

Aplicação da biologia molecular no diagnóstico de doenças genéticas

Sandra Leistner¹, Maria L. S. Pereira^{1,2}, Ângela A. Fachel¹, Antônio C. Burlamaque-Neto¹, Carla Streit^{1,2}, Liana Morari¹, Luciane C. Lima¹, Luiz C. S. da Silva^{1,2}, Márcia G. Petry^{1,2}, Tiago S. Carvalho^{1,2}, Úrsula Matte¹

Com os avanços da chamada Medicina Genômica, a análise molecular de doenças genéticas vem sendo cada vez mais necessária para a completa caracterização das alterações apresentadas por um indivíduo ou até mesmo essencial para um diagnóstico diferencial em muitos casos. O objetivo deste artigo é descrever os protocolos de diagnóstico molecular utilizados no laboratório de genética molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que visam, em sua maioria, a utilização de técnicas atualizadas e especializadas de biologia molecular no Brasil, para permitir não apenas a caracterização do genótipo dos pacientes afetados mas também para melhorar o aconselhamento genético através do uso de técnicas e estratégias mais sensíveis e mais confiáveis para a detecção de portadores e para o diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

Unitermos: Doenças genéticas; doenças lisossômicas de depósito; análise molecular; PCR.

Application of molecular biology techniques in the diagnosis of genetic diseases

With the advances of the so called Genomic Medicine, the molecular analysis of genetic diseases increased the needs of a full characterization of alterations shown by an individual and is becoming essential for a differential diagnosis in several cases.

The purpose of the present paper is to describe the molecular diagnostic protocols used in the Molecular Genetics Laboratory of the Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Most of these protocols are aimed at the use of updated and specialized molecular biology techniques in Brazil. The objective is not only the characterization of the affected patient's genotype, but also the improvement of genetic counseling through the use of more sensitive and trustable techniques and strategies for the detection of carriers and for prenatal diagnosis in future pregnancies.

Key-words: Genetic diseases; lysosomal storage diseases; molecular analysis; PCR.

¹ Serviço de Genética Médica, Laboratório de Genética Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Sandra Leistner, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: sleistner@hcpa.ufrgs.br

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Introdução

Os avanços no campo da biologia molecular permitiram o emprego de métodos mais sensíveis e rápidos na identificação de doenças genéticas, que são de grande valia no diagnóstico clínico. A identificação de famílias e uma triagem cuidadosa para mutações genéticas conhecidas deverá permitir o aconselhamento genético de indivíduos afetados e a realização de testes de triagem intervencionais para populações apropriadas. A substituição de genes mutantes ou perdidos através da utilização de técnicas de terapia gênica será possível em um futuro próximo.

A justificativa de se utilizar ferramentas de análise molecular para doenças genéticas pode se valer das seguintes afirmativas:

1. Definição de uma estratégia baseada em testes moleculares para o diagnóstico precoce preciso de pacientes afetados, para a detecção de portadores, continuidade (*follow-up*) do tratamento e planejamento terapêutico;
2. correlação das alterações moleculares encontradas com os aspectos clínicos e com a evolução da doença dos pacientes (correlação genótipo-fenótipo), contribuindo para uma previsão do prognóstico e para uma melhor definição da estratégia do tratamento em cada caso;
3. análise de populações específicas quanto à existência de um "efeito fundador" que possa propiciar um maior risco ao desenvolvimento da doença no indivíduo e seus familiares.

O objetivo deste artigo é descrever os protocolos de diagnóstico molecular utilizados no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica, que visam, em sua maioria, o desenvolvimento e a utilização de técnicas atualizadas e especializadas de biologia molecular existentes no Brasil, para permitir não apenas a caracterização do genótipo dos pacientes afetados, mas também para melhorar o aconselhamento genético através do uso de técnicas e estratégias mais sensíveis e mais confiáveis para a detecção de portadores e diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

Doenças lisossômicas de depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) se caracterizam por uma deficiência

protéica específica, levando quase sempre ao acúmulo de moléculas, geralmente macromoléculas, não degradadas ou parcialmente degradadas dentro dos lisossomos, o que perturba o funcionamento normal da célula.

O Laboratório de Genética Molecular desenvolve projetos de pesquisa e oferece diagnóstico molecular para algumas doenças deste grupo, que serão abordadas individualmente abaixo.

Mucopolissacaridose I (doença de Hurler)

A mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença lisossômica de depósito causada pela deficiência de alfa-L-iduronidase (IDUA), que leva a um acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs), excretados na urina. Existe um espectro contínuo de manifestações fenotípicas, mas são reconhecidas 3 formas clínicas da doença: MPS IH ou síndrome de Hurler (forma grave), MPS IS ou síndrome de Scheie (forma leve) e MPS IH/S ou síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária). Estudos de correlação genótipo-fenótipo têm demonstrado a importância da análise molecular para o aconselhamento genético e a escolha das abordagens terapêuticas.

O gene para a IDUA foi mapeado no braço curto do cromossomo 4 na região 16.3 (1). O gene possui aproximadamente 19 kb com 14 exons que originam um mRNA de 2.3 kb (2,3). Até o momento foram encontradas 46 mutações no gene da IDUA humano. Além disso, 30 polimorfismos ou mutações não patogênicas foram descritas. Quatro casos de pseudodeficiência também já foram descritos, resultando na ausência aparente de IDUA por ensaios *in vitro* que não é associada com um fenótipo patológico. No entanto, em apenas um dos casos o mecanismo molecular foi esclarecido (4).

No Laboratório de Genética Molecular do SGM-HCPA são analisados todos os pacientes com diagnóstico bioquímico de MPS I avaliados no Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo. São pesquisadas 10 mutações no gene da IDUA: Q70X, A75T, H82P, R89Q, 678-7g→a, L218P, A327P, R383H, W402X e P533R, através da técnica de digestão com enzimas de restrição de fragmentos amplificados por PCR.

Das 10 mutações pesquisadas por este protocolo, 6 (Q70X, R89Q, A327P, R383H,

W402X e P533R) estão presentes nos pacientes brasileiros, sendo a maioria em heterozigose. As frequências encontradas para estas mutações foram descritas por Matte et al. (5), sendo possível determinar o genótipo de 37,0% dos pacientes analisados (10/27) e correlacioná-lo com dados sobre o fenótipo clínico.

A frequência das mutações encontradas neste estudo difere da descrita para populações européias ou norte-americanas e australianas. A mutação P533R apresentou uma frequência mais elevada do que a descrita na literatura (entre 11 e 15%), enquanto A327P, R383H e R89Q encontram-se próximas das frequências obtidas em outros trabalhos. Entretanto, as mutações Q70X e W402X apresentaram frequências bastante distintas das descritas em outros estudos. Ambas são descritas como responsáveis por cerca de 60% dos alelos, enquanto em pacientes brasileiros suas frequências foram de 1,8% e 25,0% respectivamente. Este dado, além de impedir a determinação da maior parte dos genótipos, parece indicar a presença de outras mutações comuns na população brasileira, diferentes das já descritas em populações européias.

Mucopolissacaridose II (doença de Hunter)

A doença de Hunter ou MPS II é uma DLD recessiva ligada ao X que resulta de uma deficiência de L-iduronato 2-sulfato sulfatase (IDS) (EC 3.1.6.13), uma das enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfatos (6). Um acúmulo excessivo nos tecidos e excreção pela urina destes GAGs não degradados leva ao aparecimento do fenótipo clínico característico nestes pacientes. Duas formas clínicas, moderada e grave, são reconhecidas (7). Entretanto, existe um grande espectro de severidade clínica, já que as formas moderada e grave representam apenas os dois extremos desta grande variação. Algumas destas características clínicas incluem face grosseira, hepatoesplenomegalia, deformidades ósseas, rigidez articular e envolvimento neurológico. O retardo mental é progressivo e varia de um paciente para outro. Pacientes com a forma leve da doença têm inteligência normal. Problemas cardíacos e obstrução das vias aéreas respiratórias são normalmente a causa da morte nestes pacientes. Estudos recentes mostram

uma frequência que varia de 1:116.000 a 1:140.000 nascidos vivos (8). A análise de mutações no gene da IDS em diferentes populações tem ajudado o entendimento da base molecular da doença bem como a caracterização e a relação entre genótipo e fenótipo (3).

O gene da IDS foi mapeado ao braço longo do cromossomo X na região 28.1 e um cDNA de 2.3 kb foi isolado e seqüenciado (9). A organização do gene também foi determinada, sendo que o mesmo divide-se em 9 exons separados por 8 íntrons que englobam 24kb (10,11). A presença de um pseudogene altamente homólogo aos exons 2 e 3 e introns 2, 3 e 7 no gene funcional foi publicada na literatura (12).

A MPS II apresenta uma ampla variabilidade clínica, já que a diferenciação fenotípica não é possível através do uso dos métodos bioquímicos e imunológicos desenvolvidos até o momento. Um outro problema diz respeito à identificação de portadores em doenças ligadas ao X, cuja detecção baseada em ensaios enzimáticos não é confiável devido à inativação ao acaso do cromossomo X que dá origem a uma sobreposição dos valores enzimáticos encontrados em portadoras geneticamente definidas com o de familiares portadores e de controles normais. Este fato pode originar resultados conflitantes quando da necessidade da identificação de portadores para aconselhamento genético. Nestes casos, estudos realizados através de técnicas de biologia molecular permitem a análise da segregação da mutação na família e a detecção da mutação independentemente do estado de inativação do X.

A análise molecular da doença de Hunter é extremamente útil para evitar diagnóstico pré-natal desnecessário devido à incerteza da condição de portador, isto é, quando a mutação encontrada no paciente não está presente na mãe (mutação nova) ou em outros familiares do sexo feminino.

Após a identificação do gene responsável pela MPS II, estudos sobre a natureza molecular das mutações envolvidas nesta doença começaram a ser realizados com o objetivo de explicar suas bases moleculares e caracterizar a relação entre genótipo e fenótipo nestes pacientes. Assim, começaram a ser definidas as principais mutações causadoras da doença; tal identificação passa a documentar a heterogeneidade genética esperada neste grupo

e traz as primeiras explicações para a ampla variedade de fenótipos observada.

Deleções completas e grandes rearranjos correspondem a 20% de todas as mutações encontradas no gene da IDS. A maioria das outras mutações são devido a mutações de ponto, mutações em sítio de *splicing* e pequenas deleções e inserções. Mais de 80 mutações diferentes foram identificadas até o momento, demonstrando que a doença de Hunter é geneticamente heterogênea (8). Tais mutações encontram-se espalhadas por todo o gene e ocorrem em pacientes com formas moderada, intermediária e severa da doença. Treze mutações recorrentes foram relatadas, sendo que algumas delas correspondem a *hot spots* e foram encontradas em até 10 pacientes não relacionados.

Resultados obtidos em um grupo de pacientes brasileiros com MPS II (13,14) evidenciaram que mutações comuns em outras populações não se encontram presentes entre os nossos pacientes de forma tão frequente quanto em outras populações, tornando-se necessário uma investigação mais ampla, não só através da triagem de mutações já descritas na literatura, mas também através do *screening* de novas mutações que possam ser características da nossa população. Assim, propôs-se uma linha metodológica a ser utilizada para análise molecular nestes pacientes, utilizando-se a seguinte estratégia:

1. Detecção de 4 mutações recorrentes (R172X, R468W, R468Q e R443X) no gene da IDS utilizando PCR seguido de testes simples e não-radioativos tais como digestão com enzimas de restrição, apesar de na MPS II a maioria das mutações serem únicas para cada família;
2. detecção de grandes deleções através da amplificação das extremidades 3' e 5' do gene IDS;
3. detecção de uma inversão comum que ocorre entre o gene IDS e um pseudogene extremamente homólogo a parte do gene funcional, através de amplificação por PCR dos pontos de quebra desta inversão;
4. detecção e caracterização de mutações raras causadoras da doença por análise de conformação de cadeia simples (SSCP), seguido de seqüenciamento das regiões de interesse e estabelecimento de protocolos confiáveis para a detecção de heterozigotos e diagnóstico pré-natal.

A partir desta metodologia aplicada aos pacientes é possível estabelecer protocolos confiáveis para a detecção de heterozigotos e diagnóstico pré-natal nos familiares dos pacientes afetados pela doença.

Mucopolissacaridose VI (doença de Maroteaux-Lamy)

A doença de Maroteaux-Lamy ou MPS VI é uma DLD resultante da deficiência de N-acetilgalactosamina 4-sulfatase ou arilsulfatase B (ASB) (EC 3.1.6.1), uma das enzimas responsáveis pela degradação seqüencial do dermatan sulfato. A deficiência da ASB causa acúmulo lisossomal e excreção pela urina de dermatan sulfato parcialmente degradado.

Formas clínicas grave, intermediária e leve são reconhecidas. A forma grave, tipicamente infantil, é em geral diagnosticada antes dos 2 anos de idade, apresentando rápida progressão. A forma leve se manifesta em adolescentes e adultos antes dos 20 anos, e sua progressão é lenta. A forma intermediária apresenta, como fenótipo, retardo no crescimento, face grosseira, restrição dos movimentos articulares, hepatoesplenomegalia, deformidades ósseas, disfunção da válvula aorta e opacidade de córnea. Os pacientes com forma grave de MPS VI freqüentemente morrem de complicações cardiopulmonares entre os 6 e os 30 anos de vida (8). Em contraste com a maioria dos outros tipos de mucopolissacaridoses, os pacientes com MPS VI apresentam desenvolvimento mental normal.

A avaliação clínico-laboratorial inicial dos pacientes com MPS VI pode ser feita através de testes bioquímicos rápidos e de baixo custo, sujeitos a resultados falso-positivos e falso-negativos. No caso específico de MPS VI, a análise da atividade enzimática residual não tem permitido fazer correlações com a gravidade clínica da doença, indicando somente a capacidade catalítica mínima compatível com o fenótipo normal.

O gene que codifica a ASB humana foi localizado no cromossomo 5q13-q14 por hibridização *in situ*. O isolamento e seqüenciamento do cDNA da ASB humana (15,16), possibilitou a investigação de lesões moleculares no gene da ASB em pacientes com MPS VI. O cDNA possui 2811 pb, e a organização do gene também foi determinada, sendo que o

mesmo consiste de 8 exons interrompidos por 7 íntrons (17).

Deste modo, começaram a ser definidas as primeiras mutações causadoras da doença e as primeiras explicações para a ampla variedade de fenótipos observados, sugerindo a heterogeneidade genética da MPS VI.

Aproximadamente 15 mutações já foram identificadas em pacientes com MPS VI, sendo que cada uma delas é particular para cada indivíduo. A maioria das mutações encontradas até o momento são mutações de ponto, deleção e inserção de bases. As mutações encontram-se espalhadas por todo o gene, sendo o exon 2 aquele com a maior frequência das mutações até agora determinadas.

A população brasileira parece ter uma característica bastante particular em relação às outras populações estudadas até o momento. Uma mutação comum já foi observada em diversos pacientes não relacionados, além de diversos polimorfismos encontrados quando da análise de 200 alelos normais (18).

Em vista disto, um protocolo baseado na triagem desta mutação comum é sugerido para uma análise inicial de pacientes brasileiros com MPS VI. A amplificação de todos os exons seguida de SSCP e seqüenciamento deve ser realizado para a análise de outras mutações privadas. No caso de uma mutação não ser identificada em um determinado paciente, é viável a utilização dos polimorfismos como análise de ligação através de haplótipos nestas famílias, na tentativa de mapear a herança do alelo mutado.

Com o avanço das técnicas moleculares a MPS VI parece ser um modelo apropriado para futuros protocolos de terapia gênica, já que os pacientes não apresentam retardo mental.

Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) é uma DLD caracterizada pelo acúmulo de glicocerebrosídeo, um composto intermediário no catabolismo glicolipídico. Este acúmulo é causado pela deficiência da enzima β -glicocerebrosidase (E.C. 3.2.1.45 ou β -glicosidase), uma glicoproteína ácida, ou, em casos raros, pela deficiência do ativador dessa enzima, a saposina C (SAP-C) (19). A DG é herdada de forma autossômica recessiva e é uma doença muito comum em judeus Ashkenazi.

A manifestação clínica mais comum da

doença é a esplenomegalia, acompanhada ou não de hepatomegalia. A DG pode ser subdividida em 3 tipos clínicos, que se diferenciam basicamente pelo envolvimento neurológico e progressão da doença. O Tipo 1, o mais comum dos três, se diferencia do Tipo 2 e do Tipo 3 pela deficiência de envolvimento do sistema nervoso central. O Tipo 2, a forma neuropática aguda da doença, apresenta manifestações precoces com severo envolvimento do sistema nervoso central, podendo levar à morte nos primeiros 2 anos de vida. Os pacientes com Tipo 3, forma neuropática subaguda, apresentam sintomas neurológicos com início mais tardio e de forma mais crônica do que os pacientes do Tipo 2 (19).

O gene da β -glicocerebrosidase (GBA) se localiza no braço longo do cromossomo 1 (região q21) e abrange aproximadamente 7 kb de DNA genômico, dividido em 11 exons (20) que codifica uma proteína com 497 aminoácidos. Um pseudogene que apresenta alto grau de homologia ao gene funcional se localiza a 16 kb a partir do final deste gene. Mutações no gene funcional, na sua maioria mutações *missense*, promovem a síntese de uma proteína com atividade deficiente, comprometendo ações catalíticas e/ou a estabilidade da enzima.

Mais de 100 mutações já foram identificadas e descritas no gene GBA (21), e 3 mutações apresentam uma frequência elevada na população. A mutação mais comum em judeus Ashkenazi é uma transição de adenina por guanina no exon 9 do gene GBA, que determina a substituição do aminoácido asparagina por serina no resíduo 370 da proteína (N370S). Esta mutação está associada com a forma branda da doença; pacientes homozigotos para a mesma geralmente apresentam DG Tipo 1 (21). Uma inserção de guanina no nucleotídeo 84 (ins84G) do cDNA é a segunda mutação mais freqüente em judeus, e ocasiona uma mudança no quadro de leitura da proteína (*frameshift*) antes da extremidade amino-terminal da proteína madura; desta forma o alelo mutante não produz a enzima. Uma transição de timina para citosina no exon 10 do gene GBA, que produz uma substituição de leucina por prolina no aminoácido 444 (L444P) da proteína madura, é encontrada com relativa frequência em pacientes com DG não-judeus. Esta mutação compromete a estrutura e a cinética da proteína, estando relacionada com a forma grave da doença.

Homozigotos para a mutação L444P apresentam o Tipo 1 ou Tipo 2 da doença (21).

Uma característica importante observada em pacientes com a DG é a ocorrência de alelos mutantes complexos, isto é, alelos que apresentam mais de uma mutação de ponto. Os mesmos são possivelmente gerados por *crossing over* desigual entre o gene GBA e seu pseudogene ou por eventos de conversão do gene (22). Um dos alelos mais prevalentes é o chamado *RecNcil*, que apresenta uma frequência maior na população em geral do que na população judaica, onde é raro. Este alelo compreende as mutações L444P, a mutação A456P e a mutação silenciosa V460V (23).

A partir das informações acima, a análise molecular de um paciente com DG previamente diagnosticado através da análise bioquímica no Laboratório de Genética Molecular segue a seguinte rotina laboratorial:

1. detecção das mutações N370S, L444P e c1263del55, utilizando PCR seguido por digestão com endonucleases de restrição ou PCR utilizando *primers ACRS (Amplification Created Restriction Site)* e posterior digestão com endonucleases de restrição ou *nested PCR* (duas reações de amplificação seqüenciais), dependendo da mutação a ser pesquisada;
2. detecção das mutações INS84G, IVS2+1g>a, D409H, A459P e R463C, utilizando protocolos similares aos citados acima.

Esta forma de detecção de mutações é capaz de determinar o genótipo da maioria dos pacientes, independente da etnia dos mesmos, e diferenciar a existência ou não de alelos complexos no gene GBA mutante.

Um estudo molecular em pacientes com DG provenientes de vários estados do Brasil encontra-se em andamento e os resultados preliminares indicam que as mutações mais frequentes no país são a N370S e a L444P, responsáveis por pelo menos 50% dos alelos mutantes na população brasileira.

Leucodistrofia metacromática e pseudodeficiência de arilsulfatase A

Leucodistrofia metacromática (MLD) é uma doença autossômica recessiva, em que a degradação do cerebrosídeo sulfato está deficiente. Este glicolípido sulfatado pode ser encontrado principalmente na mielina do sistema nervoso central e periférico, ocasionando uma

evidente desmielinização nestes tecidos. O início da doença, assim como sua severidade, é variável, podendo ser dividida em três formas clínicas distintas: a forma infantil, a forma juvenil e a forma adulta (24).

A degradação do cerebrosídeo sulfato é iniciada pela sua dessulfatação, a qual ocorre pela ação combinada de uma hidrolase, arilsulfatase A (ASA, EC 3.1.6.8), e por uma proteína ativadora não enzimática, a saposina B (SAP-B). A deficiência de ASA ou, mais raramente, da SAP-B causam MLD (24).

A ASA é uma glicoproteína ácida encontrada em diversos tecidos do corpo (24). O gene da ASA em humanos está localizado no braço longo do cromossomo 22 (região q13). O cDNA da ASA foi clonado e seqüenciado em 1989 (25) e o mesmo inclui 1521pb, codificando uma proteína de 507 aminoácidos, com 3 potenciais sítios de glicosilação, 2 no exon 3 e 1 no exon 6 (26). A estrutura do gene da ASA foi determinada por Kreysing et al. (27), e engloba aproximadamente 3,2 Kb do DNA genômico, dividido em 8 exons (27).

Até o momento, mais de 60 mutações foram identificadas no gene da ASA e associadas com MLD. Entretanto, 2 destas mutações apresentam uma frequência relativamente maior quando comparada com as outras mutações descritas. A primeira é causada por uma transição de G→A, que destrói o sítio de *splicing* no final do exon 2 (459+1G→A); a outra mutação é uma transição de C→T que irá causar uma substituição de prolina por leucina na posição 426 da proteína (P426L) (28).

Originalmente, a deficiência de ASA em humanos foi associada somente com MLD. A atividade da enzima pode ser medida por um ensaio laboratorial *in vitro*. Entretanto, através de ensaios enzimáticos, ficou comprovado que indivíduos clinicamente normais podem apresentar uma deficiência da atividade de ASA, condição denominada de pseudodeficiência de ASA (PD-ASA) (29).

A PD-ASA é uma situação benigna onde os indivíduos podem apresentar em torno de 5 a 15% da atividade normal da enzima, o que parece ser suficiente para evitar as manifestações da doença. Esta situação se origina da presença de 2 alterações moleculares no gene da ASA, onde ocorre troca das bases adenina (A) por guanina (G) em

pontos distintos do gene em questão, sendo denominadas N350S e 1524+95A→G (26).

A importância clínica do alelo para PD-ASA origina-se de sua alta frequência na população em geral, estabelecida em 7,3% na população alemã (30), 9,6% na população australiana (31), 12,7% na população espanhola (32), 12,3% na população britânica (33) e 7,9% na população do sul do Brasil (34).

Portanto, o diagnóstico de MLD pode ser dificultado pelo fato que a deficiência de ASA não comprova um caso de MLD e que a atividade normal de ASA não exclui MLD. A avaliação laboratorial deve ser acompanhada, sempre que possível, pelos dados clínicos do paciente. Entretanto, casos de diagnóstico pré-natal impossibilitam a avaliação clínica e prejudicam o diagnóstico apenas através da avaliação bioquímica. Desta forma, a análise molecular em casos de deficiência enzimática de ASA é essencial para a diferenciar um caso de MLD de indivíduos com ASA-PD.

Baseado nas informações acima, o protocolo utilizado para a análise molecular de pacientes ou indivíduos com baixa atividade de ASA inclui a detecção das 2 mutações mais frequentes em pacientes com MLD (459+1G→A e P426L) e a detecção das 2 alterações associadas à ASA-PD (N350S e 1524+95A→G).

Doenças neurodegenerativas

Ataxia de Friedreich

A ataxia de Friedreich (FRDA) é a doença mais comum entre as ataxias autossômicas recessivas, apresentando uma frequência que varia de 1:50.000 a 2:50.000 na população em geral. Em 1996, o gene FRDA foi clonado e caracterizado. O gene, chamado de X25, se localiza no cromossomo 9q13 e codifica uma proteína (frataxina) de 210 aminoácidos. A mutação predominantemente causadora da ataxia de Friedreich é a instabilidade de um trinucleotídeo GAA repetitivo localizado no intron 1 do gene X25, sendo responsável por até 98% dos cromossomos FRDA. Este trinucleotídeo está presente de 7 a 22 vezes em indivíduos normais. Nos pacientes, entretanto, apresenta-se aumentado de 200 a 900 vezes. Esta expansão resulta em uma expressão diminuída da proteína e é meiotica e mitoticamente instável. Poucos heterozigotos compostos para uma

expansão mais uma mutação de ponto têm sido relatados. O objetivo do trabalho desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre é realizar o diagnóstico molecular da ataxia de Friedreich.

A estratégia utilizada é a amplificação por PCR da região do intron 1 do gene X25 contendo as repetições GAA. Os *primers* e condições usados para análise estão descritos em Filla et al. (35), originando produtos de 500+3n pares de base (n = número de repetições GAA). Estes fragmentos foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, onde o tamanho do PCR era estimado por comparação com um marcador de peso molecular de 1kb. Até o momento foram analisados 42 pacientes, na maioria encaminhados por geneticistas clínicos do Serviço de Genética Médica do HCPA com uma suspeita inicial de ataxia recessiva. Dos 42 pacientes encaminhados, 11 tiveram um resultado molecular positivo, ou seja, apresentaram um número aumentado de repetições GAA. Destes, 4 (36%) foram homozigotos (com repetições que variaram de 416 a 832) e 6 (55%) foram heterozigotos compostos para um número diferente de repetições em cada um dos alelos. Estas repetições variaram em número de 245 a 1.203. Todos os controles simultâneos utilizados tiveram um número de repetições normal, que variou de 2 a 29 repetições, sendo que em um controle heterozigoto observou-se 44 e 58 repetições em cada cromossomo respectivamente. Para um dos pacientes negativo para a análise de expansões foi realizada a análise da vitamina E através da dosagem de α -tocoferol, confirmando a hipótese diagnóstica. Em um estudo realizado em Portugal, todos os 12 casos e índices analisados (100%) eram homozigotos para expansões de GAA. Sugerimos que este fato deve ser decorrente da técnica utilizada para análise, onde a separação dos 2 cromossomos contendo as expansões é de difícil visualização e requer adaptações da amplificação de fragmentos muito longos e das condições de eletroforese utilizadas. A técnica empregada mostrou ser adequada para o diagnóstico da ataxia de Friedreich, além de permitir uma identificação correta de 2 cromossomos contendo expansões de tamanhos diferentes. Nos casos onde foi observada homozigose para um número alterado de expansões, é possível ainda que as mesmas difiram somente em

poucas repetições, sendo que esta diferença não seria visível em gel de agarose. Diferenças de 7 repetições (equivalentes a 21 pb) puderam ser detectadas com a técnica empregada neste trabalho. Como apenas 28% dos pacientes encaminhados apresentaram alterações que confirmaram a suspeita clínica inicial, sugere-se que seja definido um protocolo clínico mais focalizado, uma vez que os sintomas desta doença são bastante característicos. Nos casos negativos e persistindo a suspeita clínica deve-se considerar outras prováveis causas, tais como deficiência de vitamina E e mutações de ponto no gene X25.

Doença de Machado-Joseph

As ataxias espinocerebelares (SCAs) são um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas fatais que causam incoordenação generalizada, afetando principalmente o andar, a fala e a deglutição. As SCAs geralmente se manifestam na vida adulta e apresentam grande heterogeneidade clínica e evolução lenta e progressiva. Essas doenças são caracterizadas por degeneração progressiva, afetando o cerebelo e o trato espinocerebelar em graus variáveis. Até o momento, foram caracterizadas 10 *locus* distintos das SCAs, sendo que 7 delas são comprovadamente causadas por uma expansão trinucleotídica (36).

Dentro deste grupo, a doença de Machado-Joseph (MJD) ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3) é a mais freqüente. Suas principais manifestações clínicas são a ataxia da marcha, disartria, distonia, oftalmoplegia, hiperreflexia e disfagia (37). A MJD foi inicialmente observada em famílias de origem portuguesa do arquipélago dos Açores (incidência de 1:4000 nos Açores), mas posteriormente foram descritos pacientes sem nenhuma ascendência portuguesa.

Baseado na expressão clínica variável, Coutinho & Andrade (38) propuseram uma subdivisão para a MJD em 3 subtipos, que se diferenciam pela idade de início, pelos sinais clínicos e pela progressão da doença (37,39).

Em 1993, Takiyama et al. (40) mapearam e localizaram o gene responsável pela MJD no braço longo do cromossomo 14 (14q24.3-q32.1) e o gene identificado no ano seguinte por Kawaguchi et al. (41). Esse gene se caracteriza pela presença de repetições do trinucleotídeo CAG na porção carbóxi-terminal da proteína. A

análise das variações de tamanho desta expansão em indivíduos normais e em portadores de MJD permitiu concluir que uma expansão desta região hipervariável, que codifica uma seqüência poliglutamínica, é a base molecular da doença. Indivíduos normais apresentam entre 12 a 41 repetições, enquanto indivíduos afetados possuem entre 62 a 84 repetições (36,41). O tamanho da expansão CAG no gene da MJD está inversamente relacionado com a idade de início da doença e sua gravidade, porém o tamanho da repetição isoladamente não pode ser usado para prever a idade de início da doença (39,42).

A instabilidade intergeracional das expansões associadas à doença vem sendo investigada para explicar a ocorrência de antecipação observada nas famílias em risco. Estes estudos exploram a possibilidade de interação entre os alelos (normal e mutante) e a presença de regiões polimórficas intragênicas (43).

Um estudo realizado em pacientes do Rio Grande do Sul indica que a MJD é a SCA mais freqüente no nosso estado, totalizando 81% dos casos analisados e 92% das famílias com uma ataxia dominante (44). Além disso, os pacientes estudados foram caracterizados quanto às manifestações clínicas e quanto à alteração molecular apresentada pelos mesmos (45,46).

Antes da caracterização molecular da doença, o diagnóstico de MJD baseava-se apenas no fenótipo apresentado pelo paciente, levando, muitas vezes, a um diagnóstico tardio e tornando mais difícil o aconselhamento genético de famílias em risco. A partir do conhecimento da alteração molecular responsável pela doença, tornou-se prioritária a implementação de protocolos de investigação laboratoriais para a mesma, os quais proporcionam a detecção da presença de expansões do trinucleotídeo CAG no gene da MJD, contribuindo para o diagnóstico precoce dos doentes, ajudando no aconselhamento genético das famílias em risco e, quando indicado, proporcionando o diagnóstico de casos pré-sintomáticos.

Atualmente, todos os casos que apresentam suspeita clínica de uma ataxia dominante são encaminhados para a realização do diagnóstico molecular de MJD no nosso laboratório, através da detecção da presença ou não de uma expansão no gene MJD1. Em breve,

estaremos também disponibilizando a detecção molecular de outras SCAs.

Outras doenças genéticas

Fenilcetonúria

As hiperfenilalaninemias são doenças caracterizadas por um distúrbio na hidroxilação da fenilalanina, que resulta em níveis elevados deste aminoácido nos tecidos e no plasma dos pacientes. A fenilcetonúria (PKU) é uma das doenças deste grupo e é herdada de forma autossômica recessiva (47). O defeito básico na PKU é a deficiência hepática da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (E.C. 1.14.16.1). A frequência desta doença é bastante variável de acordo com a população analisada; mas, de uma maneira geral, a mesma é estimada em 1 caso em cada dez mil nascimentos em caucasianos (48), o que corresponde a uma incidência de portadores de 1 em cada 50 indivíduos.

A PKU se caracteriza pelo acúmulo de fenilalanina no plasma e por distúrbios no metabolismo de aminoácidos aromáticos (47). Os sintomas envolvem lesões na pele, deficiência de pigmentação e, principalmente, alterações neurológicas. As principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são crises convulsivas, distúrbio de comportamento, retardo mental e hipertonicidade muscular, em alguns casos acompanhada de tremores.

A anormalidade bioquímica na PKU é a deficiência de oxidação de fenilalanina em tirosina, reação catalisada pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) e que requer a presença de tetrahydrobiopterina como co-fator. Essa reação é o passo limitante no catabolismo que conduz até a oxidação completa de fenilalanina a CO₂ e água. Além disso, a oxidação da fenilalanina é o sistema normal de produção endógena do aminoácido tirosina, que se transforma em um aminoácido essencial no momento que esta reação metabólica pára de funcionar (47).

O locus do gene da PAH foi localizado no cromossomo 12 na região q22-q24,1 (49). O gene da PAH compreende 90 kb de DNA genômico e está dividido em 13 exons, que codificam um mRNA de aproximadamente 2,4 kb (50).

Até julho de 2000, foram registradas no banco de dados de alterações no gene da PAH

(*PAHdb*) 417 variações no gene, sendo a maioria alterações patogênicas (51). A frequência e distribuição destas mutações variam nas populações, sendo que poucas são encontradas com maior frequência na população em geral (independentemente da origem do indivíduo).

A frequência das mutações em pacientes com PKU que se encontram em tratamento no Serviço de Genética Médica do HCPA foi analisada recentemente e foi determinado que as seguintes mutações são as mais frequentes nesta amostra analisada: a I65T (18,2%), a R261X (9,1%), a R408W (9,1%), a IVS2nt5g>c (7,3%), a R261Q (7,3%) e a V388M (7,3%) (52). Este estudo propiciou o estabelecimento do protocolo básico de investigação molecular de pacientes com PKU enviados ao Laboratório de Genética Molecular. Este protocolo abrange a detecção das mutações I65T, R261X, R261Q, R408W e V388M nos pacientes que tenham avaliação bioquímica prévia compatível com deficiência de PAH.

Fibrose cística

A Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em caucasianos, com uma incidência estimada em 1 caso em cada 2 mil a 3 mil nascimentos, dependendo da população (53). A doença se caracteriza por infecções crônicas do trato respiratório, insuficiência pancreática e concentrações elevadas de eletrólitos no suor.

A patologia da FC afeta o epitélio de diversos órgãos, como o trato respiratório, o trato gastro-intestinal, o pâncreas, o trato gênito-urinário e as glândulas sudoríparas (53). Infecções recorrentes e persistentes das vias aéreas, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, causam bronquites e falha respiratória, que a longo prazo podem causar a morte do paciente (53). Insuficiência pancreática exócrina está presente na maioria dos pacientes com FC e a deficiência da secreção da enzima pancreática causa má-absorção de gorduras (esteatorréia) e deficiente ganho de peso. Íleo meconial ao nascimento é frequentemente diagnóstico da doença. O envolvimento do trato gênito-urinário se caracteriza por alterações estruturais nos ductos e se reflete pela falha da função reprodutiva, principalmente em pacientes do sexo masculino. A alteração funcional mais consistente em FC é

a presença de concentrações elevadas de cloreto, sódio e potássio no suor, e estes parâmetros são utilizados como teste diagnóstico para esta doença. Essa alteração é causada primariamente pela impermeabilidade de cloreto nos ductos das glândulas sudoríparas (53).

O gene da FC se localiza no cromossomo 7q31,2 e a proteína codificada por este gene foi denominada *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR). O CFTR abrange 250 kb de DNA genômico e a sua região codificante está dividida em 27 exons (54-56). O mRNA produzido tem 6,5 kb e, considerando a seqüência do cDNA do CFTR, a estrutura da proteína é composta por 1.480 aminoácidos.

Mais de 800 mutações no gene CFTR foram identificadas pelos membros do Comitê Internacional de Análise Genética da Fibrose Cística. A mutação mais freqüente associada à FC é causada por uma deleção de 3 bp no 10º exon com a perda de fenilalanina na posição 508 da proteína (56), denominada deltaF508. Um estudo realizado em uma amostra de pacientes em tratamento no Serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre mostrou que essa mutação é responsável por 48,7% dos genes mutantes causadores de FC (51). Apenas 4 outras mutações apresentam uma freqüência acima de 1% na população mundial. Baseado neste sistema, ótimos testes diagnósticos foram desenvolvidos para a identificação das mutações $\Delta F508$, G542X, G551D e 621+1G \rightarrow T, freqüentes na população britânica.

A freqüência da DF508 foi estimada, em média, em 47% na população caucasóide brasileira, mas diferentes freqüências foram observadas entre as diferentes regiões estudadas (58).

Síndrome do X-frágil

A síndrome do X-frágil é a forma mais comum de retardo mental hereditário em homens (aproximadamente 1:1.250). A principal mutação responsável por esta síndrome consiste de um número aumentado de repetições instáveis de trinucleotídeos (CGG), sendo que estas expansões estão localizadas num "sítio frágil" denominado FRAXA, na região 5' não traduzida do gene FMR-1, localizado no braço longo do cromossomo X (Xq27.3). Como consequência desta alteração, não existe formação do produto, o que pode ser causado por uma metilação

anormal da região contendo a repetição (59).

Indivíduos afetados são portadores de mais de 200 cópias destes trinucleotídeos, ao invés do normal que seria de 2-50 cópias. O tamanho destas repetições CGG pode aumentar de uma geração para a próxima e o número de repetições pode ser demonstrado pela técnica do *Southern blotting* como fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (60). Uma pré-mutação aparece como um fragmento um pouco maior que o normal e a mutação plena aparece como fragmentos bem maiores. Com este procedimento, um diagnóstico genotípico confiável é possível.

Mais recentemente, um outro "sítio frágil", denominado FRAXE, foi identificado e está localizado na mesma região do cromossomo X, porém distal àquele encontrado no FRAXA. Neste caso, uma repetição GCC contendo mais de 200 cópias está presente em indivíduos afetados, ao invés das 6-25 repetições encontradas em sujeitos normais.

Como a técnica do *Southern blotting* é relativamente cara e trabalhosa, outras técnicas de triagem também foram desenvolvidas, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que flanqueiam as regiões suscetíveis à mutação. Para ambos, os loci FRAXA e FRAXE e análise dos produtos em gel de agarose e/ou poliacrilamida. Além destes, *primers* específicos para análise de metilação no gene FMR-1 também podem ser usados para confirmar os achados anteriores obtidos por PCR (59). Entretanto, esta técnica pode ser aplicada apenas aos pacientes do sexo masculino e não identifica as pré-mutações. A realização do *Southern blotting* é necessária para identificar o tamanho das expansões nos casos positivos de triagem e para a identificação dos portadores de pré-mutações.

Deficiência de alfa-1-antitripsina

A α_1 -antitripsina (α_1 AT) é o principal inibidor de proteases presente no plasma. Existem mais de 75 formas desta proteína que se diferenciam pelo seu ponto isoelétrico. A maioria destes alelos condicionam uma redução nos níveis de α_1 AT, sendo o mais comum o Pi*Z. As principais complicações associadas ao alelo Pi*Z são doença pulmonar obstrutiva crônica e doença hepática. Uma parcela dos portadores do alelo Pi*Z apresenta icterícia colestática e cirrose. A forma Z apresenta um defeito de secreção que

leva à deficiência de α_1 AT e à formação de inclusões nos hepatócitos dos indivíduos afetados. O gene que codifica a proteína está localizado no braço longo do cromossomo 14, na região 14q32.1, possuindo 12,2Kb, divididos em 7 exons (61). Na prática clínica, as doenças hepáticas têm sido associadas aos genótipos PiZZ, PiSZ e PiZ(*null*). O alelo Pi*Z é a variante deficiente mais comum. Pacientes Pi ZZ possuem de 10 a 15% da quantidade normal de α_1 AT funcionalmente ativa. Pacientes homocigotos para este alelo possuem uma predisposição maior ao desenvolvimento de hepatopatia. Também há uma relação entre doença hepática crônica e presença do alelo Z em heterocigose.

O alelo Pi*Z resulta de uma substituição da glutamina da posição 342 por uma lisina (Glu³⁴²→Lys) no exon V da sequência codificante da α_1 -antitripsina (63). A determinação do alelo Pi*Z utiliza a técnica de PCR com amplificação do exon V do gene da alfa-1-antitripsina e detecção da mutação E342K baseada na técnica de Andresen et al. (64) modificada, utilizando *primers* ACRS (*Amplification Created restriction site*) e posterior digestão com enzima de restrição visualizada através de gel de poliácridamida e coloração com brometo de etídio.

Através desta técnica não é possível determinar o genótipo dos indivíduos (a menos que o mesmo seja homocigoto), apenas a presença do alelo Z, sendo que o outro alelo pode ser qualquer outro dos cerca de 70 já descritos.

Lima et al. (65), a partir da análise de 29 pacientes de Porto Alegre, encontraram 7 alelos alterados em 58 analisados, o que leva a uma frequência de 12,06% para o alelo Pi*Z. Neste mesmo trabalho também foram analisados 100 controles para a determinação da frequência do alelo Pi*Z na população de Porto Alegre. Foi encontrado apenas um indivíduo heterocigoto entre os 100 analisados, resultando em uma frequência de 0,50%. Esse valor é um pouco menor do que o encontrado em outras populações etnicamente relacionadas, porém não chega a ser estatisticamente significante.

Conclusões

O diagnóstico baseado em análise do DNA é o único teste definitivo para determinar o estado portador de familiares de pacientes portadores

de Doenças Lisossômicas de Depósito. Entretanto, para que esta estratégia seja utilizada, é indispensável o diagnóstico enzimático inicial e o conhecimento da mutação causadora da doença no paciente afetado. Nem sempre a relação do quadro clínico (fenótipo) do paciente com as informações genéticas (genótipo) é direta e conclusiva. Nestes casos, é necessária a análise individual de cada caso e de cada mutação, principalmente no caso de mutações únicas para cada família.

Referências

1. Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, et al. Chromosomal localization of the human α -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet* 1990;47:802-7.
2. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, Nelson PV, Clements PR, Morris CP, et al. Human α -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9695-9.
3. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mut* 1995;6:288.
4. Aronovich EL, Pan D, Whitley CB. Molecular Genetic Defect Underlying α -L-iduronidase Pseudodeficiency. *Am J Hum Genet* 1996;58:75-85.
5. Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz IVD, Giugliani R. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *Am J Med Genet* 2000;90(2):108-9.
6. Bach G, Eisenberg F, Cantz M, Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2134-8.
7. Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome: Differences between the mild and severe forms. *J Med Genet* 1982;19:408-11.
8. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.3421-52.
9. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhidoro T, Bielicki J, Clements PR, et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone

- and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 8531-5.
10. Flomen RH, Grenn EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F. Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:5-10.
 11. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 1993;17:773-5.
 12. Bondeson M-L, Malmgren H, Dahl N, Carlberg B-M, Petterson U. The presence of an IDS-related locus (IDS-2) in Xq28 complicates the mutational analysis of the Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet* 1995;3:219-27.
 13. Leistner S. Molecular genetics of Hunter disease and the pseudodeficiency of arylsulphatase A [tese]. London (UK): University College London; 1996.
 14. Scherer L. Estudos bioquímicos, genéticos e moleculares na MPS II. [dissertação]. Porto Alegre (RS); 2000.
 15. Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zuhlssdorf M, Vingron M, et al., Phylogenetic conservation of arylsulphatases. cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem* 1990;265:3374-81.
 16. Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ. Human arylsulphatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulphatases A and C. *Genomics* 1990;6:149-58.
 17. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher Disease. In: Scriver CR, Beaud, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-65.
 18. Petry M. 2000 (comunicação pessoal).
 19. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaud Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-65.
 20. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics* 1989;4:87-96.
 21. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type I and type III Gaucher disease. *Am J Med Genet* 2000;66:1777-86.
 22. Zimran A, Horowitz M. Rect 1 – A complex allele of the glucocerebrosidase gene associated with a mild clinical course of Gaucher disease. *Am J Med Genet* 1994;50:74-8.
 23. Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, et al. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNcil mutation. *Am J Med Genet* 1998;80:343-51.
 24. von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3695-3724.
 25. Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, et al. Cloning and expression of human arylsulphatase A. *J Biol Chem* 1989;264:1252-9.
 26. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K. Arylsulphatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989;86:9436-40.
 27. Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V. The structure of the arylsulphatase A gene. *Eur J Biochem* 1990;191:627-31.
 28. Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V. A single origin for the most frequent mutation causing late infantile metachromatic leukodystrophy. *J Med Genet* 1991;324:28.
 29. Dubois G, Turpin JC, Baumann N. Absence of ASA activity in the healthy father of a patient with metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med* 1975;293:302.
 30. Hohenschutz C, Eich P, Friedl W, Waheed A, Conzelmann E, Propping P. Pseudodeficiency of arylsulphatase A: a common genetic polymorphism with possible disease implications. *Hum Genet* 1989;82:45-8.
 31. Nelson PV, Carey WF, Morris CP. Population frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele. *Hum Genet* 1991;87:87-8.
 32. Chabas A, Castellvi S, Bayes M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu LI et al. Frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele in the Spanish population. *Clin Genet* 1993;44:320-3.
 33. Barth ML, Ward C, Harris A, Saad A, Fensom A. Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency-associated mutations in a healthy population. *J Med Genet* 1994;31:667-71.
 34. Pedron CG, Gaspar PA, Giugliani R, Pereira MLS.

- Arylsulphatase A pseudodeficiency in healthy Brazilian individuals. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:941-5.
35. Filla a, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Genet* 1996;59(3):554-60.
 36. Zoghbi HY, Orr HT. Spinocerebellar Ataxias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5741-58.
 37. Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding A, Deufel T, Cahmberlain S, editors. *Hereditary Ataxias*. *Adv. Neurol* 61. New York: Raven Press 1993. p. 139-53.
 38. Coutinho P, Andrade C Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 1978;28:703-9.
 39. Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, et al. CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995;57:54-61.
 40. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993;4:300-3.
 41. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994;8:221-8.
 42. Silveira I. Mapeamento cromossômico da doença de Machado-Joseph e heterogeneidade genética das ataxias dominantes [tese] Porto (Portugal): Universidade do Porto; 1997.
 43. Maciel P, Gaspar C, Guimarães L, Goto J, Lopes-Cendes I, Hayes S, et al. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet* 1999;7:147-56.
 44. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Moreira MC, et al. A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 49 families with Machado-Joseph disease or SCA7. *J Neurol* 2001a; in press.
 45. Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. *Acta Neurol Scan* 2001;104(4):224-31.
 46. Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurologic findings in Machado-Joseph disease – relation with disease duration, subtypes, and (CAG)_n. *Arch Neurol* 2001;58(6):899-904.
 47. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1667-1724.
 48. Bickel H, Bachmann C, Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *Eur J Pediatr* 1981;137:133-9.
 49. Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Woo SLC. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6221-5.
 50. DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J, Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1986;25:743-9.
<http://www.mcgill.ca/pahdb>
 51. Silva LCA. Identificação e caracterização molecular de mutações e polimorfismos no gene da fenilalanina hidroxilase em fenilcetonúricos do sul do Brasil [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
 52. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5121-80.
 53. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
 54. Riordan J R, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
 55. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
 56. Streit C. Análise de mutações em pacientes com Fibrose cística nascidos no sul do Brasil [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.

58. Raskin S, Philips III JA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. Cystic fibrosis in the Brazilian population: DF508 mutation and *KM-19 / XV-2C* haplotype distribution. *Hum Biol* 1997;69:499-508.
59. Warren ST, Scherman SL. The Fragile X Syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1257-89.
60. Eichler EE, Holden JA, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, et al. Length of the uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet* 1994;8:88-94.
61. Cox DW. α -1-Antitrypsin deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7 ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 2465-87.
62. Chuan G. Alpha-1-antitrypsin deficiency. In: Altschuler SM, Liacouras CA, editors. *Clinical Pediatric Gastroenterology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1998.
63. Gregersen N, Winter V, Petersen KB, Koch J, Kolvraa S, Rudiger N, et al. Detection of point mutations in amplified single copy genes by biotin-labelled oligonucleotides: diagnosis of variants of alpha-1-antitrypsin. *Clinica Chimica Acta* 1989;182:151-64.
64. Andresen BS, Knudsen I, Jensen PKA, Rasmussen K, Gregersen N. Two novel nonradioactive polymerase chain reaction-based assays of dried blood spots, genomic DNA, or whole cells for fast, reliable detection of Z and S mutations in the antitrypsin gene. *Clinical Chemistry* 1992;38(10):2100-7.
65. Lima LC, Matte U, Leistner S, Giugliani R, Silveira TR. Molecular analysis of the Pi*Z allele in patients with liver disease. *Am J Med Genet* 2001;104(4):287-90.