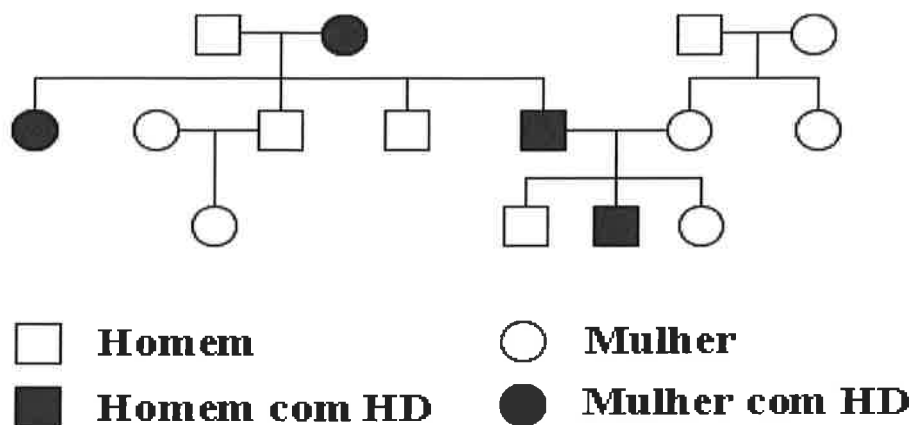


Figura 6 – Heredograma representativo de família com HD.

10.1.3. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico clínico da doença de Huntington, que se manifesta nos pacientes por volta dos 40 ou 50 anos, baseia-se na presença de movimentos involuntários (córea, distonia, rigidez) (Krobitsch & Kazantsev, 2011).

Nos dias de hoje ainda não existe um tratamento eficaz para a doença de Huntington. A terapia é focada nos cuidados de apoio, assim como no tratamento farmacológico a nível comportamental e neurológico (Nussbaum *et al.*, 2007).

Testes pré-sintomáticos e pré-natais estão disponíveis por meio da análise do número de repetições CAG no exão 1 do gene HD (Nussbaum *et al.*, 2007).

Uma estratégia para o tratamento de HD visa a proteção dos neurónios através da prevenção oxidativa e do stress glutaminérgico (Krobitsch & Kazantsev, 2011).

Tabela 3 Fármacos candidatos ao tratamento da HD (Borrell-Pagès *et al.*, 2007).

Fármaco candidato	Testado	Mecanismo de acção	Aprovado pela FDA
<i>Coenzima Q10</i>	Rato, fase clínica I	Antioxidante	Sim
<i>Cisteamina (Cystagon)</i>	Neurónios, rato, macaco, fase clínica I	Antioxidante Inibidor da TGase e caspase-3	Sim

<i>Cystamine</i>	Mosquito, rato	Antioxidante Inibidor da TGase e caspase-3	Não
<i>Geldanamicina</i>	Neurónios de rato	Ativa a resposta ao choque térmico	Não
<i>Lítio</i>	Rato, mosquito, fase clinica I	Indutor de autofagia	Sim
<i>Memantina</i>	Rato, fase clinica I	Agonista do recetor NMDA	Sim
<i>Minociclina</i>	Homem	Antiapoptótico	Sim
<i>Mithramicina</i>	Rato	Regulador da transcrição	Sim
<i>Paroxetina</i>	Rato	Inibidor da endocitose de serotonina	Sim
<i>Rapamicina</i>	Mosquito, rato	Indutor de autofagia	Sim
<i>Remacemida</i>	Rato, em fase clinica I	Agonista do recetor NMDA	Sim
<i>Resveratrol</i>	Nematodas	Antioxidante	Não
<i>Sodium/fenil butirato</i>	Rato	Regulador da transcrição	Não
<i>Ácido Suberoilanicilida hidroxâmico</i>	Mosquito, rato	Regulador da transcrição	Sim
<i>Tacrolimus (FK506)</i>	Neurónios	Inibidor da calcineurina	Sim

10.2. Atrofia *Dentatorubral-pallidoluysian* (DRPLA)

A DRPLA é uma doença autossómica dominante associada a ataxia espinocerebelar. É fenotipicamente semelhante à doença de Huntington, manifestando-se pelos sintomas precoces de demência, convulsão e degeneração cognitiva (Huntley & Golding, 2004). A expansão da repetição CAG, com localização no cromossoma 12, é responsável pelos sintomas da doença (Huntley & Golding, 2004; Everett & Wood, 2004). O comprimento da repetição do alelo normal é 7-34 repetições e do alelo mutante situa-se

entre as 58-88 repetições, estando o início da manifestação da doença relacionado com o comprimento da repetição (Everett & Wood, 2004).

10.3. Ataxia espinocerebelar (SCA1)

No cromossoma 6p, a expansão CAG no gene *ATXN1* leva à ataxia espinocerebelar. Alelos normais contêm 6 a 39 repetições, enquanto indivíduos afetados com SCA1 possuem aproximadamente 41 a 83 repetições (Arruda & Teive, 1997; McMurray, 2010).

Existe uma correlação inversa entre a idade de início da doença e o número de repetições, assim como entre a duração da doença e o número de tripletos (Arruda & Teive, 1997).

A transmissão paterna leva a um maior número de repetições comparativamente à transmissão materna (Arruda & Teive, 1997).

Uma proteína primitiva SCA1 (ataxina-1) codificada pelo gene mutante *ATXN1* é detectada em indivíduos normais e afetados encontrando-se a proteína no citoplasma e núcleo das células de Purkinje de indivíduos afetados e no núcleo de outros neurónios (Gehrking *et al.*, 2011). Nos tecidos não-neuronais esta proteína encontra-se apenas no citoplasma (Arruda & Teiv, 1997).

A ataxia espinocerebelar do tipo 1 (SCA1) pode ter início entre os seis anos de idade e os 74 anos aproximadamente, estando a maioria dos doentes acima dos 20 anos de idade (Arruda & Teive, 1997).

Os sintomas iniciais manifestam-se por desequilíbrio na marcha e disartria. Com a progressão da doença ocorre agravamento do desequilíbrio na marcha e lentidão dos movimentos (Arruda & Teive, 1997; Gehrking *et al.*, 2011). Dez anos após o início da doença, o paciente já não tem autonomia na marcha, mesmo com apoio (Arruda & Teive, 1997). Surge disfagia, oftalmoplegia, paralisia bulbar e lingual podendo ocorrer insuficiência respiratória, declínio das funções cognitivas assim como hipertonia e movimentos distónicos (Arruda & Teive, 1997; Gehrking *et al.*, 2011).

10.4. Ataxia espinocerebelar 2 (SCA2)

O locus SCA2 foi identificado no cromossoma 12 (12q23-24) de uma família cubana.

A doença é caracterizada pela perda progressiva de coordenação que resulta da degeneração das células de Purkinje do cerebelo (Satterfield *et al.*, 2002).

A ataxia espinocerebelar do tipo 2 é uma doença neurodegenerativa causada pela expansão da repetição CAG, localizada no primeiro exão do gene *ATXN2*, que codifica a poliglutamina ataxina-2 (Satterfield *et al.*, 2002; McMurray, 2010).

Os portadores de SCA2 apresentam aproximadamente entre 32 e 200 repetições enquanto indivíduos normais possuem menos de 31 repetições (McMurray, 2010).

A idade de manifestação da SCA2 varia dos 2 aos 65 anos apresentando diversos aspectos clínicos semelhantes à SCA1 (Arruda & Teive, 1997).

Verifica-se o fenómeno de antecipação genética, mais importante nos indivíduos que herdaram por transmissão paterna ($28 \pm 8,2$ anos) comparativamente à herança materna ($2,7 \pm 10,9$ anos) (Arruda & Teive, 1997).

Mais de 50% dos pacientes possuem hiporreflexia nos membros inferiores, uma característica incomum na SCA1 (Arruda & Teive, 1997). A demência é um sintoma frequente e parece correlacionar-se com uma idade de início mais precoce da doença. Os pacientes apresentam ainda acentuado tremor postural.

Esta doença apresenta marcada heterogeneidade fenotípica (Arruda & Teive, 1997; Satterfield *et al.*, 2002).

10.5. Ataxia espinocerebelar 3 (SCA3) – Doença de Machado-Joseph (MJD)

A ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3), ou doença de Machado-Joseph (MJD), é uma doença com herança autossômica dominante, causada pela expansão da repetição CAG no gene *ATXN3* (Boy *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2005).

Indivíduos não afetados apresentam um número de repetições CAG geralmente inferior a 40, enquanto indivíduos afetados possuem pelo menos 52 repetições CAG (McMurray, 2010; Arruda & Teive, 1997).

O *locus* do gene responsável por SCA3 foi identificado no cromossoma 14q32.1 e verifica-se que a transmissão paterna leva a um maior número de repetições CAG (cerca de 3) comparativamente à transmissão materna (cerca de 1) (Arruda & Teive, 1997; Boy *et al.*, 2010).

A poliglutamina resultante da expansão CAG na SCA3/DMJ é denominada de ataxina-3 (Arruda & Teive, 1997). A proteína portadora da extensão poliglutamina tem forte tendência para agregação, sendo que esta se observa normalmente no núcleo das células neuronais. Esta agregação surge em todo o cérebro, ocorrendo a formação de corpos de inclusão intranucleares (Boy *et al.*, 2010).

Os sintomas iniciam-se frequentemente por disartria e ataxia de marcha. Nos primeiros 10 anos manifestam-se sinais piramidais, nistagmo, oftalmoplegia, amiotrofia e hipo/arreflexia (Arruda & Teive, 1997). Alguns pacientes desenvolvem rigidez, bradicinesia e distonia que responde à L-dopa, enquanto outros podem desenvolver neuropatia periférica (Arruda & Teive, 1997).

A doença de Machado-Joseph é a mais comum das ataxias espinocerebelares, apresentando grande variabilidade fenotípica. Encontram-se já descritos cinco subtipos da doença (Teive *et al.*, 2001; Arruda & Teive, 1997).

10.6. Ataxia espinocerebelar 6 (SCA6)

Do ponto de vista genético a SCA6 pertence à classe de doenças neurodegenerativas em que a mutação responsável codifica uma proteína patológica do tipo poliglutamina, que codifica a subunidade 1A dos canais de cálcio (Restituito *et al.*, 2000; Frontali, 2001). Estes canais são estruturas multiméricas que desempenham um papel proeminente na libertação de neurotransmissores e controlo das sinapses (Frontali, 2001).

A ataxia espinocerebelar tipo 6 (SCA6) é uma doença com herança dominante caracterizada por ataxia progressiva, disartria, descoordenação e atrofia cerebelar progressiva (Restituito *et al.*, 2000; Arruda & Teive, 1997). Ocorre perda neuronal

quase que exclusivamente nas células de Purkinje (Restituito *et al.*, 2000; Kawai, *et al.*, 2008).

A mutação subjacente a patologia consiste na expansão do trinucleótido CAG no exão 47 do gene *CACNA1A* e localiza-se no cromossoma 19p13 (Restituito *et al.*, 2000; Frontali, 2001).

A análise de pacientes com SCA6 demonstra que indivíduos homozigóticos para a mutação manifestam um início mais precoce da doença do que heterozigóticos (Frontali, 2001).

10.7. Ataxia espinocerebelar 7 (SCA7)

A ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7) é uma doença autossómica dominante causada pela expansão da repetição CAG na região codificadora do gene *ATXN7* (no terceiro exão) que origina a proteína ataxina-7 de função desconhecida. Esta proteína é encontrada no citoplasma e núcleo dos neurónios (Furrer *et al.*, 2011; Garden *et al.*, 2002; Zander *et al.*, 2001). Os doentes apresentam entre 36 e 60 repetições enquanto indivíduos normais possuem entre 4-17 repetições CAG (McMurray, 2010; Holmberg *et al.*, 1998).

A idade de início da doença é extremamente variável (6 meses - 60 anos), com progressão mais rápida nos casos de início mais precoce e é caracterizada por perda neuronal, principalmente no cerebelo e tronco cerebral (Arruda & Teive, 1997; Holmberg *et al.*, 1998).

Os sintomas iniciam-se por ataxia (2/3 dos casos) e/ou perda visual (Zander *et al.*, 2001). O grau de retinopatia é variável, e geralmente inicia-se na área macular (Arruda & Teive, 1997; Garden *et al.*, 2002; Zander *et al.*, 2001).

É visível o fenómeno de antecipação e sintomas mais graves em descendentes de pais afetados (transmissão paterna) (Arruda & Teive, 1997; Furrer *et al.*, 2011).

10.8. Ataxia espinocerebal 17 (SCA17)

A ataxia espinocerebelar do tipo 17 é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela atrofia cerebelar, distúrbios psiquiátricos tais como alterações comportamentais e alterações de humor ou sinais neurológicos tais como ataxia e distúrbios de movimento, distonia e coréia também estão presentes (Marco *et al.*, 2012; Reetz *et al.*, 2012). A demência é um achado precoce e cerca de 35% dos pacientes é afetado pela epilepsia. (Marco *et al.*, 2012).

A SCA17 é causada pela repetição do trinucleotídeo CAG com origem da expansão da TATA-binding protein (TBP) localizado no terceiro exão do gene *TBP* (Reetz *et al.*, 2012; McMurray, 2010; Oda *et al.*, 2004).

Os portadores da SCA17 manifestam entre as 45 e 66 repetições (aproximadamente) CAG enquanto portadores normais apresentam entre 25 e 42 repetições CAG (McMurray, 2010).

11. Classe 2: doenças de repetições de tripletos não traduzidas

Tabela 4 - Localização das repetições de tripletos não traduzidas em diversas doenças.

DOENÇA	SEQUÊNCIA	LOCALIZAÇÃO	ORIGEM DA EXPANSÃO PARENTAL
DM1	CTG	<i>DMPK</i> (3' UTR)	M
DM2	CCTG	<i>CNBP</i> (intrão 1)	<i>Incerto</i>
FRAX-E	GCC	<i>AFF2</i> (5' UTR)	M
FRDA	GAA	<i>FXN</i> (intrão 1)	Recessivo
FXS	CGG	<i>FMRI</i> (5' UTR)	M
HDL2	CTG	<i>JPH3</i> (exão 2A)	M
SCA8	CTG	<i>ATXN8OS</i> (3' UTR)	M
SCA10	ATTCT	<i>ATXN10</i> (intrão 9)	M e P (mudanças mais pequenas na M)
SCA12	CAG	<i>PPP2R2B</i> (5' UTR)	M e P (mais instável com P)

Tabela 5 - Número de repetições presentes em diversas doenças de repetição de tripletos não traduzida.

DOENÇA	NÚMERO NORMAL DE REPETIÇÕES	NÚMERO DE REPETIÇÕES (PRÉ-MUTAÇÃO)	NÚMERO DE REPETIÇÕES (DOENÇA)	INSTABILIDADE SOMÁTICA
DM1	5–37	37–50	<50	SIM
DM2	<30	31–74	75–11 000	SIM
FRAX-E	4–39	40–200	>200	DESCONHECIDO
FRDA	5–30	31–100	70–1000	SIM
FXS	6–50	55–200	200–4000	SIM
HDL2	6–27	29–35	36–57	DESCONHECIDO
SCA8	15–34	34–89	89–250	DESCONHECIDO
SCA10	10–29	29–400	400–4500	SIM
SCA12	7–28	28–66	66–78	NADA ENCONTRADO

11.1. Síndrome de X frágil

11.1.1. Patogenia

A síndrome de X frágil (SFX) é a forma hereditária mais comum de atraso mental moderado, sendo apenas superada pela síndrome de Down entre todas as causas de atraso mental no sexo masculino (Veiga *et al.*, 2002). Foi a primeira doença causada pela expansão da repetição de tripletos a ser identificada (Nolin *et al.*, 1999). A designação de “X-frágil” deriva da aparência citogenética de um ponto frágil localizado no cromossoma X, mais especificamente no gene FMR1 localizado em Xq27.3, no qual a cromatina não se consegue condensar adequadamente durante a mitose (Nussbaum *et al.*, 2007) (Figura 7).

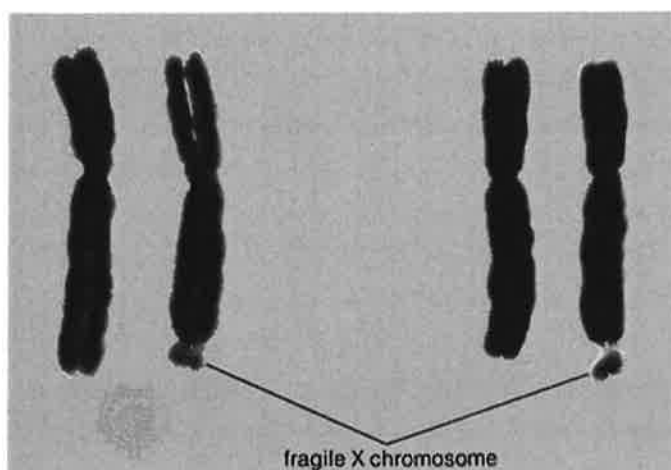


Figura 7 – Aparência citogenética do cromossoma X na SFX.

Esta patologia é mais frequente no sexo masculino do que no feminino, com uma frequência respectivamente de 1/1.250 e de 1/1650 a 5.000 (Regateiro, 2007).

A síndrome é herdada como um distúrbio ligado ao X tendo nas mulheres penetrância de 50% a 60%. Corresponde a cerca de 3% a 6% dos casos de atraso mental entre meninos com história familiar positiva de atraso mental (Nussbaum *et al.*, 2007).

A síndrome de X frágil resulta de uma mutação no gene FMR1, localizado no cromossoma X (Xq27.3). Este gene é constituído por 17 exões. A sua transcrição dá origem a diversos RNAm por splicing alternativo e consequentemente várias isoformas proteicas (Regateiro, 2007).

O produto do gene FMR1, a proteína FMRP, é expresso em muitos tipos celulares, contudo é mais abundante nos neurónios. Mais de 99% das mutações no gene FMR1 são expansões de uma sequência repetitiva (CGG)_n na região 5' não traduzida do gene (Primerano *et al.*, 2002).

Em alelos normais do gene FMR1, o número de repetições CGG é polimórfico e varia entre 6 e 50 repetições aproximadamente (McMurray, 2010). Pessoas fenotipicamente normais, que apresentam entre 55 e 200 repetições são chamadas de portadores da pré-mutação (Boy *et al.*, 2001; McMurray, 2010). Indivíduos afetados por esta síndrome

apresentam acima de 200 repetições desta sequência, sendo denominados de portadores da mutação completa (Weisman-Shomer *et al.*, 2003; McMurray, 2010). Nestes indivíduos esta expansão é acompanhada por metilação excessiva de citosinas no promotor deste gene, uma modificação epigenética do DNA que silencia a transcrição génica (Kaimen-Maciel, 1998). A mutação, sendo completa, leva à ausência do produto proteico, a FMRP (Martins, 2005).

Mutações completas surgem através de transmissão materna de um alelo de FMR1 contendo a pré-mutação, mas não por transmissão paterna (McMurray, 2010). A existência de pré-mutação torna a condição muito instável, sobretudo nas mulheres (Regateiro, 2007). Geralmente, o número de tripletos CGG aumenta em gerações sucessivas (Primerano *et al.*, 2002). O risco de haver uma expansão conducente a mutação durante as meioses de uma mulher com pré-mutação, depende do número de unidades repetitivas existentes (Regateiro, 2007; McMurray, 2010). A existência de 61 a 70 unidades repetitivas, leva a um risco para mutação de 16% e nos casos em que a pré-mutação materna apresenta 71 a 80 tripletos CGG repetidos o risco é de cerca de 70%. Casos em que a pré-mutação tem mais de 80 sequências CGG, levam a um risco de mutação de praticamente 100% (Regateiro, 2007).

De facto, a pré-mutação pode passar por várias gerações até que se transforme numa mutação completa e apareça uma criança afetada (Nussbaum *et al.*, 2007). Embora as pré-mutações sejam comuns, a progressão para mutação completa tem sido observada somente num número limitado de haplótipos, o que significa que há predisposição do haplótipo para a expansão (Nussbaum *et al.*, 2007; McMurray, 2010).

Um estudo demonstrou que a proteína FMRP desempenha um papel importante na espermatogénese, verificando-se que homens com SFX apresentam malformações e redução do número de espermatozoides, diretamente relacionado com redução de fertilidade (Hersh *et al.*, 2011).

A proteína FMRP tem ainda especial importância na conexão sináptica, e a perda da função normal desta proteína é a causa do atraso mental. Esta proteína liga-se a determinados RNAs, suprimindo deste modo a síntese das proteínas por eles codificadas. Estes RNAs-alvo parecem codificar proteínas envolvidas na estrutura do citoesqueleto, transmissão sináptica e maturação neuronal (Nussbaum *et al.*, 2007).

Além disso, a FMRP parece regular a síntese de proteínas necessárias para a formação das sinapses, visto que os cérebros de indivíduos portadores da síndrome do X frágil apresentam densidade aumentada de espinhas dendríticas imaturas anormalmente longas (Veiga & Toralles, 2002).

7.1.2. Fenótipo

Os doentes com síndrome de X frágil têm uma expectativa de vida normal e a sua aparência pode ser semelhante à de outras pessoas (Martins, 2005). A SXF causa atraso mental moderado nos homens afetados e leve nas mulheres afetadas (Hersh *et al.*, 2011).

Os recém-nascidos não manifestam qualquer indício, na aparência física, que seja indicativa da síndrome de X frágil. Apresentam macrocefalia (perímetro da cabeça maior que o normal) e hipotonia (baixo tônus muscular) (Martins, 2005).

Em adultos com síndrome de X frágil é perceptível uma face alongada e estreita com prognatismo, orelhas grandes, macroorquidia (aumento do tamanho dos testículos), hiperatividade, hábito de abanar ou morder as mãos, explosões de temperamento, pouco contacto visual e traços de autismo (Boy *et al.*, 2001; Hersh *et al.*, 2011) (Figura 8).



Figura 8 – Fenótipo dos portadores da SXF em adulto e criança.

Algumas destas características parecem estar relacionadas com alterações do tecido conjuntivo, além da frouxidão dos ligamentos (principalmente das articulações metacarpo-falangianas), prolapso da válvula mitral, miopia, estrabismo, *pectus excavatum*, pé plano e palato alto (Veiga & Toralles, 2002).

A maioria das mulheres com esta síndrome (2/3) apresenta-se clinicamente normais ou quase normais, verificando-se apenas alterações de comportamento a nível da aprendizagem ou de conduta (Martins, 2005). Cerca de 34% das mulheres heterozigóticas apresenta nível de inteligência subnormal (Veiga & Toralles, 2002). Estudos apontam que 1 entre 259 mulheres de todas as raças é portadora de cromossoma X frágil e, embora assintomáticas podem passar esse gene aos filhos homens, que têm alta probabilidade de manifestar a doença (Martins, 2005). Em mulheres, a gravidade do fenótipo depende do mosaicismo, do tamanho da repetição e da metilação da repetição (Nussbaum *et al.*, 2007).

Por outro lado, há sempre comprometimento cognitivo nos pacientes do sexo masculino portadores da síndrome. As alterações cognitivas podem apresentar-se sob formas muito variadas, desde dificuldades específicas que levam a baixo rendimento escolar (3,6% dos casos), até a deficiência mental profunda. A grande maioria dos pacientes manifesta atraso mental moderado (em torno de 50% dos casos) (Veiga & Toralles, 2002).

Muitas crianças portadoras de síndrome do X Frágil apresentam alterações na fala e linguagem. A grande parte não consegue elaborar frases curtas antes dos 2 anos e meio de idade. As alterações comuns da fala incluem a ecolalia (repetição de fonemas), fala rápida, ritmo desordenado, dispraxia oral, volume alto, habilidade sintática preservada, dificuldade na relação semântica (temporal, sequencial conceitual, inferências), boa capacidade de imitar sons, bom senso de humor e uso frequente de frases automáticas (Martins, 2005).

Existe uma correlação entre o déficit cognitivo e a expansão dos trinucleótidos. Em portadores de grandes expansões de trinucleótidos CGG, o QI é mais baixo (Hersh *et al.*, 2011). Quanto maior o número de tripletos, mais graves são as manifestações e mais precocemente se expressam (Regateiro, 2007).

Com o avançar da idade verifica-se declínio da função intelectual, sendo mais acentuado nos indivíduos com QI mais alto, particularmente observado durante a puberdade (Veiga & Toralles, 2002).

A expansão do número de tripletos pode ocorrer durante a meiose das mulheres portadoras de uma pré-mutação, mas a extensão da expansão não é constante entre os descendentes atingidos. Assim sendo, as pessoas que herdaram a mutação podem apresentar sintomatologia variável consoante o número de tripletos (Regateiro, 2007).

Pessoas portadoras da síndrome de X frágil são férteis, no entanto, homens e mulheres com atraso mental significativo, raramente se reproduzem em decorrência das suas limitações sociais e cognitivas (Martins, 2005). A menopausa precoce ocorre em cerca de 24% das mulheres portadoras de pré-mutação, devendo ser prevenidas para essa possibilidade, tanto para acompanhamento médico como para planeamento familiar (Martins, 2005).

A grande maioria dos homens e cerca de 40% a 50% das mulheres que herdaram a mutação completa apresentarão a síndrome do X frágil (Nussbaum *et al.*, 2007).

Uma vez que esta síndrome está ligada ao cromossoma X, o tipo de hereditariedade não tem características mendelianas. Na descendência de um homem portador de pré-mutação, os homens são normais e as mulheres são todas portadoras da pré-mutação, podendo transmitir aos seus descendentes do sexo masculino (Regateiro, 2007). Este padrão de herança é chamado de paradoxo de Sherman, e é um exemplo especial de herança genética (Veiga & Toralles, 2002).

Uma vez que as mutações completas são mitoticamente instáveis, alguns pacientes têm uma mistura de células com tamanho de repetição variando de pré-mutação a mutação completa (mosaicismo do tamanho da repetição). Todos os homens com mosaicismo do tamanho da repetição são afetados, mas exibem uma função mental maior do que aqueles que têm mutação completa em todas as células. As mulheres com mosaicismo do tamanho da repetição vão de normais a totalmente afetadas (Nussbaum *et al.*, 2007).

De forma idêntica, alguns pacientes apresentam uma mistura de células com e sem metilação da repetição CGG (mosaicismo da metilação da repetição) (Nussbaum *et al.*, 2007). Todos os homens com mosaicismo da metilação são afetados, mas na maioria das vezes têm função mental maior que aqueles que exibem hipermetilação em todas as

células (Nussbaum *et al.*, 2007). Por sua vez, as mulheres com mosaïcismo de metilação variam de normais a totalmente afetadas (Nussbaum *et al.*, 2007).

É raro o aparecimento de pacientes com mutação completa não metilada em todas as células (Nussbaum *et al.*, 2007).

7.1.3. Diagnóstico e Tratamento

Na maioria das vezes, as pessoas portadoras da síndrome de X frágil não são identificadas pelas suas características clínicas (Martins, 2005). Devido à elevada frequência da SXF e pelo seu carácter hereditário, é de grande importância que o diagnóstico seja realizado principalmente em grupos de alto risco (Veiga & Toralles, 2002).

O estudo citogenético continua a ser o primeiro método de diagnóstico da síndrome de X frágil. Em células cultivadas com um meio de cultura pobre em ácido fólico ou timidina, visualiza-se um “local frágil” no cromossoma X (Regateiro, 2007). Pode ainda ser realizado diagnóstico molecular através do uso de técnicas de PCR e *Southern blotting* para avaliar a presença e o tamanho da repetição CGG (Oliveira *et al.*, 2004).

Atualmente, ainda não há cura para a SXF. A terapia genética estuda a possibilidade de inserção de um gene FMR1 normal no cromossoma X, em substituição do gene alterado. Estudos recentes procuram a possibilidade de reativar o gene *FMR1* mutado (Martins, 2005).

O tratamento para SXF considerado mais eficaz é aquele que, considerando uma abordagem multidisciplinar, pode combinar atendimentos terapêuticos, educação especial e uso de medicamentos de acordo com as necessidades específicas de cada indivíduo (Anexo 2) (Martins, 2005).

11.2. Síndrome do Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS)

11.2.1. Patogenia

Na população, 1 em 800 homens e 1 em cada 260 mulheres são portadores da síndrome do tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS), e é estimado que 1 em 3000 homens apresentam risco de desenvolver FXTAS (Greco *et al.*, 2006; Bacalman *et al.*, 2006).

As repetições em *tandem* do trinucleótido CGG são facilmente encontradas no genoma humano e ocorrem em diversos genes e transcritos originando diversos fenótipos (Kiliszek *et al.*, 2011). O intervalo entre as 55-200 repetições CGG pode levar ao desenvolvimento do tremor/ataxia do X frágil (FXTAS), sendo que a mutação completa (200 repetições CGG) leva a SFX (Kiliszek *et al.*, 2011; Bacalman *et al.*, 2006; McMurray, 2010). Está demonstrado que a FXTAS resulta de um aumento nos pacientes de duas a cinco vezes nos níveis de RNAm codificado pelo gene *FMRI*. De facto, um estudo efetuado por Iwahashi e colaboradores (2006) demonstrou que portadores da FXTAS apresentam níveis de RNAm do gene *FMRI* aumentados em cerca de 8 vezes, apesar da proteína FMRP permanecer em níveis normais. Isto representa uma mutação de ganho de função sendo que este RNA patogénico leva a formação de inclusões intranucleares neuronais que é a característica celular significativa da doença (Nussbaum *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2006). O que acontece é a formação de uma estrutura secundária nas regiões das repetições CGG nos transcritos do gene *FMRI*. Esta estrutura pode apresentar-se na forma de gancho (*hairpin*), cuja haste é formada por uma alternância de C-G, G-C e pelos pares de base G-G (Kiliszek *et al.*, 2011). As repetições CGG são as repetições termodinamicamente mais estáveis de todas as repetições CNG, o que significa que os pares de base G-G são os mais fortes de todas as interações entre bases azotadas (Kiliszek *et al.*, 2011). Estas estruturas estáveis que se formam nas sequências de tripletos CGG sequestram proteínas de ligação ao RNA que são normalmente necessárias para o *splicing* e outros processos celulares, resultando em inclusões intranucleares em neurónios e astrócitos (Kiliszek *et al.*, 2011; Greco *et al.*, 2006). Isto desencadeia uma dinâmica de formação de agregados e desregulação do *splicing* alternativo (Kiliszek *et al.*, 2011). Mais ainda, estas estruturas estáveis inibem a tradução do RNAm codificado pelo gene *FMRI* na etapa de iniciação, resultando numa deficiência da proteína FMRP. Esta é uma proteína de ligação ao RNA envolvida no transporte do RNAm entre o núcleo da célula e o citoplasma, assim como na regulação da sinapse (Kiliszek *et al.*, 2011). O estudo neuropatológico de quatro homens que morreram com FXTAS demonstrou a presença de inclusões intranucleares eosinofílicas

em 5-40% dos neurónios e em 30-50% de astroglia no córtex e cerebelo, com exceção das células de Purkinje, onde não foram observadas inclusões (Hagerman *et al.*, 2004).

No entanto, isto não foi observado entre adultos mais velhos com alelos de mutação completa (> 200 repetições de CGG) (Iwahashi *et al.*, 2006; McMurray, 2010). Nestes casos o gene *FMRI* encontrava-se silenciado (ou seja, ausência de RNAm do gene *FMRI* e *FMRP*) (Iwahashi *et al.*, 2006).

11.2.2. Fenótipo

Tabela 6 – Descrição clínica das etapas da FXTAS (Bacalman *et al.*, 2006).

Etapa da FXTAS	Descrição Clínica
1	Sinais de doença muito subtis
2	Sintomas pouco evidentes com tremor e problemas de equilíbrio. Pouca interferência nas atividades diárias.
3	Tremor e problemas de equilíbrio moderados, em último caso com interferências significativas nas atividades diárias.
4	Tremor e problemas de equilíbrio severos.
5	Uso de cadeira de rodas no auxílio da mobilidade.
6	Indivíduo acamado.

Esta síndrome é clinicamente distinta da síndrome de X frágil propriamente dita. A redução da proteína *FMRP* não é considerada responsável pela doença uma vez que homens com mutações completas e perda quase total da expressão do gene *FMRI* nunca desenvolvem FXTAS (Nussbaum *et al.*, 2007).

Aproximadamente 20-25% dos indivíduos portadores da FXTAS manifestam problemas psiquiátricos como ansiedade ou fobia social e falha prematura no ovário. O início da doença acontece por volta dos 50-70 anos de idade e inclui uma progressiva ataxia e tremor. Outros sintomas são a perda de memória com declínio gradual cognitivo levando alguns indivíduos a demência (Hagerman *et al.*, 2004; Bacalman *et al.*, 2006)

11.3. Ataxia espinocerebelar 8 (SCA8)

A ataxia espinocerebelar do tipo 8 (SCA8) é uma doença autossômica dominante localizada no cromossoma 13q21, resultante da expansão da repetição CTG localizada no gene *ATXN8OS* codificador da proteína ataxina-8 (Ushe & Perlmutter, 2012; McMurray, 2010).

O portador da doença apresenta entre 89 e 250 repetições CTG, enquanto o número de repetições normal se situa entre as 15 e as 34 repetições CTG (McMurray, 2010).

A SCA8 tem início entre 1-2 anos de idade, manifestando-se por ataxia, dificuldade de marcha, atetose, hipotonia e arreflexia profunda. Surge ainda oftalmoplegia e perda auditiva, e mais tardiamente na adolescência, neuropatia sensitiva (Arruda & Teive, 1997; Ushe & Perlmutter, 2012).

11.4. Ataxia de Friedreich

11.4.1. Patogenia

A ataxia de Friedreich (AF), a ataxia espinocerebelar hereditária mais comum, com prevalência de 2 a 4/100.000 entre os europeus e pessoas do Médio Oriente e Índia, é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por miocardiopatia e diabetes tipo 2 (Nussbaum *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2002).

O gene responsável pela AF parece ter surgido na região de Perche, França, em 1634, e foi identificado por Nicholas Friedreich em 1863 (Albano & Kim, 2001).

A ataxia de Friedreich está associada à expansão da repetição de tripletos GAA no primeiro intrão do gene *FRDA*, resultando na redução e perda das funções normais da proteína codificada por este gene, a frataxina (Ohshima *et al.*, 1998; Dürr *et al.*, 1996).

A repetição de tripletos GAA é polimórfica, sendo que o cromossoma normal contém cerca de 5-60 repetições e o cromossoma mutante entre 100-1700 repetições (Sharma *et al.*, 2002). A expansão no interior do intrão interfere com a expressão normal do gene codificador da frataxina (*FRDA*), e sendo a ataxia de Friedreich recessiva, a perda da

expressão de ambos os alelos é necessária para que haja manifestação da doença (Pollard *et al.*, 2004; Puccio & Koenig, 2000).

Segundo Puccio & Koenig (2001), 96% dos pacientes são homocigóticos para expansões repetidas de trinucleótidos GAA, enquanto os restantes 4% dos casos são heterocigóticos compostos por uma expansão GAA e um ponto de mutação no interior da região codificante do gene.

A maioria da literatura refere-se à AF como uma patologia que afeta gravemente a medula espinal e provoca efeitos leves no tronco e cerebelo envolvendo os hemisférios cerebrais, afetando assim, o córtex cerebral e os gânglios da base precocemente (Albano & Kim, 2001; Puccio & Koenig, 2000). Nos gânglios da base localizam-se os corpos sensoriais que são primordiais na expressão do sistema nervoso, verificando-se neuropatia sensorial e degeneração das colunas posteriores, uma consequência direta dos níveis reduzidos de frataxina nestas estruturas (Puccio & Koenig, 2000; Albano & Kim, 2001).

O gene *FRDA* também é expresso em tecidos não neuronais, tais como coração e pâncreas, podendo conduzir a miocardiopatia e aumento da incidência dos diabetes. Além disso, o gene *FRDA* é expresso em tecidos aparentemente não afetados pela doença tais como fígado, músculo, timo e tecido adiposo castanho (Puccio & Koenig, 2001; Schapira, 1999). Os tecidos que expressam níveis elevados da frataxina são ricos em mitocôndrias, sendo que tanto os neurónios como os miócitos cardíacos por apresentarem um metabolismo exclusivo, são mais sensíveis a mitocôndrias defeituosas (Puccio & Koenig, 2000; Schapira, 1999).

Embora as funções da frataxina não estejam claramente determinadas, foi proposto por Nussbaum *et al.* (2007) que o seu papel incluía ação como uma proteína ligante do ferro, um fator essencial na formação do grupo heme e na síntese e integridade do agrupamento Fe-S (combinação de ferro e enxofre encontrada em algumas proteínas, principalmente em oxidoredutases) (Nussbaum *et al.*, 2007; Puccio & Koenig, 2001). Assim sendo, a perda de atividade da frataxina está associada a níveis aumentados de ferro mitocondrial, defeito na síntese do grupo heme, e atividade reduzida das proteínas

contendo Fe-S como os complexos I a III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Puccio & Koenig, 2000; Nussbaum *et al.*, 2007).

11.4.2. Fenótipo

A presença de miocardiopatia hipertrófica, de cifoescoliose e de pés cavos é bastante característica, podendo associar-se a diabetes tipo 2 em cerca de 20% dos casos (Albano *et al.*, 2001).

O fenótipo é parcialmente determinado pelo tamanho das expansões, verificando-se a existência de uma relação inversa entre o tamanho da expansão e as variáveis: idade de início, progressão da doença, miocardiopatias, incapacidade motora e disartria. Assim sendo, os alelos menores encontram-se associados com idades de início mais tardio e ausência de miocardiopatia (Albano & Kim, 2001).

A Ataxia de Friedreich é uma doença progressiva e fatal, caracterizada clinicamente por um início antes dos 25 anos de idade, manifestando-se por ataxia cerebelar, hiporreflexia ou arreflexia, disartria com voz escandida, podendo ocorrer também surdez neurossensorial, nistagmo horizontal e amiotrofia distal dos membros inferiores (Sharma *et al.*, 2002; Albano *et al.*, 2001).

Segundo Albano & Kim (2001) a dificuldade de marcha é progressiva e, ao fim de 10-15 anos de evolução da doença, o paciente fica limitado a uma cadeira de rodas. Normalmente, a força e o trefismo muscular são normais, alterando-se de forma mais evidente no final da doença, quando os pacientes já se encontram em cadeira de rodas.

Trata-se de uma doença com herança autossômica recessiva. A Figura 9 mostra claramente este tipo de hereditariedade, sendo que os alelos expandidos dos progenitores manifestam de forma indireta uma instabilidade dessas expansões, uma vez que o pai apresenta 350 repetições e a mãe 400 (Albano & Kim, 2001; Puccio & Koenig, 2001). Deveriam apresentar o mesmo número de repetições, caso os alelos fossem adquiridos de um ancestral comum e não existissem mutações dinâmicas (Albano & Kim, 2001; Puccio & Koenig, 2001). Além disso, as expansões transmitidas aos filhos apresentam os dois alelos expandidos, mas com um número de repetições menores que

os seus ancestrais. Ao contrário do que acontece noutras doenças de repetição de tripletos, na AF existe uma tendência para a contração, de geração para geração, talvez por um processo de seleção natural ou pela grande atividade mitótica que se verifica na espermatogénese (Figura 9) (Albano & Kim, 2001; Sharma *et al.*, 2002).

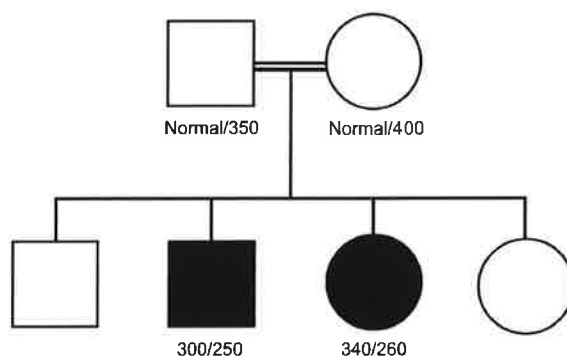


Figura 9 – Heredograma representativo de uma família com dois irmãos afetados e respectivos tamanho dos alelos.

Na AF, a instabilidade dos alelos ocorre em dois estágios: o primeiro na meiose e o segundo na mitose, não sendo relevante o sexo do progenitor. Pensa-se que o DNA contendo as repetições de trinucleótidos GAA assumam uma estrutura secundária em forma de hélice tripla, a partir de arranjos tanto intramoleculares como intermoleculares (Albano & Kim, 2001; Puccio & Koenig, 2001).

11.4.3. Diagnóstico e Tratamento

No diagnóstico da ataxia de Friedreich, devem ser consideradas todas as causas possíveis de ataxia por existirem outras patologias com quadros clínicos semelhantes à AF, destacando-se a deficiência isolada de vitamina E e a ataxia-telangiectasia, sendo o estudo molecular imprescindível para a deteção da AF (Albano & Kim, 2001; Puccio & Koenig, 2001).

Com base nas recentes descobertas das possíveis funções da fraxina, e mais especificamente sobre as consequências da redução desta proteína, tem havido diversos avanços terapêuticos (Puccio & Koenig, 2001). Uma das estratégias terapêuticas baseia-

se nos níveis aumentados de ferro mitocondrial encontrados na AF, usando-se como reagente terapêutico para o tratamento quelantes de ferro, como a desferroxamina, (Puccio & Koenig, 2000; Puccio & Koenig, 2001).

Uma segunda estratégia baseia-se no pressuposto de que a redução de radicais livres irá atrasar a progressão da doença. Deste modo, antioxidantes que são geralmente desprovidos de efeitos colaterais, podem ser considerados como potenciais reagentes terapêuticos (Puccio & Koenig, 2001). Um destes antioxidantes é a idebenona que é um análogo de cadeia curta da coenzima Q10. Este agente protege as membranas mitocondriais e as enzimas da cadeia respiratória contra lesões provocadas pelo ferro sem causar redução da atividade da aconitase (Puccio & Koenig, 2001; Puccio & Koenig, 2000). Além disso, a idebenona, sendo um análogo de cadeia curta pode transpor membranas prontamente (incluindo o sangue e barreira hematoencefálica) (Puccio & Koenig, 2000; Puccio & Koenig, 2001).

11.5. Distrofia Miotónica

11.5.1. Patogenia

Batten, Gibb e Steinert em 1909 identificaram a distrofia miotónica (DM) como uma desordem multissistémica que atualmente é conhecida como uma das mais comuns atrofia muscular em adultos (Ranum & Day, 2004).

A DM é uma doença autossómica dominante afetando 1/8.000 indivíduos. Dois *loci* têm sido associados ao fenótipo da DM: o cromossoma 19 que é responsável pela distrofia miotónica tipo 1 (DM1), e o cromossoma 3 que determina distrofia miotónica tipo 2 (DM2) (Harley, 1993; Brook *et al.*, 1992).

Em 1992 foi identificada a mutação responsável pela DM1 como uma expansão CTG localizada na região 3'-UTR do gene *DMPK* (*Myotonic dystrophy protein kinase*) que codifica uma proteína cinase (Wigg & Duro, 1995; Tachi *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 1992).

O triplo CTG causador de DM1, uma doença neuromuscular, é polimórfico na população e varia entre as 3-37 repetições em indivíduos não afetados (Temmerman *et al.*, 2008). Indivíduos portadores de um alelo *DMPK* com pelo menos 50 repetições

apresentam sintomas de distrofia miotónica e pacientes severamente afetados apresentam expansões de vários milhares de repetições (Kaliman & Llagostera, 2008).

São vários os modelos propostos para a patogenicidade de DM1. O primeiro modelo baseia-se na haploinsuficiência de *DMPK*. Inicialmente, a localização da mutação no terminal 3' do gene codificador de uma cinase (*DMPK*) sugeriu que as alterações na expressão de *DMPK* levariam às características clínicas multisistémicas da doença (Fu *et al.*, 1992; Hoffmann-Radvanyi *et al.*, 1993; Novelli *et al.*, 1993). A maioria dos primeiros estudos de expressão era consistente com esta hipótese indicando que os níveis de RNAm e de proteína *DMPK* se encontravam reduzidos tanto nos músculos dos pacientes como também em culturas de células (Fu *et al.*, 1992; Hoffmann-Radvanyi *et al.*, 1993; Novelli *et al.*, 1993). No entanto, ratinhos *knockout* para *DMPK* não possuíam as características típicas da doença, mostrando apenas miopatia ligeira de desenvolvimento tardio (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que a haploinsuficiência da proteína *DMPK* contribui para os sintomas da doença mas não é o único mecanismo responsável pelas características clínicas de DM1 (Ranum & Day, 2004). O facto de não existirem casos de DM1 causados por mutações pontuais no gene *DMPK* sugere que os níveis reduzidos desta proteína não são a única causa para os sintomas (Ranum & Day, 2004).

O segundo modelo propõe que a expansão do triplete provoca alteração da conformação da cromatina que afeta os genes adjacentes: *Six5* (*homologue of Drosophila sine oculis homeobox 5*) e *DMWD* (*myotonic dystrophy containing WD repeat motif*) (Kaliman & Llagostera, 2008). Esta hipótese é apoiada pela observação de que a expansão CTG, caracterizada por ser um local de ligação forte do nucleossoma, poderia potencialmente alterar a estrutura da cromatina e consequentemente afetar a expressão de múltiplos genes (Groenen & Wieringa, 1998; Tapscott, 2000; Filippova *et al.*, 2001; Larkin & Fardaei, 2001).

Um terceiro modelo refere que poderá haver aquisição de função do RNA, conferindo-lhe novas propriedades (Kaliman & Llagostera, 2008).

Por último, foi desenvolvido um modelo aditivo em que cada um dos mecanismos descritos acima contribui para a patogenicidade da DM1 (Groenen & Wieringa, 1998;

Tapscott, 2000; Filippova *et al.*, 2001; Larkin & Fardaei, 2001). Neste modelo alguns aspectos da doença são causados pela haploinsuficiência de DMPK, SIX5 e outros genes vizinhos enquanto outras características clínicas resultam dos efeitos da expansão CUG no RNA (Tapscott, 2000; Filippova *et al.*, 2001; Larkin & Fardaei, 2001)

A distrofia miotônica tipo 2 (DM2) também tem herança autossômica dominante e compartilha a maioria dos aspectos clínicos com a DM1. A DM2 é causada pela expansão do tetranucleótido CCTG no primeiro intrão do gene codificador da proteína ZNF9 (*zinc finger protein 9*) (Nussbaum *et al.*, 2007).

11.5.2. Fenótipo

A DM1 e DM2 são doenças muito similares que levam a alterações nos sistemas ocular, cardíaco e endócrino (Nussbaum *et al.*, 2007). A expressão clínica da DM é extremamente variável, podendo apresentar uma progressiva distrofia muscular que afeta os músculos distais e proximais, com incapacidade de relaxamento dos músculos de forma adequada (miotonia), cataratas, arritmia cardíaca, atrofia testicular e resistência a insulina, existindo ainda uma forma congênita com desenvolvimento de atraso mental (Figura 10) (Tachi *et al.*, 1995; Kaliman & Llagostera, 2008).

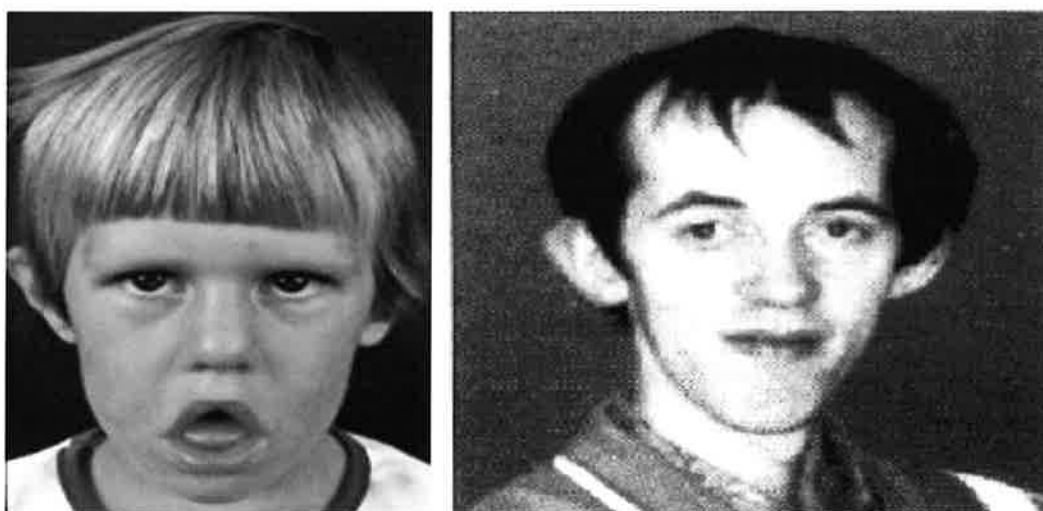


Figura 10 – Fenótipo da DM (www.mednet.cl).

Outras alterações sorológicas em ambos os distúrbios incluem redução dos níveis de imunoglobulina G e M (Nussbaum *et al.*, 2007).

Tabela 7 – Sintomas clínicos da DM1 e DM2.

Sintomas	DM1	DM2
Miotonia	+	+
Fraqueza facial	+	+
Fraqueza proximal	+	+
Fraqueza distal	+	+
Atrofia esternocleidomastóideo	+	+
Cataratas	+	+
Arritmias cardíacas	+	+
Insuficiência testicular	+	+
Hiperinsulinemia	+	+
Hipogamaglobulinemia	+	+
Creatina cinase elevada	+	+
Atraso/anomalias congénitas	+	-

11.5.3. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico consiste no teste pré-natal (o estudo genético do feto) podendo ser feita a interrupção da gravidez caso se confirme a presença da mutação (Nussbaum *et al.*, 2007).

Para evitar a possibilidade de concepção de um feto com a mutação pode, hoje em dia, ser utilizada a doação de gâmetas (neste caso as células não têm origem no elemento do casal com a mutação pelo que o filho não receberá dele nenhuma informação genética) (figura 11) (Nussbaum *et al.*, 2007)

Atualmente não existe um tratamento etiológico para a distrofia miotónica (Nussbaum *et al.*, 2007). O tratamento desta doença consiste em minimizar os seus sintomas fazendo periodicamente avaliações cardíacas (electrocardiograma e ecografias cardíacas

se necessário), avaliações endócrinas (glicemias e função tireóideia) e avaliações oftalmológicas (Nussbaum *et al.*, 2007).

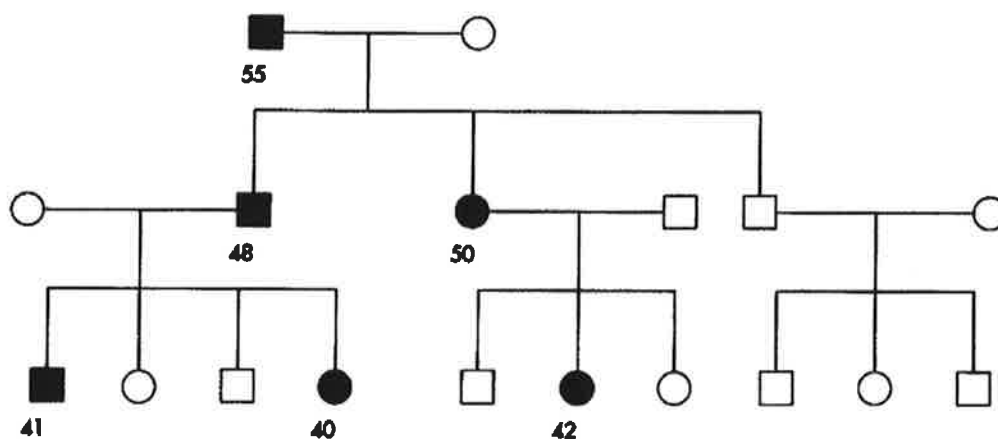


Figura 11 – Hereditograma de uma família com distrofia miotônica mostrando antecipação genética (idade em anos).

11.6. Ataxia espinocerebelar 12

A ataxia espinocerebelar do tipo 12 é uma doença autossômica dominante e é causada pela expansão da repetição CAG na região promotora do gene PPP2R2B que está localizado no cromossoma 5q31-5q32 (Sato *et al.*, 2010; Holmes *et al.*, 2001; Bahl *et al.*, 2005).

Pacientes portadores da SCA12 desenvolvem tremores, ataxia cerebelar, parkinsonismo, depressão e demência (Sato *et al.*, 2010; Brussino *et al.*, 2010). A ressonância magnética ao cérebro de pacientes com SCA12 mostra atrofia generalizada no córtex cerebral, menos a nível do cerebelo (Sato *et al.*, 2010).

Os pacientes portadores da SCA12 apresentam aproximadamente entre 66 e 78 repetições, enquanto portadores de repetições normais apresentam entre 7 e 28 repetições CAG (McMurray, 2010).

IV. DOENÇAS DE ANTECIPAÇÃO

A antecipação genética é caracterizada por existir uma redução na idade do aparecimento da doença e também por um agravamento dos sintomas nas pessoas afetadas em gerações sucessivas (Margaglione *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2013). Este processo tem sido associado à expansão das repetições de trinucleótidos (Polito *et al.*, 1996).

Exemplos bem documentados são a distrofia miotónica, a doença de Huntington e a síndrome de X frágil, demonstrando antecipação genética em algum grau, com início de doença mais precoce, aumentando a gravidade da doença ao longo das gerações, o que está diretamente relacionado com um aumento progressivo da sequência da repetição de trinucleótidos (Deighton *et al.*, 2007).

Uma potencial explicação para a ocorrência da antecipação genética resulta da divisão mitótica contínua das células germinativas que, portanto, estão sujeitas a expansão contínua (Deighton *et al.*, 2007).

1. Antecipação Genética em Doenças Não-Mendelianas

A redução da idade no aparecimento da doença não é apenas observada nas doenças de repetições de tripletos, mas também em doenças como cancro da mama, cancro do cólon, doença de Alzheimer, e *Diabetes mellitus*. Estes distúrbios diferem das doenças de repetição de tripletos pois pertencem à categoria de distúrbios não-mendelianos que ocorrem esporadicamente sem evidência da expansão da repetição de trinucleótidos (Margaglione *et al.*, 1996).

Um estudo realizado por Margaglione e colaboradores (1996) apresentou como principal objetivo verificar a antecipação genética de doenças como o cancro mama, cancro do cólon, doença de Alzheimer, e a *Diabetes mellitus*. Com base em estudos anteriores foram efetuadas duas amostragens, uma composta pelo levantamento estatístico da idade de início de aparecimento dos sintomas na geração parental (G1), e outro grupo composto pelo levantamento estatístico da idade na descendência (G2). Relativamente ao cancro da mama apenas foram considerados os casos de transmissão

mãe-filha, não tendo sido analisada a gravidade da doença em sucessivas gerações (Margaglione *et al.*, 1996).

Tabela 8 – Idade do início da doença (anos) (adaptado de Margaglione *et al.*, 1996).

Doença	Nº de pares de indivíduos	Idade do Início da Doença (Anos)		
		G1	G2	G1 – G2
Cancro da mama	159	50.5 ± 12.2	41.6 ± 11.7	8.9
Cancro do cólon	67	52.5 ± 13.5	45.2 ± 11.8	7.3
Doença de Alzheimer	129	55.4 ± 13.1	52.9 ± 12.1	2.5
<i>Diabetes mellitus</i>	51	21.6 ± 10.3	7.2 ± 4.4	14.4

A antecipação genética nas doenças não-mendelianas não pode ser rejeitada pelo facto de não existir expansão na repetição de tripletos, sendo surpreendente a diversidade de doenças não-mendelianas com registo de antecipação genética (Margaglione *et al.*, 1996). O mecanismo molecular que controla a idade de início da doença pode variar de doença para doença. No caso de cancro ou na diabetes, outros fatores genéticos podem interferir na idade do início da doença (Margaglione *et al.*, 1996).

Doenças geneticamente complexas, tais como o transtorno afetivo bipolar, a esquizofrenia, a doença de Crohn e psoríase demonstram antecipação genética. No caso particular da esquizofrenia o avanço da idade paterna é um dado importante a ter em conta (Deighton *et al.*, 2007).

Foi ainda demonstrada antecipação genética na psicose maior, cardiomiopatia hipertrófica, atrofia olivopontocerebelar, paraganglioma, e outras duas doenças auto-imunes: síndrome de Blau e artrite reumatóide (Margaglione *et al.*, 1996).

2. Antecipação genética na doença de Crohn

A doença de Crohn é uma forma inflamatória da doença intestinal com influência genética em alguns pacientes. Estudos demonstram que a idade de início da doença de Crohn é menor entre pacientes com história familiar de doença inflamatória intestinal do que entre aqueles sem história familiar desse tipo (Polito *et al.*, 1996).

Um estudo efetuado por Polito e colaboradores (1996) apresentou como objetivo a análise de 552 pacientes com doença de Crohn com o propósito de verificar antecipação genética entre pai e filho. No hospital *Johns Hopkins* durante um período de 6 anos (1985-1991) e mediante critérios radiológicos, histológicos e clínicos, a gravidade dos sintomas da doença foi classificada por um sistema de pontuação envolvendo endoscopia ou radiografia. Dos pacientes estudados, 542 eram brancos e 10 de raça negra, 300 (54%) eram mulheres e 95 (17%) apresentavam historial positivo de doença de Crohn. A análise dos pacientes revelou que no membro da geração mais tardia a doença foi diagnosticada mais cedo do que na geração anterior em 23 dos 27 pares de indivíduos (média de idade de diagnóstico 18,9 vs 31,4 anos; diferença média de 12,5 anos).

A análise realizada na base de dados apresentou resultados semelhantes, verificando-se que a idade de diagnóstico foi menor na geração mais tardia, em 31 dos 32 pares de indivíduos (média de idade de diagnóstico 16,9 vs 33,1 anos; diferença média de 16,2 anos) (Polito *et al.*, 1996).

O modelo familiar analisado no hospital *Johns Hopkins* demonstrou uma média de 10,8 anos de diferença na idade do diagnóstico entre pai e filho. Também foi demonstrado que a severidade da doença era maior na geração mais jovem comparativamente a geração mais velha, verificando-se que apenas 5 dos 27 pares registavam uma severidade menor comparativamente aos pais (Polito *et al.*, 1996). Mais ainda, a probabilidade de uma criança registrar uma mais alta severidade da doença é maior se o pai manifestar a doença (Polito *et al.*, 1996).

3. Antecipação genética na Artrite Reumatóide

Um estudo efetuado por Deighton e colaboradores (2007) utilizou dados do consórcio norte-americano da artrite reumatóide (NARAC) e da campanha de pesquisa da artrite

no Reino Unido (ARC) para verificar se a diferença de idade no início da doença entre gerações apoiava a antecipação genética. Também foi observada a idade dos pais no momento da concepção dos irmãos para verificar algum tipo de correlação inversa com a idade no início da doença na descendência (Deighton *et al.*, 2007).

Tabela 9 – Análise de dados do NARAC e ARC.

	Idade do Início da Doença em irmãos mais velhos	Idade do Início da Doença em irmãos mais novos	Diferença de idade
NARAC	39.3 (12.7)	36.9 (14.1)	2.05 (1.19, 2.90)
ARC	43.8 (13.8)	40.1 (13.2)	2.82 (1.78, 3.87)

A análise de 743 casos provenientes do NARAC e de 396 casos provenientes do ARC demonstraram que na maioria dos casos ambos os irmãos eram portadores da doença. Em ambos os conjuntos de dados, o irmão mais velho apresentou um início de doença mais tardio do que o irmão mais novo (independentemente do género) (Deighton *et al.*, 2007).

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado não demonstrando correlação significativa entre a idade de início da artrite reumatóide e a idade materna/paterna no momento da concepção, embora trabalhos anteriores demonstrem a existência de correlação inversa (Deighton *et al.*, 2007).

V. CONCLUSÃO

Aproximadamente 3 bilhões de pares de bases de DNA constituem o genoma humano, havendo portanto vários motivos para a ocorrência de DNA repetitivo (Lutz, 2007). Este DNA repetitivo inclui microssatélites, sequências de DNA repetitivo nos telómeros, centrómeros e regiões de DNA heterogénea dos cromossomas (Lutz, 2007).

É frequente o aparecimento de DNA repetitivo que consiste em repetição de tripletos e que pode ocorrer em diversos genes e codificar vários aminoácidos (Lutz, 2007). Estes aminoácidos como a glutamina podem surgir em enzimas, recetores de hormonas ou em sequências não codificantes que regulam atividades celulares como metilação e imprinting, degradação de proteínas através de ubiquitinação, e processamento através do proteossoma, bem como a activação e inativação de genes (Lutz, 2007).

As repetições de trinucleótidos ocorrem tanto em células germinativas como em células que não se dividem e também no decurso da divisão de células somáticas (Liu & Wilson, 2012). A instabilidade do tamanho das repetições de tripletos poderá conduzir a uma expansão gradual, podendo os efeitos dessa expansão causar doenças (Lutz, 2007). A expansão destas repetições é particularmente significativa nos neurónios e desempenha um papel importante no envelhecimento do cérebro, assim como no aparecimento e progressão de doenças em ratos e humanos (Liu & Wilson, 2012).

A expansão na repetição de trinucleótidos foi inicialmente identificada como ocorrendo durante a replicação de DNA, no entanto estudos em bactérias, leveduras e ratos mostraram que também pode ocorrer durante a reparação de DNA, na transcrição e na recombinação (Liu & Wilson, 2012). No entanto, os mecanismos envolvidos na expansão continuam pouco compreendidos (Liu & Wilson, 2012).

Pode ainda haver maior expansão ou mesmo contracção da repetição de tripletos dependendo do tipo da repetição tripla e da origem parental da doença (Lutz, 2007).

O tamanho das expansões resultantes pode originar portadores não afetados (pré-mutações) e, como o tamanho da expansão cresce através de gerações consecutivas, pode resultar em doença com variabilidade na gravidade, apresentação clínica e idade de início da doença (Lutz, 2007).

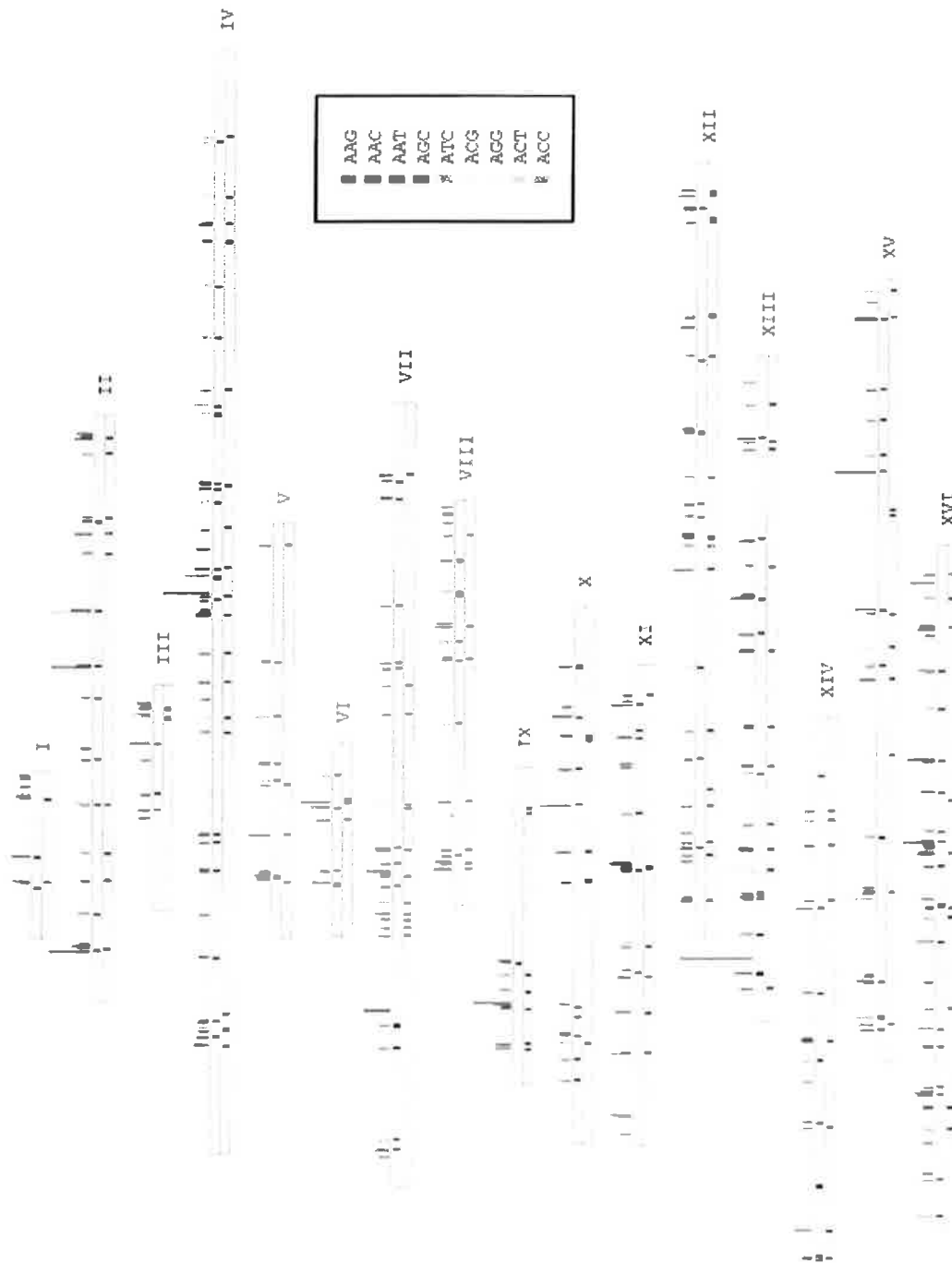
A expansão no número de repetições triplas através das gerações conduz ao fenómeno de antecipação (Lutz, 2007). Estudos em famílias com distrofia miotónica ou com doença de Huntington têm demonstrado fortes evidências de que o fenómeno de antecipação tem uma base biológica e genética sob a forma de um aumento no número de repetições de tripletos. Este número aumenta em sucessivas gerações de pacientes verificando-se uma correlação inversa entre o número de repetições de tripletos e a

idade do início da doença (Polito *et al.*, 1996). Estes autores (Polito *et al.*, 1996) verificaram que a idade de início da doença era menor nas gerações tardias comparativamente à geração parental existindo uma correlação dentro da família, em que a terceira geração (isto é, a criança) apresentava um diagnóstico mais precoce do que a segunda geração (ou seja, o pai) que por sua vez apresentava um diagnóstico ainda mais precoce do que a primeira geração (isto é, o avô).

O género (masculino/feminino) influencia a severidade da doença em casos de antecipação genética como tem sido descrito na literatura. Por exemplo, no caso da doença de Huntington a descendência de homens afetados tem uma idade de início da doença mais precoce e de maior severidade do que a descendência de mulheres afetadas (Polito *et al.*, 1996).

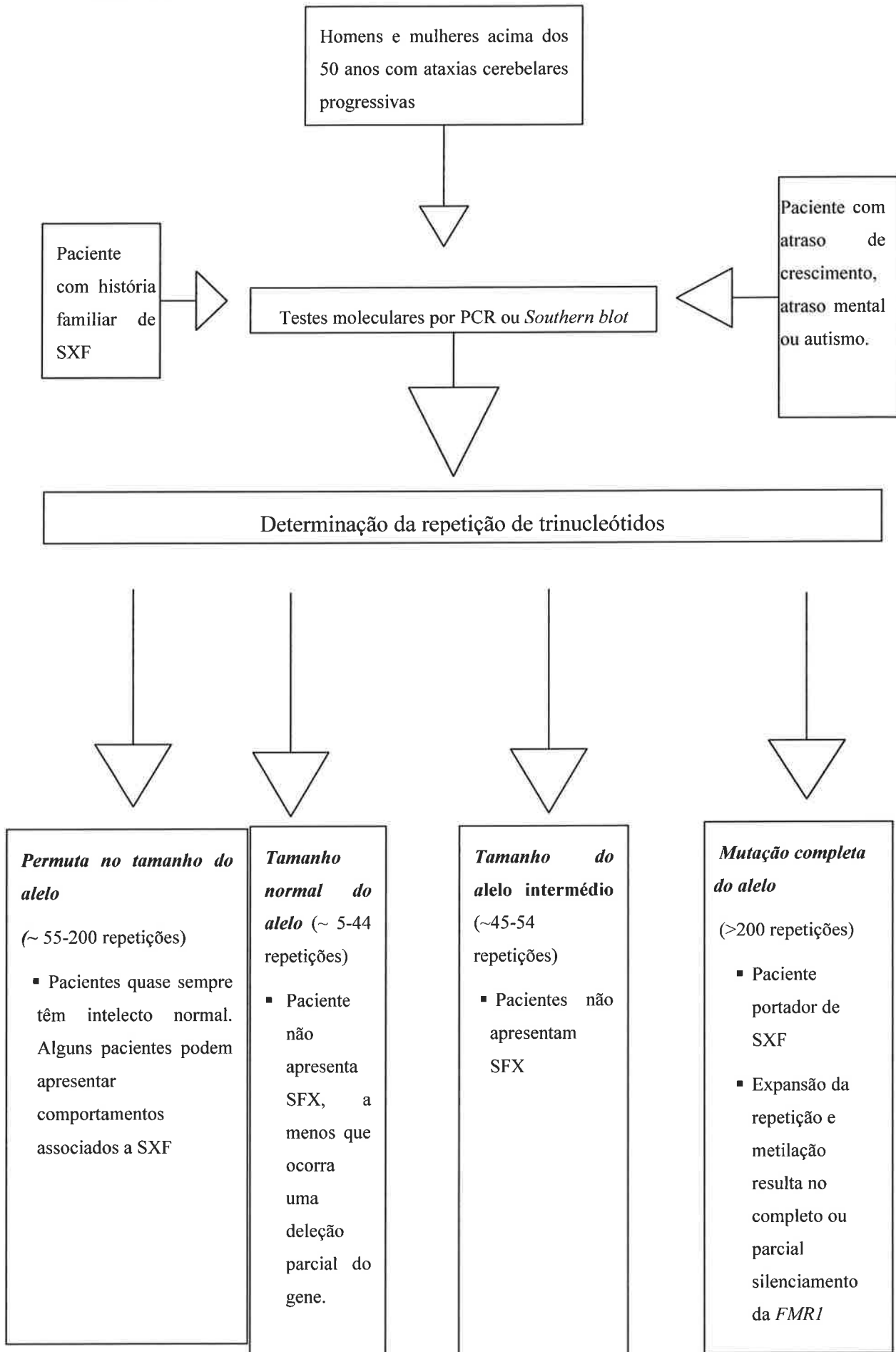
Algumas doenças de repetição de tripletos tem origem parental, visto ser muito raro surgir uma mutação no paciente sem que um dos pais seja portador da doença (Lutz, 2007). No entanto, a presença de replicação de DNA específico e respetiva maquinaria de reparação do núcleo projetada para detectar erros e reparar as cópias de DNA explica potencialmente que existem pessoas que estão mais predispostas à expansão ou contracção das repetições de tripletos (Lutz, 2007).

ANEXO 1



Anexo 1 – Distribuição de repetições de mono, di, tri, e tetranucleótidos nos 16 cromossomas de *S. cerevisiae*. As linhas coloridas acima dos cromossomas indicam o tipo e extensão da repetição.

ANEXO 2



VI. BIBLIOGRAFIA

- Albano, L. M. J. & Kim, C. A. (2001). Análise clínica e molecular da ataxia de Friedreich: revisão da literatura. *Pediatrics (São Paulo)*, 23(3), pp. 241-50.
- Albano, L. Nishioka, S. Moysés, R. Wagenführ, J. Bertola, D. Sugayama, S. Kim, C. (2001). Ataxia de Friedreich. Avaliação Cardíaca de 25 Pacientes com Diagnóstico Clínico e Revisão da Literatura. *Arq Brás Cardiol*, 78(5), pp. 444-447.
- Arruda, W.O. & Teive, H.A.V. (1997). Ataxias Cerebelares Hereditárias. *Arq Neuropsiquiatr*, 55 (3-B), pp. 666-676.
- Aylward, E. Codori, A. Rosenblatt, A. Sherr, M. Brandt, J. Stine, O. Barta, P. Pearlson, G. Ross, C. (2000). Rate of Caudate Atrophy in Presymptomatic and Symptomatic Stages of Huntington's Disease. *Movement Disorders*, 15 (3), pp. 552-560.
- Aylward, E. Sparks, B. Field, K. Yallapragada, V. Shpritz, B. Rosenblatt, A. Brandt, J. Gourley, L. Liang, K. Zhou, H. Margolis, R. Ross, C. (2004). Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology*, 63, pp. 66-72.
- Aziz, N. Pijl, H. Frolich, M. Snel, M. Streefland, T. Roelfsema, F. Roos, R. (2010). Systemic energy homeostasis in Huntington's disease patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(11), pp. 1233-1237.
- Bacalman, S. Farzin, F. Bourgeois, J. Cogswell, J. Goodlin-Jones, B. Gane, L. Grigsby, J. Leehey, M. Tassone, F. Hagerman, R. (2006). Psychiatric Phenotype of the Fragile X - Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) in Males: Newly Described Fonto-Subcortical Dementia. *J Clin Psychiatry*, 67 (1) pp. 87-94.
- Bahl, S. Viridi, K. Mittal, U. Sachdeva, M. Kalla, A. Holmes, S. O'Hearn, E. Margolis, R. Jain, S. Srivastava, A. Mukerji, M. (2005). Evidence of a Common Founder for SCA12 in the Indian Population. *Annals of Human Genetics*, 69, pp. 528-534.

- Baldi, P. Brunak, S. Chauvin, Y. Pedersen, A. (1999). Structural basis for triplet repeat disorders: a computational analysis. *Bioinformatics*, 15 (11), pp. 918-929.
- Baldi, P. & Baisnée, P.-F. (2000). Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats of all lengths. *Bioinformatics*, 16 (10), pp. 865-889.
- Bilgen, M. Karaca, M. Ónus, A. Ince, A. (2004). A software program combining sequence motif searches with keywords for finding repeats containing DNA sequences. *Bioinformatics*, 20 (18), pp. 3379-3386.
- Boeva, V. Regnier, M. Papatsenko, D. Makeev, V. (2006). Short fuzzy tandem repeats in genomic sequences, identification, and possible role in regulation of gene expression. *Bioinformatics*, 22 (6), pp. 676-684.
- Borrell-Pagès, M. Zala, D. Humbert, S. Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, 63 (22), pp. 2642-2660.
- Boy, J. Schmidt, T. Schumann, U. Grasshoff, U. Unser, S. Holzmann, C. Schmitt, I. Karl, T. Laccone, F. Wolburg, H. Ibrahim, S. Riess, O. (2010). A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiology of Disease*, 37, pp. 284-293.
- Boy, R. Correia, P. Llerena, J. Machado-Ferreira, M. Pimentel, M. (2001). Síndrome do X Frágil: estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. *Arq Neuropsiquiatr*, 59 (1), pp. 83-88.
- Brook, J. McCurrach, M. Harley, H. Buckler, A. Church, D. Aburatani, H. Hunter, K. Stanton, V. Thirion, J. Hudson, T. Sohn, R. Zelman, B. Snell, R. Rundle, S. Crow, S. Davies, J. Shelbourne, P. Buxton, J. Jones, C. Juvonen, V. Johnson, K. Harper, P. Shaw, D. Housman, D. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 21, 68(4), pp. 799-808.

- Brussino, A. Graziano, C. Giobbe, D. Ferrone, M. Dragone, E. Arduino, C. Lodi, R. Tonon, C. Gabellini, A. Rinaldi, R. Miccoli, S. Grosso, E. Bellati, M. Orsi, L. Migone, N. Brusco, A. (2010). Spinocerebellar Ataxia Type 12 Identified in Two Italian Families May Mimic Sporadic Ataxia. *Movement Disorders*, 25(9), pp. 1269-1291.
- Bustamante, C. Bryant, Z. Smith, S. (2003). Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*, 421, pp. 423-427.
- Calabrese, P. Durrett, R. Aquadro, C. (2001). Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics*, 159, pp. 839-852.
- Castel, A. Tomkinson, A. Pearson, C. (2009). CTG/CAG Repeat Instability Is Modulated by the Levels of Human DNA Ligase I and Its Interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J Biol Chem*, 284 (39), pp. 26631-26645.
- Choi, K. Yook, J. Kim, M. Kim, H. Park, Y. Kim, J. Choi, J. Shin, J. Kim, D. (2013). Possible anticipation associated with a novel splice site mutation in episodic ataxia type 2. *Neurol Sci*.
- Deighton, C. Criswell, L. Lum, R. Silman, A. (2007). Ages of onset suggestive of genetic anticipation in rheumatoid arthritis multicase sibships can be explained by observational bias. *Rheumatology*, 46, pp. 120-123.
- Duenas, A. Goold, R. Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129, pp. 1357-1370.
- Dürr, A. Cossee, M. Agid, Y. Campuzano, V. Mignard, C. Penet, C. Mandel, J.– L. Brice, A. Koenig, M. (1996). Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia. *N Engl J Med*, 335 (16), pp. 1169-1175.
- Everett, C & Wood, N.(2004). Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain*, 127(11), pp. 2385-2405.

- Filippova, G. Thienes, C. Penn, B. Cho, D. Hu, Y. Moore, J. Klesert, T. Lobanenko, V. Tapscott, S. (2001). CTCF binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet*, 28, pp. 335-343.
- Figueroa, A.A. & Delaney, S. (2010). Mechanistic Studies of Hairpin to Duplex Conversion for Trinucleotide Repeat Sequences. *J Biol Chem*, 285 (19), pp. 14648-14657.
- Frontali, M. (2001). Spinocerebellar ataxia type 6: Channelopathy or glutamine repeat disorder? *Brain Research Bulletin*, 56, pp. 227-231.
- Fu, H., Pizzuti, A. Fenwick, R. King, J. Rajnarayan, S. Dunne, P. Dubel, J. Nasser, G. Ashizawa, T. De Jong, P. Wieringa, B. Korneluk, R. Perryman, M. Epstein, H. Caskey, C. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, 255, pp. 1256-1258.
- Furrer, S. Mohanachandran, M. Waldherr, S. Chang, C. Damian, V. Sopher, B. Garden, G. La Spada, A. (2011). Spinocerebellar Ataxia Type 7 Cerebellar Disease Requires the Coordinated Action of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Glia, and Displays Non-Cell-Autonomous Bergmann Glia Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 31(45), pp. 16269-16278.
- Garden, G. Libby, R. Fu, Y-H. Kinoshita, Y. Huang, J. Possin, D. Smith, A. Martinez, S. Fine, G. Grote, S. Ware, C. Einum, D. Morrison, R. Ptacek, L. Sopher, B. La Spada, A. (2002). Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Promotes Non-Cell-Autonomous Purkinje Cell Degeneration and Displays Proteolytic Cleavage in Ataxic Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), pp. 4897-4905.
- Gehrking, K. Andresen, J. Duvick, L. Lough, J. Zoghbi, H. Orr, H. (2011). Partial loss of Tip60 slows mid-stage neurodegeneration in a spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mouse model. *Human Molecular Genetics*, 20(11), pp. 2204-2212.
- Greco, C. Berman, R. Martin, R. Tassone, F. Schwartz, P. Chang, A. Trapp, B. Iwahashi, C. Brunberg, J. Grigsby, J. Hessel, D. Becker, J. Papazian, J. Leehey, M. Hagerman, R. Hagerman, P. (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain*, 129, pp. 243-255.

- Groenen, P. Wieringa, B. (1998). Expanding complexity in myotonic dystrophy. *Bioessays*, 20, pp. 901-912.
- Hagerman, R. Leavitt, B. Farzin, F. Jacquemont, S. Greco, C. Brunberg, J. Tassone, F. Hessler, D. Harris, S. Zhang, L. Jardini, T. Gane, L. Ferranti, J. Ruiz, L. Leehey, M. Grigsby, J. Hagerman, P. (2004). Fragile-X–Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) in Females with the *FMRI* Premutation. *Am. J. Hum. Genet.*, 74, pp. 1051-1056.
- Harley, H. Rundle, S. MacMillan, J. Myring, J. Brook, J. Crow, S. Reardon, W. Fenton, I. Shaw, D. Harper, P. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet.* 52(6), pp. 1164-1174.
- Hersh, J.H, & Saul, R.A. (2011). Clinical Report - Health Supervision for Children with Fragile X Syndrome. *Pediatrics*, 127 (5), pp. 994-1006.
- Holmberg, M. Duyckaerts, C. Dürr, A. Cancel, G Gourfinkel-An, I. Damier, P. Faucheux, B. Trottier, Y. Hirsch, E. Agid, Y. Brice, A. (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Human Molecular Genetics*, 7(5), pp. 913-918.
- Holmes, S. O’Hearn, E. Ross, C. Margolis, R. (2001). SCA12: An unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Research Bulletin*, 56, pp. 397-403.
- Hou, M – H. Robinson, H. Gao, Y. Wang, A. (2002). Crystal structure of actinomycin D bound to the CTG triplet repeat sequences linked to neurological diseases. *Nucleic Acids Res*, 30 (22), pp. 4910-4917.
- Huntley, M. & Golding, G. (2004). Neurological proteins are not enriched for repetitive sequences. *Genetics* 166, pp. 1141-1154.
- Iwahashi, C. Yasui, D. An, H.–J. Greco, C. Tassone, F. Nannen, K. Babineau, B. Lebrilla, C. Hagerman, R. Hagerman, P. (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain*, 129, pp. 256-271.

- Jansen, G. Groenen, P. Bachner, D. Jap, P. Coerwinkel, M. Oerlemans, F. van den Broek, W. Gohlsch, B. Pette, D. Plomp, J. Molenaar, P. Nederhof, M. van Eched, C. Dekker, M. Berns, A. Hameister, H. Wieringa, B. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet*, 13, pp. 316-324.
- Jakupciak, J.P. & Wells, R. (1999). Genetic Instabilities in (CTG.CAG) Repeats Occur by Recombination. *J Biol Chem*, 274 (33), pp. 23468-23479.
- Jakupciak, J.P. & Wells, R. (2000). Genetic Instabilities of Triplet Repeat Sequences by Recombination. *IUBMB Life*, 50, pp. 355-359.
- Jaworki, A. Rosche, W. Gellibolian, R. Kang, S. Shimizu, M. Bowater, R. Sinden, R. Wells, R. (1995). Mismatch repair in *Escherichia coli* enhances instability of (CTG) triplet repeats from human hereditary diseases. *Genetics*. 92, pp. 11019-11023.
- Jeong, H. Then, F. Melia Jr, T. Mazzulli, J. Cui, L. Savas, J. Voisine, C. Paganetti, P. Tanese, N. Hart, A. Yamamoto, A. Krainc, D. (2009). Acetylation Targets Mutant Huntingtin to Autophagosomes for Degradation. *Cell*, 137, pp. 60-72.
- Jung, J. Jaarsveld, M. Shieh, S. Xu, K. Bonini, N. (2011). Defining Genetic Factors That Modulate Intergenerational CAG Repeat Instability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 187, pp. 61-71.
- Kaimen-Maciel, D. Medeiros, M. Clímaco, V. Kelian, G. Teixeira da Silva, L. Marcos de Souza, M. Raskin, S. (1998). Atrofia Muscular Bulbo Espinhal Recessiva Ligada ao Cromossoma X (Doença de Kennedy). *Arq Neuropsiquiatr*, 56 (3-B), pp. 639-645.
- Kaliman, P. & Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cellular Signalling* 20, pp. 1935-1941.
- Kawai, Y. Suenaga, M. Watanabe, H. Ito, M. Kato, K. Kato, T. Ito, K. Tanaka, F. Sobue, G. (2008). Prefrontal hypoperfusion and cognitive dysfunction correlates in

- spinocerebellar ataxia type 6. *Journal of the Neurological Sciences*, 271, pp. 68-74.
- Kiliszek, A. *et al.* (2010). Atomic resolution structure of CAG RNA repeats: structural insights and implications for the trinucleotide repeat expansion diseases. *Nucleic Acids Res*, 38 (22), pp. 8370-8376.
- Kiliszek, A. Kierzek, R. Krzyzosiak, W. Rypniewski, W. (2011). Crystal structures of CGG RNA repeats with implications for fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Nucleic Acids Res*, 39 (16), pp. 7308-7315.
- Krobitsch, S. & Kazantsev, A. G. (2011). Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43, pp. 20-24.
- Krzyzosiak, W. Sobczak, K. Wojciechowska, M. Fiszer, A. Mykowska, A. Kozlowski, P. (2012). Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target. *Nucleic Acids Res*, 40 (1) pp.11-26.
- Larkin, K. Fardaei, M. (2001). Myotonic dystrophy-a multigene disorder. *Brain Res Bull*, 56, pp. 389-395.
- Lasek, K. Lencer, R. Gaser, C. Hagenah, J. Walter, U. Wolters, A. Kock, N. Steinlechner, S. Nagel, M. Zuhlke, C. Nitschke, M.-F. Brockmann, K. Klein, C. Rolfs, A. Binkofski, F. Morphological basis for the spectrum of clinical deficits in spinocerebellar ataxia 17 (SCA17). *Brain*, 129, pp. 2341–2352.
- Leonardi, M. Lopes, G. Bezerra, P. Borges, A. (2009). Impacto do desequilíbrio estático e dinâmico no risco de quedas em indivíduos com ataxia espinocerebelar. *Rev Neurocienc*, 17(2), pp. 178-182.
- Lima, I.M. (1999). Repetições CAG: candidatos na géese das psicoses funcionais. *Rev Bras Psiquiatr*, 21.
- Lima, M. Costa, M. Montiel, R. Ferro, A. Santos, C. Silva, C. Bettencourt, C. Sousa, A. Sequeiros, J. Coutinho, P. Maciel, P. (2005). Population Genetics of Wild-Type

- CAG Repeats in the Machado-Joseph Disease Gene in Portugal. *Hum Hered*, 60, pp. 153-163.
- Liu, Y. & Wilson, S. (2012). DNA base excision repair: a mechanism of trinucleotide repeat expansion. *Trends in Biochemical Sciences*, 37 (4), pp. 162-172.
- Lutz, R. (2007). Trinucleotide Repeat Disorders. *Semin Pediatr Neurol*, 14, pp. 26-33.
- Marco, B. Sara, M. Fabrizio, M. Gilberto, P. (2012). A case of nocturnal frontal lobe epilepsy in a patient with spinocerebellar ataxia type 17. *Seizure*, 21, pp 805-806.
- Margaglione, M. Mazzola, G. Minno, G. Generoso, A. (1996). Evidence for Genetic Anticipation in Non-Mendelian Disease. *Am J Hum Genet*, 59, pp. 268-269.
- Martins, M.S.A. (2005). Síndrome do X Frágil. *Revista Nucleus*, 3 (2), pp. 207-215.
- McMurray, C.T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet*, 11(11), pp. 786-799.
- McConnell, R. Middlemist, S. Scala, C. Strassmann, J. Queller C. (2007). An Unusually Low Microsatellite Mutation Rate in *Dictyostelium discoideum*, an Organism With Unusually Abundant Microsatellites. *Genetics*, 177, pp.1499-1507.
- Mitas, M. *et al.* (1995). Hairpin properties of single-stranded DNA containing GC-rich triplet repeat: (CTG)₁₅. *Nucleic Acids Res*, 23(6), pp. 1050-1059.
- Mochmann, L.H. & Wells, R. (2004) Transcription influences the types of deletion and expansion products in an orientation-dependent manner from GAC-GTC repeats. *Nucleic Acids Res*, 32(15), pp. 4469-4479.
- Murányi, A. Zhang, R. Liu, F. Hirano, K. Ito, M. Epstein, H. Hartshorne, D. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *Federation of European Biochemical Societies*, 493, pp. 80-84.
- Murray, A. Youings, S. Dennis, N. Latsky, L. Linehan, P. McKechnie, N. Macpherson, J. Pound, M. Jacobs, P. (1996). Population screening at the FRAXA and FRAXE

- loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Human Molecular Genetics*, 5(6), pp. 727-735.
- Napierala, M. Bacolla, A. Wells, R. (2005). Increased Negative Superhelical Density *in Vivo* Enhances the Genetic Instability of Triplet Repeat Sequences. *J Biol Chem*, 280(45), pp. 37366-37376.
- Neto, J. Tamelini, M. Forlenza, O. (2005). Diagnóstico diferencial das demências. *Rev Psiq Clin*, 32(3), pp. 119-130.
- Nolin, S. Houck, G. Gargano, A. Blumstein, H. Dobkin, C. Brown, W. (1999). FMR1 CGG-Repeat Instability in Single Sperm and Lymphocytes of Fragile-X Premutation Males. *Am J Hum Genet*, 65(3), pp. 680-688.
- Novelli, G. Gennarelli, M. Zelano, G. Pizzuti, A. Fattorini, C. Caskey, C. Dallapiccola, B. (1993). Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. *Biochem Mol Biol Int*, 29, pp. 291-297.
- Nussbaum, R. McInnes, R. Willard, H. (2007). *Thompson & Thompson, Genética Médica*. Rio de Janeiro, Elsevier
- Oda, M. Maruyama, H. Komure, O. Morino, H. Terasawa, H. Izumi, K. Imamura, T. Yasuda, M. Ichikawa, K. Ogawa, M. Matsumoto, M. Kawakami, H. (2004). Possible Reduced Penetrance of Expansion of 44 to 47 CAG/CAA Repeats in the TATA-Binding Protein Gene in Spinocerebellar Ataxia Type 17. *Arch Neurol*, 61, pp. 209-212.
- Oliveira, A. Giunco, C. Carvalho, A. Salles, F. Conte, F. (2004). Investigação molecular por PCR da Síndrome do Cromossomo X Frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento. *Arq Ciênc Saúde*, 11(1), pp. 25-28.
- Ohshima, K. Montermini, L. Wells, R. Pandolfo, M. (1998). Inhibitory Effects of Expanded GAA-TTC Triplet Repeats from Intron I of the Friedreich Ataxia Gene on Transcription and Replication *in Vivo*. *J Biol Chem*, 273(23), pp. 14588-14595.

- Paulsen, J. Magnotta, V. Mikos, A. Paulson, H. Penziner, E. Andreassen, N. Nopoulos, P. (2006). Brain Structure in Preclinical Huntington's Disease. *Biol Psychiatry*, 59, pp. 57-63.
- Polito, J. Rees, R. Childs, B. Mendeloff, A. Harris, M. Bayless, T. (1996). Preliminary evidence for genetic anticipation in Crohn's disease. *Lancet*, 347(9004), pp. 798-800.
- Pollard, L. Sharma, R. Gómez, M. Shah, S. Delatycki, M. Pianese, L. Monticelli, A. Keats, B. Bidichandani, S. (2004). Replication-mediated instability of the GAA triplet repeat mutation in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, 32(19), pp.5962-5971.
- Primerano, B. Tassone, F. Hagerman, R. Hagerman, P. Amaldi, F. Bagni, C. (2002). Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in Fragile X patients with premutations. *RNA*, 8(12), pp. 1482-1488.
- Puccio, H. & Koenig, M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 9(6), pp. 887-892.
- Puccio, H. & Koenig, M. (2001). The molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Clinical Neuroscience Research*, 1, pp. 127-133.
- Ranum, L. & Day, J. (2004). Myotonic Dystrophy: RNA Pathogenesis Comes into Focus. *Am J Hum Genet*, 74(5), pp. 793-804.
- Reetz, K. Dogan, I. Rolfs, A. Binkofski, F. Schulz, J. Laird, A. Fox, P. Eickhoff, S. (2012). Investigating function and connectivity of morphometric findings — Exemplified on cerebellar atrophy in spinocerebellar ataxia 17 (SCA17). *NeuroImage*, 62, pp. 1354-1366.
- Reddy, S. Smith, D. Rich, M. Leferovich, J. Reilly, P. Davis, B. Tran, K. Rayburn, H. Bronson, R. Cros, D. Balice-Gordon, R. Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet*, 13, pp. 325-335.

- Regateiro, J.F. (2007) *Manual de Genética Médica*. Coimbra. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Restituito, S. Thompson, R. Eliet, J. Raike, R. Riedl, M. Charnet, P. Gomez, C. (2000). The Polyglutamine Expansion in Spinocerebellar Ataxia Type 6 Causes a b Subunit-Specific Enhanced Activation of P/Q-Type Calcium Channels in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of Neuroscience*, 20(17) pp. 6394-6403.
- Rindler, P.M. & Bidichandani, S.I. (2010). Role of transcript and interplay between transcription and replication in triplet-repeat instability in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 39(2), pp. 526-535.
- Rolfsmeier, M. Dixon, M. Pessoa-Brandão, L. Pelletier, R. Miret, J. Lahue, R. (2001). Cis-Elements Governing Trinucleotide Repeat Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157, pp. 1569-1579.
- Satterfield, T. Jackson, S. Pallanck1, L. (2002). A Drosophila Homolog of the Polyglutamine Disease Gene *SCA2* Is a Dosage-Sensitive Regulator of Actin Filament Formation. *Genetics*, 162, pp. 1687-1702.
- Sato, K. Yabe, I. Fukuda, Y. Soma, H. Nakahara, Y. Tsuji, S. Sasaki, H. (2010). Mapping of Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia Without the Pathogenic *PPP2R2B* Mutation to the Locus for Spinocerebellar Ataxia 12. *Arch Neurol*, 67(10), pp. 1257-1262.
- Sawa, A. Nagata, E. Sutcliffe, S. Dooloor, P. Cascio, M. Ozeki, Y. Roy, S. Ross, C. Snyder, S. (2005). Huntingtin is cleaved by caspases in the cytoplasm and translocated to the nucleus via perinuclear sites in Huntington's disease patient lymphoblasts. *Neurobiology of Disease*, 20 pp. 267-274.
- Schapira, A.H. (1999). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta*, 1410(2), pp. 159-170.
- Sharma, R. Bhatti, S. Gomez, M. Clark, R. Murray, C. Ashizawa, T. Bidichandan, S. (2002). The GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia shows a high level

of somatic instability in vivo, with a significant predilection for large contractions. *Hum Mol Genet*, 11(18), pp. 2175-2187.

Slean, M. Reddy, K. Wu, B. Edamura, K. Kekis, M. Nelissen, F. Aspers, R. Tessari, M. Schaerer, O. Wijmenga, S. Pearson, C. Interconverting Conformations of Slipped-DNA Junctions Formed by Trinucleotide Repeats Affect Repair Outcome. *Biochemistry*.

Sobczak, K. Michlewski, G. Mezer, M. Kierzek, E. Krol, J. Olejniczak, M. Kierzek, R. Krzyzosiak, W. (2010). Structural Diversity of Triplet Repeat RNAs. *J Biol Chem*, 285(17), pp. 12755-1276.

Stevens, J. Lahue, E. Li, G. Lahue, R. (2013). Trinucleotide repeat expansions catalyzed by human cell-free extracts. *Cell Research*, pp. 1-8.

Subramanian, S. Madgula, V. George, R. Mishra, R. Pandit, M. Kumar, C. Singh, L. (2003). Triplet repeats in human genome: distribution and their association with genes and other genomic regions. *Bioinformatics*, 19(5), pp. 549-552.

Tachi, N. Kozuka, N. Ohya, K. Chiba, S. Kikuchi, K. (1995). Expression of myotonic dystrophy protein kinase in biopsied muscles. *Journal of the Neurological Sciences*, 132(95) pp. 61-64.

Tapscott, S. (2000). Deconstructing myotonic dystrophy. *Science*, 289, pp. 1701-1702.

Teive, H. Iwamoto, F. Camargo, C. Lopes-Cendes, I. Werneck, L. (2001). Machado-Joseph disease versus hereditary spastic paraplegia. *Arq Neuropsiq*, 59(3-B), pp. 809-811.

Temmerman, N. Seneca, S. Steirteghem, A. Haentjens, P. Elst, J. Liebaers Sermon, K. (2008). CTG repeat instability in a human embryonic stem cell line carrying the myotonic dystrophy type 1 mutation. *Mol Hum Reprod*, 14(7), pp. 405-412.

Thieben, M. Duggins, A. Good, C. Gomes, L. Mahant, N. Richards, F. McCusker, E. Frackowiak, R. (2002). The distribution of structural neuropathology in pre-clinical Huntington's disease. *Brain*, 125 pp. 1815-1828.

- Ueda, H. Shimokawa, M. Yamamoto, M. Kameda, N. Mizusawa, H. Baba, T. Terada, N. Fujii, Y. Ohno, S. Ishiurai, S. Kobayashi, T. (1999). Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 162, pp. 38-50.
- Ushe, M. & Perlmutter, J.(2012). Oromandibular and Lingual Dystonia Associated With Spinocerebellar Ataxia Type 8. *Movement Disorders*, 27(14), pp. 1741-1742
- Vallur, A.C. & Maizels, N. (2010). Complementary Roles for Exonuclease 1 and Flap Endonuclease 1 in Maintenance of Triplet Repeats. *J Biol Chem*, 285(37), pp. 28514-28519.
- Veiga, M.F. & Toralles, M.B.P. (2002). A expressão neurológica e o diagnóstico genético nas síndromes de Angelman, de Rett e do X-Frágil. *J Pediatría*, 78(1), pp. 55-62.
- Videira, A. (2001). *Engenharia genética – princípios e aplicações*. Lisboa. LIDEL.
- Wang, G. Zhao, J. Vasquez, K. (2009). Methods to determine DNA structural alterations and genetic instability. *Methods*, 48(1), pp. 54-62.
- Wells, R. (1996). Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats. *J Biol Chem*, 271(6), pp. 2875-2878.
- Wells, R. Parniewski, P. Pluciennik, A. Bacolla, A. Gellibolian, R. Jaworski, A. (1998). Small Slipped Register Genetic Instabilities in *Escherichia coli* in Triplet Repeat Sequences Associated with Hereditary Neurological Diseases. *J Biol Chem*, 273(31), pp. 19532-19541.
- Weisman-Shomer, P. Cohen, E. Hershco, I. Khateb, S. Wolfvitz-Barchad, O. Hurley, L. Fry, M. (2003). The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)_n. *Nucleic Acids Res*, 31(14), pp. 3963-3970.
- Wigg, C. & Duro, L. (1995). Estudo psicológico longitudinal na distrofia miotónica. *Arq Neuropsiquiatr*, 53(4) pp. 749-754.

- Xu, M. Gabison, J. Liu, Y. (2012). Trinucleotide repeat deletion via a unique hairpin bypass by DNA polymerase β and alternate flap cleavage by flap endonuclease 1. *Nucleic Acids Research*, pp. 1-14.
- Xunclà, M. Rodríguez – Revenga, L. Madrigal, I. Jiménez, D. Milà, M. Badenas, C. (2010). Protocol proposal for Friedreich ataxia molecular diagnosis using fluorescent and triplet repeat primed polymerase chain reaction. *Transl Res*, 156(5), pp. 309-314.
- Young, E. Sloan, J. Riper, K. (2000). Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154, pp. 1053-1068.
- Zander, C. Takahashi, J. Hachimi, K. Fujigasaki, H. Albanese, V. Lebre, A. Stevanin, G. Duyckaerts, C. Brice, A. (2001). Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Humana Molecular Genetics*, 10 (22), pp. 2569-2579.