

A Base Molecular e Bioquímica das Doenças Genéticas

O exame da base molecular e bioquímica das doenças genéticas começou no capítulo anterior, com as hemoglobinopatias, e neste capítulo se estenderá a outras proteínas e suas doenças correspondentes. No Cap. 11, apresentamos uma visão geral dos mecanismos pelos quais as mutações que causam doenças ocasionam patologias (ver Fig. 11.1) e revisamos as etapas nas quais as mutações podem perturbar a síntese ou o funcionamento de uma proteína (ver Quadro 11.1). Este panorama nos dá uma infra-estrutura para compreender a patogenia de todas as doenças genéticas. Embora as hemoglobinopatias tenham ensinado muito aos geneticistas sobre os mecanismos subjacentes às doenças genéticas, existem muitos outros processos moleculares e bioquímicos que precisam ser considerados. As mutações em outras classes de proteínas em geral perturbam o funcionamento celular e orgânico por processos que diferem dos ilustrados pelas hemoglobinopatias.

Neste capítulo, ampliaremos a descrição dos mecanismos gerais pelos quais as mutações prejudicam a síntese, o processamento ou as associações moleculares das proteínas, e os consequentes efeitos no funcionamento das proteínas. As relações entre um defeito molecular e a localização e a natureza de sua patologia clínica também serão examinadas. Para ilustrar os mecanismos das doenças, na maioria dos casos usamos doenças bem conhecidas, tais como a **fenilcetonúria (PKU)**, a **fibrose cística (CF)**, a **hipercolesterolemia familiar**, a **distrofia muscular Duchenne (DMD)** e a **doença de Alzheimer (AD)**. Em alguns casos, distúrbios menos comuns, tais como a **porfiria intermitente aguda** e a **doença da célula I**, são incluídos, pois demonstram melhor um princípio específico.

A importância de ensinar genética médica a partir de princípios gerais é ilustrada pelo fato de que mais de 1.000 genes associados a distúrbios monogênicos já foram identificados. Seria impossível lembrar a patologia molecular e a fisiopatologia de cada condição ou mesmo de cada categoria bioquímica de doença. Além disso, existem pelo menos 3.000 outras doenças monogênicas nas quais o defeito bioquímico ainda está por ser identificado, e dos 30.000 a 50.000 genes no genoma, muitos dos quais serão identificados nas próximas décadas, vários estão implicados em condições geneticamente determinadas.

DOENÇAS DEVIDAS A MUTAÇÕES EM CLASSES DIFERENTES DE PROTEÍNAS

As proteínas desempenham um grande número de funções diferentes, algumas das quais são apresentadas no Quadro 12.1 com suas doenças genéticas associadas. Como sugere a lista, as mutações em todas as classes funcionais de proteínas podem levar a um distúrbio genético. O reconhecimento de que uma doença resulta de anomalia em uma proteína de uma determinada classe em geral é útil na compreensão de sua patogenia e herança, bem como na determinação da terapia. Nesta seção, descreveremos doenças genéticas importantes que afetam proteínas representativas de muitos dos grupos citados. Nem todas as doenças citadas no Quadro 12.1 serão revistas aqui. O leitor interessado poderá encontrar muitas informações sobre as doenças genéticas que são compreendidas no nível bioquímico nas referências citadas ao final do capítulo. O tratamento das doenças genéticas, incluindo o de muitas das condições descritas neste capítulo, será apresentado no Cap. 13.

Proteínas de Manutenção, Proteínas Especiais e Doenças Genéticas

As proteínas podem ser separadas em duas classes gerais com base em seu padrão de expressão: **proteínas de manutenção**, que estão presentes em absolutamente todas as células e têm papéis fundamentais na manutenção da estrutura e da função celular, e **proteínas especiais** histoespecíficas, que são produzidas em apenas um tipo celular ou em um número limitado de tipos celulares. Elas têm funções únicas, que contribuem para a individualidade das células nas quais são expressas. Esta classe de distinção não é necessariamente absoluta. Uma proteína com um papel de manutenção na maioria das células pode estar presente em um nível mais alto em alguns tecidos nos quais tem uma função mais especializada. A maioria dos tecidos em eucariontes superiores, tais como humanos, expressa de 10.000 a 15.000 genes. Até 90% das espécies de RNA mensageiro (mRNA) encontradas em um tecido também estão presentes em muitos outros tecidos e codificam proteínas compartilhadas de manutenção. Os 10% restantes codificam as proteínas especiais do tecido.

QUADRO 12-1

Alguns Exemplos de Classes de Proteínas Associadas a Doenças Monogênicas

Função	Exemplos de Proteínas Afetadas por Mutações (Doença)*	Herança	
Enzimas	Literalmente centenas, em todas as áreas do metabolismo, incluindo		
	<i>Aminoácidos</i>	• fenilalanina hidroxilase (PKU)	AR
	<i>Carboidratos</i>	• galactose-1-fosfato uridil transferase (galactosemia)	AR
	<i>Ácidos orgânicos</i>	• metilmalonil-CoA mutase (acidúria metilmalônica)	AR
	<i>Ácidos graxos</i>	• acil CoA desidrogenase de cadeia média (deficiência de MCAD)	AR
	<i>Lípideos complexos</i>	• hexosaminidase A (doença de Tay-Sachs)	AR
	<i>Purinas</i>	• adenosina desaminase (imunodeficiência combinada grave)	AR
<i>Porfirinas</i>	• porfobilinogênio desaminase (porfiria intermitente aguda)	AD	
Transporte e estocagem	<i>Entre órgãos</i>	• hemoglobina (as talassemias, variantes de hemoglobina)	AR
	<i>Membrana organelar</i>	• uma proteína de transporte de cistina lisossômica (cistinose)	AR
	<i>Transporte intracelular</i>	• uma proteína de transporte de cobre (síndrome de Menkes)	XR
	<i>Membrana epitelial</i>	• Cfr, um canal de Cl ⁻ no epitélio dos tecidos afetados na fibrose cística (p. ex., pulmão, pâncreas)	AR
Estrutura das células e dos órgãos	<i>Extracelular</i>	• tipos I e II de colágeno (osteogênese imperfeita)	AR, AD
	<i>Membrana celular e citoesqueleto</i>	• proteína do esqueleto da membrana das hemácias, espectrina (esferocitose hereditária)	AD
	<i>Biogênese organelar</i>	• distrofina (distrofia muscular Duchenne e Becker)	XR
Homeostasia extracelular	<i>Proteção imune</i>	• PEX1, uma ATPase necessária à biogênese da membrana peroxissômica (síndrome de Zellweger)	AR
	<i>Hemostasia</i>	• proteínas do sistema complemento (p. ex., deficiência do complemento C3 → infecções bacterianas recorrentes)	AD, AR
	<i>Inibição de protease</i>	• fator VIII (hemofilia A)	XR
Expressão gênica desenvolvimental	<i>Fatores de transcrição</i>	• α_1 -antitripsina (deficiência → doença pulmonar e hepática)	AR
	<i>Moléculas sinalizadoras</i>	• PAX6, um fator de homeodomínio de transcrição (aniridia)	AD
	<i>Receptores de sinalização</i>	• WT1, um fator de transcrição <i>zinc finger</i> (tumor de Wilms)	AD
	<i>Proteínas ribossômicas</i>	• <i>sonic hedgehog</i> (holoprosencefalia)	AD
Controle do desenvolvimento e da diferenciação	<i>Supressores tumorais</i>	• FGR3 receptor (acondroplasia)	AD
	<i>Oncogenes</i>	• proteína ribossomal S19 (anemia de Diamond-Blackfan)	AD
Metabolismo e comunicação intercelular	<i>Canais célula-célula</i>	• produto do gene Rb (retinoblastoma e osteossarcoma)	AR
		• receptor Ret de tirosina cinase (neoplasia endócrina múltipla ou MEN2)	AD
		• proteína conexina 43 de junções gap (malformações cardíacas, defeitos de lateralidade)	AR
		• proteína conexina 26 de junções gap (perda auditiva não-sindrômica)	AR
	<i>Receptores de metabólitos</i>	• receptor de lipoproteína de baixa densidade (hipercolesterolemia familiar)	AD
	<i>Receptores de luz</i>	• rodopsina (uma forma de retinite pigmentosa AD)	AD
		• opsinas de luz verde e vermelha (daltonismo ligado ao X)	XR
	<i>Hormônios</i>	• hormônio do crescimento (nanismo)	AR
		• insulina (forma rara de diabetes mellito tipo 2)	AD
	<i>Receptores hormonais</i>	• receptor de vasopressina V2 (diabetes insípido)	XR
	• receptor de andrógeno (insensibilidade androgênica)	XR	
	• receptor de insulina (síndrome de Donohue)	AR	
	• a proteína estimuladora de ligação do nucleotídeo guanina da adenilato ciclase (pseudo-hipoparatiroidismo)	AD	

*A classificação da proteína foi adaptada e modificada de Stryer L. (1981) *Biochemistry*, 2.^a ed. WH Freeman, San Francisco.
AD = herança autossômica dominante; AR = herança autossômica recessiva; XR = herança recessiva ligada ao X.

Conhecer os tecidos nos quais uma proteína é expressa, bem como os tecidos nos quais é expressa em níveis altos, em geral é útil na compreensão da patogenia de uma doença. Várias generalizações podem ser feitas sobre a correlação entre o local de expressão de uma proteína e o local da patologia.

Primeiro, uma mutação em uma proteína histoespecífica em geral produz uma doença restrita a este tecido, embora possam existir efeitos secundários em outros tecidos. Entretanto, a correlação entre o local no qual a proteína é expressa e o local da

patologia em uma doença genética, às vezes, pode ser imprevisível. Por exemplo, a mutação em uma proteína histoespecífica pode produzir suas anomalias clínicas primárias em células e órgãos que não aqueles em que a proteína é expressa. Ironicamente, o tecido que não tem a proteína mutante pode até não ser afetado pela patologia. Em consequência, não podemos necessariamente deduzir que a patologia em um órgão resulta de uma mutação em um gene expresso principalmente ou apenas neste órgão.

Segundo, embora as proteínas de manutenção sejam por definição expressas na maioria dos tecidos ou em todos eles, as doenças genéticas que afetam estas proteínas raramente causam patologia em cada tecido. (As mutações nos genes que são essenciais a todos os tecidos, tais como a actina, na maioria dos casos provavelmente são incompatíveis com o nascimento.) Os efeitos clínicos das mutações em uma proteína de manutenção com frequência são limitados a um ou a poucos tecidos, em geral tecidos nos quais a proteína é abundante e serve a uma função especial.

A Correlação entre Genótipo e Fenótipo na Doença Genética

A variação no fenótipo clínico observado em uma doença herdada pode ser devida a um dentre três tipos de variação genética: heterogeneidade alélica, heterogeneidade de locus ou o efeito de genes modificadores.

Heterogeneidade Alélica. Como foi discutido no Cap. 5, a heterogeneidade genética deve-se de modo mais comum à presença de alelos múltiplos em um locus, uma situação chamada de **heterogeneidade alélica** (Quadro 12.2). Em muitos casos, há uma clara correlação **genótipo-fenótipo** entre um alelo específico e um fenótipo específico. A explicação mais comum para o efeito da heterogeneidade alélica no fenótipo clínico é que os alelos que conferem mais *função residual* em geral estão associados a um fenótipo mais brando (p. ex., ver mais adiante a discussão dos alelos da fenilalanina hidroxilase). Em outros casos, os alelos que conferem alguma função residual a uma proteína estão associados a um fenótipo parcial de todo o espectro clínico associado a um alelo nulo. Esta situação ocorre em algumas variantes do gene *CFTR* associadas à ausência congênita de *vas deferens*, mas a nenhuma outra manifestação da CF (ver mais adiante).

Uma segunda explicação da variação baseada em alelos no fenótipo é que a variação fenotípica pode refletir uma *subfunção específica* da proteína mais prejudicada pela mutação. Nesta situação, alguns alelos podem estar associados a fenótipos clinicamente distintos. Estes pontos são bem ilustrados por alguns dos alelos de β -globina causadores de doença descritos no Cap. 11 (ver Quadro 11.1). Assim, os alelos de β -globina que alteram a afinidade com o oxigênio da hemoglo-

bina produzem policitemia ou cianose. Estes fenótipos específicos em geral são tão diferentes dos fenótipos associados a alelos de grave perda de função (p. ex., talassemia no caso das cadeias de globina) que não é óbvio, do ponto de vista clínico, que estas doenças resultem de mutações que afetam a mesma proteína.

Finalmente, deve-se notar que as conseqüências bioquímicas e clínicas de uma mutação específica em uma proteína em geral são imprevisíveis e podem ser únicas deste alelo. Por exemplo, não se poderia prever que o alelo mais comumente associado à deficiência de α_1 -antitripsina (α_1 -AT) (o alelo Z) iria causar doença hepática porque a mutação leva a proteína a formar agregados intracelulares nos hepatócitos (ver mais adiante).

Heterogeneidade de Locus. A heterogeneidade genética também surge da associação de mais de um locus com uma condição clínica específica, uma situação chamada **heterogeneidade de locus** (Quadro 12.2). Este fenômeno é ilustrado pela descoberta de que as mutações em qualquer um dos cinco genes pode levar à hiperfenilalaninemia (Quadro 12.3). Uma vez que a heterogeneidade de locus tenha sido documentada, a cuidadosa comparação do fenótipo associado a cada gene comumente revela que o fenótipo não é tão homogêneo como se pensava a princípio.

Genes Modificadores. Às vezes, mesmo a mais sólida correlação genótipo-fenótipo não é confirmada em um determinado paciente. Por exemplo, os pacientes com CF homocigotos para a mutação mais comum de CF têm doença pulmonar altamente variável, como será discutido mais adiante. Tal variação fenotípica pode, a princípio, ser atribuída a fatores ambientais ou à ação de outros genes, chamados de **genes modificadores**. Hoje em dia, alguns genes modificadores para distúrbios humanos monogênicos já foram identificados. Um exemplo é citado no final do Cap. 11: a melhora dos homocigotos para β -talassemia que também herdam um alelo de α -talassemia. Os genes modificadores apenas raramente serão alelos causadores de doença em outros loci. Com mais frequência, eles serão polimorfismos ou variantes benignas raras de algum modo modulam a gravidade da doença decorrente de mutações patogênicas em outro locus. O efeito modificador de alelos do gene de apolipoproteína E (*APOE*) sobre a idade de início da AD, revisto mais adiante, é um exemplo de destaque.

QUADRO 12-2

Vários Tipos de Heterogeneidade Associados a Doenças Genéticas

Tipo de Heterogeneidade	Definição	Exemplo
Heterogeneidade genética		
Heterogeneidade alélica	A ocorrência de mais de um alelo em um locus	<ul style="list-style-type: none"> Alelos de β-talassemia Mutações de fenilalanina hidroxilase
Heterogeneidade de locus	A associação de mais de um locus a um fenótipo clínico específico	<ul style="list-style-type: none"> Defeitos de bipterina causando hiperfenilalaninemia Síndrome de Sanfilippo
Heterogeneidade clínica ou fenotípica	A associação de mais de um fenótipo a mutações em um só locus	<ul style="list-style-type: none"> Mutações de fenilalanina hidroxilase causando PKU, PKU variante ou hiperfenilalaninemia não-PKU Mutações de α-iduronidase causando síndrome de Hurler ou síndrome de Scheie

PKU = Fenilcetonúria.

QUADRO 12-3

A Heterogeneidade de Locus das Hiperfenilalaninemias

Defeito Bioquímico	Incidência/10 ⁶ Nascimentos	Enzima Afetada	Localização Gênica	Herança	Tratamento
<i>Mutações na apoenzima fenilalanina hidroxilase</i>					
PKU clássica	5-350	PAH	12q24.1	AR	Dieta com pouca fenilalanina
PKU variante	PKU menos que clássica	PAH	12q24.1	AR	Dieta pobre em fenilalanina (menos restritiva que a necessária para tratar a PKU)
Hiperfenilalaninemia não-PKU	15-75	PAH	12q24.1	AR	Nenhum, ou dieta pobre em fenilalanina menos restritiva
<i>Mutações nos genes codificantes de enzimas do metabolismo de tetraidrobiopterina</i>					
Reciclagem bloqueada de BH ₄	1-2	PCD	10q22	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa
		DHPR	4p15.31	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa + ácido fólico
Síntese bloqueada de BH ₄	Rara	GTP-CH	14q22	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa + ácido fólico + doses farmacológicas de BH ₄
		6-PTS	11q22.3-23.3	AR	Como acima

5-HT = 5-hidroxitriptofano; 6-PTS = 6-piruviltetraidropterina sintase; BH₄ = tetraidrobiopterina; DHPR = diidropteridina redutase; GTP-CH = guanossina trifosfato cicloidrolase; PAH = fenilalanina hidroxilase; PCD = pterina 4- α -carbinolamina desidratase; PKU = fenilcetonúria.

DEFEITOS ENZIMÁTICOS

As enzimas são catalisadores biológicos que medeiam, com grande eficiência, a conversão de um substrato em um produto. Fora alguns ácidos ribonucleicos (RNAs) catalíticos envolvidos no processamento do RNA, as enzimas são proteínas. A diversidade de substratos nos quais as enzimas atuam é levemente sugerida no Quadro 12.1. A lista inclui apenas algumas enzimopatias importantes, que no momento chegam a centenas. Discutiremos primeiro um dos grupos mais conhecidos de erros hereditários do metabolismo, as hiperfenilalaninemias, que surgem da atividade deficiente da fenilalanina hidroxilase. Vários defeitos enzimáticos adicionais de significado serão, então, brevemente examinados. No resumo, as características gerais da fisiopatologia das enzimopatias são apresentadas.

Aminoacidopatias

AS HIPERFENILALANINEMIAS

As anomalias que levam a um aumento no nível sanguíneo de fenilalanina, mais notadamente a PKU, ilustram quase todos os princípios de genética bioquímica importantes para os defeitos enzimáticos. As causas bioquímicas da hiperfenilalaninemia são ilustradas na Fig. 12.1, e as principais características da doença associadas a mutações nos cinco loci de hiperfenilalaninemia são apresentadas no Quadro 12.2. Todas as anomalias genéticas do metabolismo da fenilalanina são decorrentes de mutações de perda de função no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (PAH) (Fig. 12.1) ou nos genes necessários para a síntese ou a reutilização de seu co-fator, a tetraidrobiopterina (BH₄). Assim, nestas últimas condições, a perda de função de PAH é uma *anomalia secundária* (como descrito no Quadro 11.1) de uma mutação em um gene codificante de um componente da via de biópterina.

Fenilcetonúria. A PKU clássica foi corretamente chamada de epítome dos erros hereditários do metabolismo. É um distúrbio autossômico recessivo do metabolismo da fenilalanina, resultante de mutações no gene codificante de PAH, a enzima que converte fenilalanina em tirosina (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). A descoberta da PKU por Følling, em 1934, marcou a primeira demonstração de um defeito genético como causa de retardo mental. Devido à sua incapacidade de degradar a fenilalanina, os pacientes com PKU acumulam este aminoácido nos líquidos corpóreos. A hiperfenilalaninemia prejudica o desenvolvimento do sistema nervoso central no início da lactância e interfere no funcionamento do cérebro maduro. Uma pequena fração da fenilalanina total é metabolizada por vias alternativas, produzindo quantidades aumentadas de ácido fenilpirúvico (um cetoácido e o composto responsável pelo nome da doença) e outros metabólitos secundários, que são excretados na urina. Ironicamente, embora o defeito enzimático já seja conhecido há décadas, o exato mecanismo neuropatológico pelo qual o aumento de fenilalanina danifica o cérebro ainda é desconhecido. O dano neurológico devido ao bloqueio metabólico na PKU clássica pode ser amplamente evitado por modificações na dieta que impedem o acúmulo de fenilalanina. O tratamento da PKU é um paradigma do tratamento de muitas doenças metabólicas cujo resultado pode ser melhorado evitando-se o acúmulo de um substrato enzimático e seus derivados. Este conceito será mais bem descrito no Cap. 13.

Triagem Neonatal. A triagem populacional dos neonatos para a PKU é feita de forma ampla. Ela é o protótipo das doenças genéticas para as quais a triagem de massa neonatal justifica-se (ver Cap. 20). O distúrbio é relativamente comum em algumas populações (até cerca de 1/2, 900 nativos). O tratamento, se iniciado bem cedo, é efetivo. Sem o tratamento, um grave retardo é inevitável. O teste de triagem é feito alguns dias após o nascimento. Uma gota de sangue é obtida do calcanhar, seca em um papel-filtro e mandada para um laboratório central para dosagem dos níveis sanguíneos de fenilalanina. No passado, as

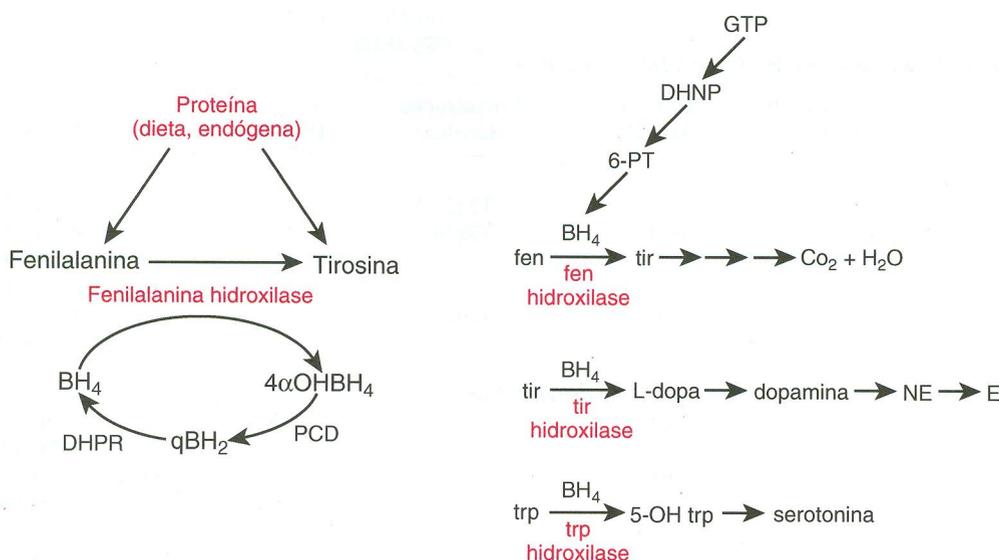


Fig. 12.1 As vias bioquímicas afetadas nas hiperfenilalaninemias. BH_4 = tetraidrobiopterina; qBH_2 = quinínóide diidrobioterina, o produto oxidado das reações de hidroxilação, que é reduzido a BH_4 pela diidropteridina redutase (DHPR); fen = fenilalanina; tir = tirosina; trp = triptofano; L-dopa = L-diidroxifenilalanina; NE = norepinefrina; E = epinefrina; 5-OH trp = 5-hidroxitriptofano; GTP = guanósina trifosfato; DHNP = diidroneopterina trifosfato; 6-PT = 6-piruviltetraidropterina; PCD = pterina 4- α -carbinolamina desidratase.

amostras eram coletadas antes que a criança deixasse o hospital. A tendência de uma hospitalização muito curta para as mães e os neonatos modificou esta prática. O teste é feito preferencialmente entre 3 e 4 dias de idade, porque o nível de fenilalanina na PKU aumenta em relação ao tempo após o nascimento na primeira semana de vida. Os testes positivos devem ser rapidamente confirmados, pois a demora além de 4 semanas pós-natais no início do tratamento tem efeitos profundos no resultado intelectual dos pacientes com PKU.

Variante de Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia Não-fenilcetonúria. Embora a PKU resulte de uma ausência absoluta de atividade de PAH (menos de 1% dos controles), os fenótipos menos graves, chamados de hiperfenilalaninemia não-PKU e PKU variante (ver Quadro 12.3), ocorrem quando a enzima PAH mutante tem alguma atividade residual. A **hiperfenilalaninemia não-PKU** é definida pela concentração plasmática de fenilalanina abaixo de 1 mM quando o paciente está recebendo uma dieta normal. Este grau de hiperfenilalaninemia está apenas cerca de 10 vezes acima do normal, mais baixo que as concentrações encontradas na PKU clássica (> 1 mM). O aumento moderado na fenilalanina na hiperfenilalaninemia não-PKU é menos prejudicial ao cérebro ou pode até mesmo ser benigno se o aumento for pequeno (< 0,4 mM), e as pessoas afetadas chamam a atenção clínica apenas porque são identificadas por triagem neonatal. Seu fenótipo normal foi a melhor indicação do nível "seguro" de fenilalanina plasmática que não deve ser ultrapassado no tratamento de pacientes com a PKU clássica. A **variante de PKU** é uma categoria que inclui pacientes com tolerância intermediária de fenilalanina entre a PKU clássica e a hiperfenilalaninemia não-PKU. Tais pacientes precisam de alguma restrição de fenilalanina em sua dieta, mas menor do que a necessária aos pacientes com PKU clássica. A associação destes três fenótipos clínicos com mutações no gene *PAH* é um exemplo claro da heterogeneidade clínica (ver Quadro 12.2).

As Hiperfenilalaninemias:

Heterogeneidade Alélica e de Locus

Os Defeitos Moleculares na Fenilalanina Hidroxilase.

O gene para PAH foi isolado em 1986 e, subsequentemente, demonstrou-se um marcante grau de heterogeneidade alélica (ver Quadro 12.3) na população deficiente de PAH. Mais de 400 alelos diferentes já foram reconhecidos. A grande maioria é de mutações raras, que prejudicam a atividade enzimática de PAH e levam à hiperfenilalaninemia, embora também já tenham sido identificados polimorfismos benignos ou variantes benignas menos comuns. Seis mutações diferentes são responsáveis por cerca de dois terços dos cromossomos mutantes conhecidos nas populações de descendência européia (Fig. 12.2). Notadamente, seis outras mutações são responsáveis por cerca de mais de 80% das mutações *PAH* nas populações asiáticas (Fig. 12.2). As mutações restantes causadoras de doenças são individualmente raras. Para registrar e tornar esta informação publicamente disponível, um banco de dados de *PAH* foi desenvolvido por um sócio internacional.

Em todas as populações, há uma substancial heterogeneidade genética na população mutante *PAH*. Devido ao alto grau de heterogeneidade alélica no locus, a maioria dos pacientes PKU, na maioria das populações, é de **compostos genéticos** (têm dois alelos diferentes causadores da doença), um achado totalmente de acordo com as observações enzimáticas e clínicas de heterogeneidade fenotípica em defeitos de PAH. Embora a princípio parecesse que conhecer o genótipo *PAH* daria uma previsão confiável dos detalhes sobre o fenótipo, esta expectativa não se concretizou. Por exemplo, duas das mutações européias comuns estão associadas aos fenótipos que variam da PKU clássica à PKU variante à hiperfenilalaninemia não-PKU (Quadro 12.4). Assim, hoje está claro que outras variáveis biológicas não-identificadas, incluindo genes modificadores, geram inconsistência fenotípica na PKU, mesmo na presença de identidade genotípica no locus de *PAH*. Conseqüentemente, reconheceu-se que mesmo as características monogênicas como a PKU não são simples.

Fig
pul
na,
L. e
tab
dat
Uni
(ve
Cap

QU
Ge
De

Arg
IVS
IVS
Ile

Tir

Arg

*De
225
†Do
‡De
Am
§IV
|| Na

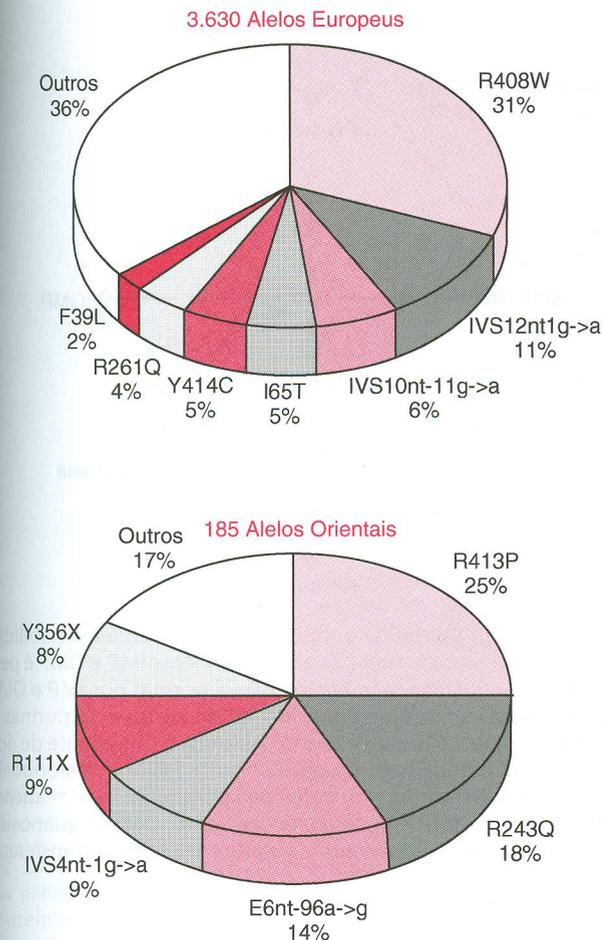


Fig. 12.2 A natureza e a identidade das mutações *PAH* nas populações de descendência europeia e asiática (a última da China, Coreia e Japão). (Extraído de Nowacki P. M., Byck S., Prevost L. e Scriver C. R. [1998] *PAH* mutation analysis consortium database: 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. Nucl Acids Res 26:220-225, com permissão da Oxford University Press). É usado o código de uma letra do aminoácido (ver Quadro 3.1) e a nomenclatura de mutação como descrita no Cap. 6.

No noroeste da Europa, três dos principais alelos mutantes são amplamente restritos a haplótipos específicos (Quadro 12.4), embora mais de 80 haplótipos de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ao redor do gene *PAH* já tenham sido identificados. Como foi discutido no Cap. 8, um haplótipo em particular em geral está associado a uma mutação em particular, *em uma população específica*. A associação de uma mutação específica com um haplótipo cromossômico em particular em diferentes subgrupos de uma população sugere que a mutação originou-se de um cromossomo com este haplótipo. No caso da PKU, os dados sugerem origens únicas para vários alelos no noroeste da Europa. A mutação *PAH* mais comum (Arg408Trp) parece ter surgido independentemente em vários cromossomos diferentes, porque ela é encontrada em vários haplótipos diferentes. Ela envolve um sítio CpG hipermutável. Por este motivo, não podemos supor que um haplótipo em particular está associado a uma mutação específica na PKU, exceto em populações bem-definidas.

Defeitos no Metabolismo de Tetraidrobiopterina

A princípio acreditava-se que todas as crianças com hiperfenilalaninemia hereditária tinham uma deficiência primária de *PAH*. Hoje está claro, entretanto, que em cerca de 1% a 3% destes pacientes o gene *PAH* é normal, e sua hiperfenilalaninemia é o resultado de um defeito genético na formação ou na reciclagem do co-fator de *PAH*, tetraidrobiopterina (BH_4) (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). A associação de um único fenótipo, tal como a hiperfenilalaninemia, a mutações em genes diferentes é um exemplo de heterogeneidade de locus (ver Quadro 12.2). Como ilustrado pelas mutações nos genes que codificam a apoenzima *PAH* e as vias de co-fator biopterina (ver Fig. 12.1), as proteínas codificadas pelos genes que manifestam heterogeneidade de locus em geral atuam em etapas diferentes em uma única via bioquímica. Os pacientes com deficiência de BH_4 foram inicialmente reconhecidos porque, a despeito da bem-sucedida administração de uma dieta pobre em fenilalanina, eles desenvolveram profundos problemas neurológicos no início da vida. Este resultado pobre deve-se em parte à necessidade do co-fator BH_4 de outras duas enzimas, a tirosina hidroxilase e o triptofano hidroxilase. Am-

QUADRO 12-4

Gene de Fenilalanina Hidroxilase: Mutações, Haplótipos e Fenótipos Clínicos em Populações de Descendência Europeia

Mutação	% de Atividade	Representação entre Mutações*	Haplótipo Associado†	Fenótipo Associado em Homozigotos‡
Arg 408 Trp	< 1%	31%	1, 2, 5, 44	PKU clássica
IVS 12nt1g → a§	< 1%	11%	3	PKU clássica
IVS10nt - 11g → a	desconhecida	6%	6, 10, 34, 36	PKU clássica
Ile 65 Tre	~25%	5%	9	PKU clássica, PKU variante
Tir 414 Cis	30-50%	5%	HPA não-PKU 4	PKU variante
Arg 261 Gln	30%	4%	HPA não-PKU 1, 2, 4, outros	PKU ou PKU variante

*De Nowacki P. *et al.* (1998) *PAH* mutation analysis consortium database: 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. Nucl Acids Res 26:220-225.

†Do banco de dados de *PAH* (www.mcgill.ca/pahdb).

‡De Kayaalp E. *et al.* (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: A metaanalysis of genotype-phenotype correlations. Am J Hum Genet 61: 1309-1317.

§IVS 12nt1g → indica que o primeiro nucleotídeo do 12.º íntron é "a" substituído por "g".

|| Não está claro se estas atividades, obtidas por dosagens *in vitro*, refletem a função *in vivo*.

bas as hidroxilases são cruciais para a síntese de neurotransmissores monoamina, tais como dopa, norepinefrina, epinefrina e serotonina (ver Fig. 12.1).

Os pacientes com deficiência em BH_4 têm defeitos em uma das etapas na biossíntese de BH_4 a partir de guanósina trifosfato (GTP) ou na regeneração de BH_4 (ver Fig. 12.1). É crucial reconhecer estas condições, pois seu tratamento difere muito da PKU clássica. Por este motivo, todas as crianças com hiperfenilalaninemia também devem ser testadas quanto à deficiência de BH_4 . Além do controle dos níveis de fenilalanina do sangue, o objetivo do tratamento destes pacientes é tentar normalizar os neurotransmissores no cérebro administrando os produtos da tirosina hidroxilase e do triptofano hidroxilase, L-dopa e 5-hidroxitriptofano, respectivamente (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). Como a PKU clássica, estes distúrbios são herdados de modo autossômico recessivo.

Fenilcetonúria Materna. O tratamento em geral bem-sucedido de PKU permite que os homozigotos afetados levem uma vida independente e tenham perspectivas quase normais de paternidade. No passado, muitos pacientes com PKU eram tirados da dieta pobre em fenilalanina na metade da infância sob a suposição (hoje comprovadamente incorreta) de que o funcionamento do sistema nervoso maduro não seria prejudicado com o retorno da hiperfenilalaninemia. Subseqüentemente, descobriu-se que quase toda a prole de uma mulher com PKU que não recebia tratamento era anormal. A maioria tinha retardo mental, e muitos tinham microcefalia, prejuízo de crescimento e malformações, particularmente cardíacas. Como previsto pelos princípios da herança mendeliana, a maioria destes filhos é heterozigota. Assim, seu retardo não se deve à sua constituição genética, mas ao efeito altamente teratogênico dos níveis elevados de fenilalanina na circulação materna. Em conseqüência, é imperativo que as mulheres com PKU que estejam planejando gestações iniciem uma dieta pobre em fenilalanina antes de engravidar.

Defeitos no Metabolismo de Purinas

SÍNDROME DE LESCH-NYHAN

Um bom exemplo de uma relação genótipo-fenótipo decorrente de heterogeneidade alélica é dado por mutações no locus *HPRT* que codifica a enzima ligada ao X hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT) (Fig. 12.3). Os pacientes sem atividade residual de HPRT têm um fenótipo marcante, chamado de síndrome de Lesch-Nyhan e caracterizado por coreoatetose (um distúrbio de movimento), espasticidade, retardo mental variável, superprodução de ácido úrico, que causa gota e cálculos renais, e, mais marcante, automutilação. As anomalias neurológicas podem resultar de mudanças nos níveis de purina do cérebro produzidos pela doença, compatível com a teoria de que algumas purinas são supostos neurotransmissores. Finalmente, os pacientes com deficiência de HPRT também ilustram como a perda da inibição *feedback* normal na regulação de uma via metabólica pode ter conseqüências fisiopatológicas, um princípio importante das doenças genéticas bioquímicas (Fig. 12.3).

Algumas pessoas com mutações no gene *HPRT* manifestam apenas um fenótipo parcial da síndrome de Lesch-Nyhan, a hiperuricemia com gota. Em contraste com os pacientes com a síndrome de Lesch-Nyhan, estas pessoas possuem alelos associados a níveis de atividade de HPRT que variam de aproximadamente 1% a 30% do normal. Nenhum dos marcantes achados

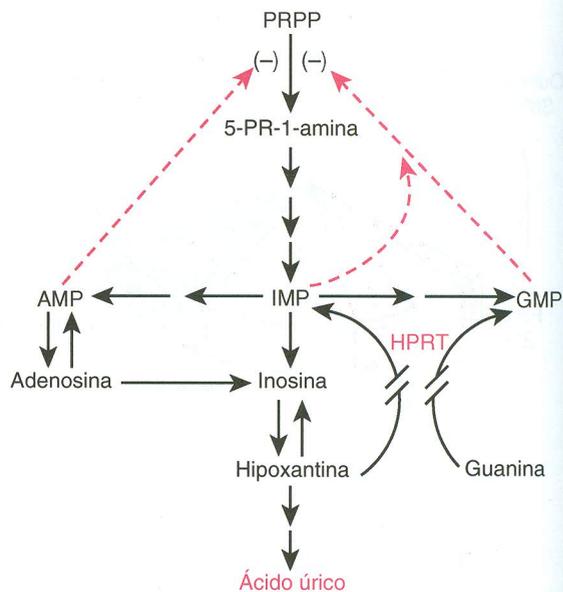


Fig. 12.3 A via de síntese de purinas. Na falta de HPRT, a habilidade em reutilizar hipoxantina e guanina para fazer IMP e GMP é perdida. Em conseqüência, a inibição *feedback* normal por IMP e GMP (setas interrompidas) em uma etapa inicial da síntese de purinas é muito reduzida, e a síntese *de novo* de purinas, e finalmente de ácido úrico, é aumentada (setas contínuas centrais). PRPP = fosforibosilpirofosfato; 5-PR-1-amina = 5-fosforibosil-1-amina; AMP = adenosina monofosfato; IMP = inosina monofosfato; GMP = guanósina monofosfato; HPRT = hipoxantina guanina fosforibosiltransferase.

neuroológicos está presente. A deficiência parcial de HPRT deste tipo, entretanto, é responsável por menos de 2% de todos os pacientes masculinos adultos com gota.

Doenças de Armazenamento Lisossômico

Os lisossomos são organelas delimitadas por membranas contendo uma variedade de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de várias macromoléculas biológicas. Os defeitos genéticos destas hidrolases levam ao acúmulo de seus substratos dentro do lisossomo, o que resulta em disfunção celular e, eventualmente, em morte celular. O acúmulo gradual de substrato é responsável pela característica clínica uniforme destas doenças: sua inexorável progressão. Na maioria destas condições, o armazenamento de substratos manifesta-se clinicamente como um aumento na massa de tecidos e órgãos afetados. Quando o cérebro é afetado, entretanto, como em geral é o caso, o quadro é de neurodegeneração. Os fenótipos clínicos normalmente tornam o diagnóstico de uma doença de armazenamento direto e em geral sugerem a classe de doença de armazenamento ou mesmo o distúrbio específico. Mais de 48 deficiências de hidrolases ou de transporte de membrana lisossômicas já foram descritas. Quase todas são autossômicas recessivas. Finalmente, como será demonstrado por vários exemplos discutidos mais adiante, as doenças de armazenamento lisossômico dão exemplos marcantes tanto de heterogeneidade alélica quanto de locus.

DOENÇA DE TAY-SACHS

A doença de Tay-Sachs faz parte de um grupo de doenças heterogêneas de armazenamento lisossômico, as gangliosidoses G_M2 , que resultam da inabilidade em degradar um esfingolípido, o

Fig.
dos
Con
Bas

gan
ên
ma
ape
síd
tem
dad
te)
à e
gal

OU
Na

Ins
(é
Jur
é
Gli
r
a
Ou
*O
32
Me

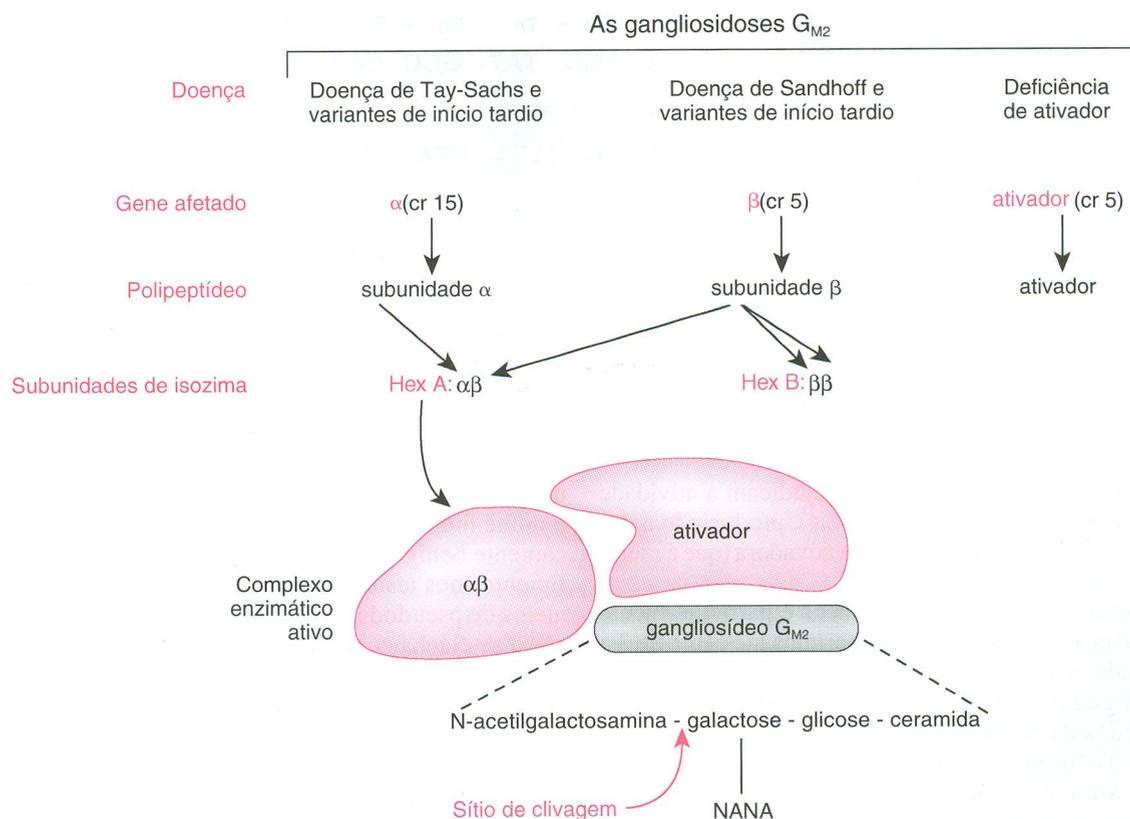


Fig. 12.4 O sistema de três genes necessário para a atividade da hexosaminidase A e as doenças que resultam de defeitos em cada um dos genes. A função da proteína ativadora é se ligar ao substrato gangliosídeo e levá-lo para a enzima. (Modificado de Sandhoff K., Conzelmann E., Neufeld E. F., *et al.* [1989]. The G_{M2} gangliosidoses. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6.^a ed., McGraw-Hill, New York, pp. 1.807-1.839.)

gangliosídeo G_{M2} (Fig. 12.4). A lesão bioquímica é uma deficiência acentuada de hexosaminidase A (hex A). Embora a enzima seja ubíqua, a doença tem seu impacto clínico quase que apenas no cérebro, o local predominante de síntese de gangliosídeo G_{M2}. A hex A cataliticamente ativa é o produto de um sistema de três genes (Fig. 12.4). Estes genes codificam as subunidades α e β da enzima (os genes *HEXA* e *HEXB*, respectivamente) e uma proteína ativadora que deve se associar ao substrato e à enzima antes que esta possa clivar o terminal N-acetil-β-galactosamina do gangliosídeo.

As manifestações clínicas dos defeitos nos três genes são indistinguíveis, mas eles podem ser diferenciados por análise enzimática. As mutações no gene *HEXA* afetam a subunidade α e perturbam a atividade de hex A, causando a doença de Tay-Sachs (ou variantes menos severas da deficiência de hex A). A maioria dos alelos leva a uma profunda deficiência do mRNA da subunidade α e da atividade de hex A (Quadro 12.5). A mutação mais comum responsável pela doença de Tay-Sachs tanto em populações de judeus Ashkenazi quanto em outras populações é o alelo nulo mostrado na Fig. 12.5. Os defeitos no gene *HEXB*, ou no

QUADRO 12-5

Natureza e Frequência de Alelos de Hexosaminidase A em Judeus Ashkenazi e Outras Populações*

Mutação	Efeito do Produto Gênico	Frequência Estimada em Judeus Ashkenazi	Frequência em Populações Não-Ashkenazi	Fenótipo Homozigoto
Inserção de 4 pb (éxon 11)	Códon prematuro de fim	80%	32%	Doença de Tay-Sachs
Junção de corte no éxon 12: G → C	Recomposição defeituosa do mRNA	10-15%	< 1%	Doença de Tay-Sachs
Gli269Ser mais recomposição anormal	< 3% de atividade residual	2-3%	< 1%	Gangliosidose G _{M2} de início adulto
Outros alelos	Variável	< 1%	> 80%	Variável

*Obtido de Triggs-Raine B. L., Feigenbaum A. S. J., Natowicz M., *et al.* (1990) Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi Jews, *N Engl J Med* 323:6-12; e Gravel R. A., Clarke J. T. R., Kaback M. M., *et al.* (1995) The G_{M2} gangliosidoses. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7.^a ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2.839-2.879.

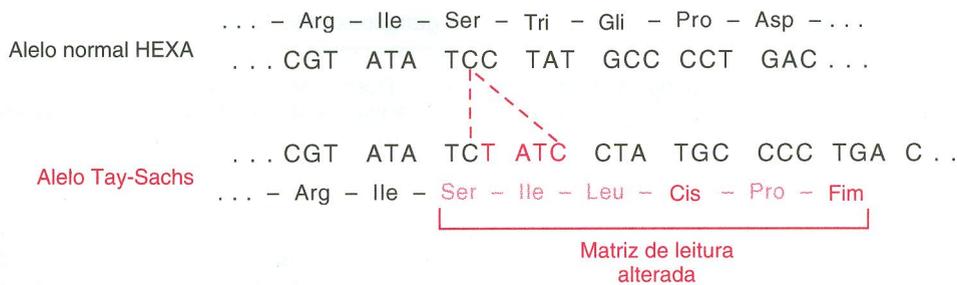


Fig. 12.5 Inserção de quatro bases no gene de hexosaminidase A na doença de Tay-Sachs, levando a uma mudança de matriz de leitura. Esta mutação é a principal causa da doença de Tay-Sachs em judeus Ashkenazi (ver Quadro 12.5). Nenhuma proteína hex A detectável é produzida, o que explica a total deficiência da enzima observada nestes pacientes com início infantil.

gene codificante da proteína ativadora, prejudicam a atividade tanto em hex A quanto hex B (ver Fig. 12.4), produzindo a doença de Sandhoff e deficiência da proteína ativadora (que é muito rara), respectivamente.

O curso clínico da doença de Tay-Sachs é particularmente trágico. As crianças afetadas parecem normais até cerca de 3 a 6 meses de idade, mas então gradualmente sofrem uma deterioração neurológica progressiva até a morte, que se dá entre 2 e 4 anos. Os efeitos da morte celular neuronal podem ser vistos diretamente sob a forma do chamado ponto vermelho-cereja na retina, que é a *fovea centralis* circundada por uma mácula clara. Vários alelos já foram identificados no locus *HEXA* e são responsáveis por uma marcante heterogeneidade clínica na deficiência de hex A (ver Quadro 12.5). Nas variantes de manifestação mais tardia da doença, existem pequenas mas definidas quantidades da enzima residual funcional, e a idade de início dos sintomas é um tanto proporcional à atividade residual. Na forma crônica, que pode ser de início até adulto, as manifestações comumente incluem uma disfunção neuronal motora e ataxia devida à degeneração espinocerebelar, mas, em contraste com a doença infantil, a visão e a inteligência permanecem normais, embora se desenvolva psicose em um terço destes pacientes.

Genética de Populações. Cerca de 1 em cada 27 judeus Ashkenazi é portador de um alelo Tay-Sachs, e a incidência de crianças afetadas é 100 vezes mais alta que em outras populações, como foi discutido no Cap. 7. Considera-se o efeito do fundador ou a vantagem do heterozigoto como a explicação mais provável. Embora um alelo predominante freqüentemente esteja associado a uma alta freqüência de portador de um gene de doença em uma única população, a análise molecular inesperadamente demonstrou que três alelos são responsáveis por 99% das mutações em todos os pacientes judeus Ashkenazi e portadores (ver Quadro 12.5). Assim, o motivo para a alta freqüência da deficiência de hex A nas populações de judeus Ashkenazi não é aparente. A presença de três alelos não confirma necessariamente a hipótese da vantagem do heterozigoto, pois suas freqüências podem ser decorrentes de um efeito do fundador. Um benefício prático da caracterização molecular da doença nesta população é o grau no qual foi facilitada a triagem de portadores (pois a maioria dos portadores terá um dos três alelos comuns).

Alelos de Pseudodeficiência de Hex A. Uma consequência inesperada da triagem dos portadores de Tay-Sachs na população de judeus Ashkenazi foi a descoberta de uma classe

única de alelos hex A, os alelos de pseudodeficiência. Como o nome indica, os dois alelos de pseudodeficiência são clinicamente benignos. As pessoas identificadas como pseudodeficientes nos testes de triagem são compostos genéticos com alelos de pseudodeficiência em um cromossomo e uma mutação Tay-Sachs comum no outro cromossomo. Estas pessoas têm um nível baixo de atividade de hex A (cerca de 20% dos controles em leucócitos) que ainda é adequada para evitar o acúmulo do substrato, o gangliosídeo G_{M2} . A importância dos alelos de pseudodeficiência de hex A é dupla. Primeiro, isto complica o diagnóstico pré-natal, pois um feto pseudodeficiente pode ser incorretamente diagnosticado como afetado. De modo mais geral, a existência dos alelos de pseudodeficiência de hex A indica que os programas de triagem para outras doenças genéticas devem reconhecer que provavelmente existem alelos comparáveis em outros loci, o que pode confundir a caracterização correta dos indivíduos nos testes de triagem ou diagnósticos.

AS MUCOPOLISSACARIDOSES

Os mucopolissacarídeos, ou glicosaminoglicanas (GAGs), são cadeias polissacarídicas sintetizadas por células do tecido conjuntivo como constituintes normais de muitos tecidos. Eles são feitos de longas repetições de unidades dissacarídicas. A natureza das duas moléculas de açúcar é a característica distintiva de uma GAG específica. A degradação destas macromoléculas ocorre no lisossomo e requer a remoção gradativa do monossacarídeo no final da cadeia por uma enzima específica ao monossacarídeo e à ligação envolvida. Assim, uma série de enzimas é necessária para a degradação de qualquer GAG, e em geral uma única enzima participa do catabolismo de mais de uma GAG.

As mucopolissacaridoses são um grupo heterogêneo de doenças de armazenamento no qual os mucopolissacarídeos acumulam-se nos lisossomos em consequência de uma deficiência em uma das enzimas necessárias à sua degradação (Quadro 12.6). Nas mucopolissacaridoses específicas, uma ou mais GAGs podem se acumular se a enzima defeituosa for necessária para seu catabolismo. As GAGs não-degradadas apresentam-se na urina, onde podem ser detectadas por testes de triagem.

As duas primeiras mucopolissacaridoses reconhecidas foram a **síndrome de Hunter** recessiva ligada ao X, em 1917, e a **síndrome de Hurler**, mais grave e autossômica recessiva, em 1919. Cada uma destas condições foi inicialmente chamada de "gargolismo" em função das feições faciais grosseiras das pessoas

QUADRO 12-6

Exemplos de Mucopolissacaridoses

Síndrome	Características Clínicas	Defeito Enzimático: Mucopolissacarídeo Estocado/Excretado	Genética	Comentário
Hurler	Diagnosticada aos 6-18 meses, opacidade da córnea, mudanças esqueléticas na radiografia chamadas de disostose múltipla, hepatosplenomegalia, face grosseira, rigidez das articulações, descarga nasal, hidrocefalia, morte < 10 anos	α -L-Iduronidase; sulfato de dermatan; sulfato de heparan	AR	Provavelmente decorrente de qualquer alelo que extinga a atividade da enzima. A maioria dos pacientes provavelmente é de compostos genéticos
Scheie	Início após os 5 anos, inteligência e tempo de vida normais, opacidade da córnea, rigidez das articulações, doença cardíaca valvular, prejuízo visual	α -L-Iduronidase; sulfato de dermatan; sulfato de heparan	AR	Testes de complementação mostram que este fenótipo mais brando afeta o mesmo gene que a síndrome de Hurler
Hurler/Scheie	Fenótipo intermediário às síndromes de Hurler e Scheie	α -L-Iduronidase; sulfato de dermatan; sulfato de heparan	AR	Alguns casos provavelmente são compostos genéticos de alelos Hurler e Scheie
Hunter	Similar à síndrome de Hurler, mas com progresso mais lento, sem opacidade da córnea e com uma única lesão de pele	Iduronato sulfatase; sulfato de dermatan; sulfato de heparan	XR	Um fenótipo mais brando, sem doença do sistema nervoso central, também ocorre com um curso somático muito menos agressivo
Sanfilippo A	Hiperatividade e retardo, neurodegeneração progressiva; características somáticas brandas \rightarrow subdiagnosticada	Heparan <i>N</i> -sulfatase; sulfato de heparan	AR	Predominantemente neurológica, com pouco para distinguir os fenótipos associados aos quatro genes de Sanfilippo
Sanfilippo B	Similar à síndrome de Sanfilippo A	α - <i>N</i> -acetilglicosaminidase; sulfato de heparan	AR	Como acima

Modificado por Neufeld E. F., Muenzer J. (1995) The mucopolysaccharidoses. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2.465-2.494.

afetadas (Fig. 12.6). As crianças afetadas são mentalmente retardadas, têm anomalias esqueléticas, baixa estatura e manifestam outras anomalias citadas no Quadro 12.6.

A síndrome de Hurler deve-se a uma grave deficiência de α -L-iduronidase. Um distúrbio clinicamente distinto, a **síndrome de Scheie**, a princípio foi tido como envolvendo um locus diferente, principalmente devido ao seu fenótipo mais brando. Entretanto, as síndromes de Scheie e Hurler são alélicas, mas as mutações de α -L-iduronidase que causam a síndrome de Scheie parecem estar associadas a uma atividade residual maior. Um fenótipo intermediário, a síndrome de Hurler/Scheie, pelo menos em alguns casos é um composto genético dos alelos de Hurler e Scheie e também pode resultar de dois alelos com atividade intermediária aos alelos de Hurler e Scheie.

A diferença no padrão de herança das síndromes autossômica de Hurler e ligada ao X de Hunter indica que são decorrentes de mutações em genes diferentes. Esta diferença também foi demonstrada em cultura de células. Embora os fibroblastos de pacientes de ambos os tipos acumulem mucopolissacarídeos em meio de cultura, o acúmulo pode ser corrigido pelo co-cultivo de ambos os tipos de células no mesmo frasco. A interpretação que se demonstrou correta foi que a enzima lisossômica deficiente em um tipo celular mutante foi obtida do meio no qual foi liberada pelo outro tipo celular. Este experimento simples foi uma poderosa demonstração de que as duas doenças afetavam proteínas diferentes. A demons-

tração de que o genoma de um mutante pode corrigir o defeito bioquímico de outro mutante é chamada de **complementação**. Este fenômeno será discutido na próxima seção. Em contraste, o co-cultivo de células Scheie e Hurler não induziu nenhuma correção bioquímica, como depois demonstraram as dosagens enzimáticas, pois eram decorrentes de defeitos na mesma proteína.

A habilidade de uma célula em captar do meio extracelular a enzima lisossômica na qual é deficiente é um mecanismo pelo qual o transplante de células normais (que iriam secretar a enzima) para pacientes com doenças de armazenamento lisossômico pode permitir a correção dos defeitos bioquímicos no resto do corpo. Foram obtidos acentuados benefícios terapêuticos no tratamento de alguns pacientes com mucopolissacaridoses, incluindo a síndrome de Hurler, por transplante de medula óssea (ver Cap. 13).

Outra mucopolissacaridose, a **síndrome de Sanfilippo**, ilustra a ampla heterogeneidade de locus subjacente a um fenótipo clínico relativamente homogêneo. Uma característica clínica importante dos pacientes com síndrome de Sanfilippo é que as anomalias intelectuais e comportamentais são evidentes bem antes das mudanças físicas, que tendem a ser brandas. Inicialmente vista como uma entidade única, esta síndrome pode resultar de uma dentre quatro deficiências enzimáticas, duas das quais são mostradas no Quadro 12.6. Os fenótipos clínicos de pacientes individuais dão pouca base para sugerir que enzima (e, portanto, que gene) está deficiente.

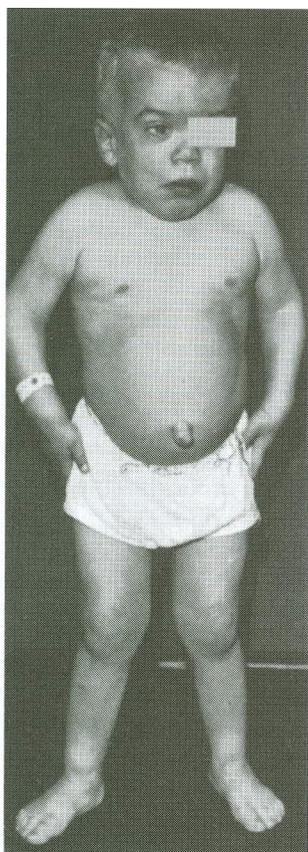


Fig. 12.6 Uma criança com síndrome de Hurler, mostrando as características faciais grosseiras típicas. Aos 5 anos de idade ele tem a altura típica de 3 anos. (De Smith D. W. [1982] *Recognizable Patterns of Human Malformation*, 3.ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

Análise de Complementação de Doenças Genéticas Humanas

Nos experimentos de co-cultivo descritos, os geneticistas examinaram uma questão que comumente surge no estudo de pacientes com doenças genéticas: duas pessoas com o que parece ser o mesmo distúrbio têm defeitos no mesmo gene? Os experimentos genéticos que abordam esta questão são chamados de **testes de complementação**. Se a correção mútua de um fenótipo ocorre em um teste de complementação, os defeitos genéticos são ditos complementares, os genes afetados devem ser diferentes e ocorreu *complementação intergênica* (mas veja uma exceção, a complementação intragênica, mais adiante). A utilidade dos testes de complementação baseia-se no fato de que estes testes não exigem que se conheça os genes ou as proteínas afetados, mas apenas que se tenha a capacidade de examinar as células quanto à correção de um fenótipo mutante: no caso das doenças de armazenamento de mucopolissacarídeo citadas, a redução do acúmulo de mucopolissacarídeo. A análise de complementação tem sido usada para dissecar a base genética de muitas doenças genéticas humanas.

Se houver dúvida de que o fator corretivo pode ser transferido pelo meio de cultura, células diferentes podem ser fundidas para formar um heterocácion, no qual ambos os núcleos estão dentro de uma única célula (ver Cap. 8). Os experimentos deste tipo demonstraram que o **xeroderma pigmentoso (XP)**, uma rara doença associada a um aumento de frequência de 2.000 vezes

no câncer de pele induzido pela luz do sol, é causado por mutação em qualquer um de oito genes, sete dos quais codificam proteínas necessárias ao reparo de excisão do DNA. As pessoas com defeitos brandos podem ter apenas uma sensibilidade aumentada à luz do sol, enquanto os pacientes gravemente afetados estão sujeitos a profundos prejuízos neurológicos, extrema sensibilidade à luz na lactância, sardas anormais, atrofia da pele e, finalmente, nos piores casos, vários tumores (carcinomas, melanomas e neoplasias internas) também.

Testes de complementação em heterocárions deram resultados positivos mesmo sendo conhecidas mutações em dois grupos de células que afetam o mesmo gene. Neste caso, a complementação é dita como sendo *intragênica* (*versus intergênica*) e demonstra que os pacientes têm mutações diferentes, mas alélicas. A complementação intragênica (ou *interalélica*) ocorre apenas quando as proteínas afetadas são não-multímeros, o que indica que a subunidade mutante de um alelo interage com a subunidade mutante de outro alelo de modo a melhorar o funcionamento da proteína multimérica.

DOENÇA DA CÉLULA I: UM DEFEITO NO TRÁFEGO DE PROTEÍNA

Em contraste com as proteínas mitocondriais e de membrana que são direcionadas ao seu endereço subcelular pela informação contida na seqüência primária de aminoácidos, outras proteínas são situadas com base em modificações pós-traducionais (ver Quadro 11.1). Isto é verdade quanto às hidrolases ácidas encontradas nos lisossomos, e, na verdade, a existência e o mecanismo desta forma de tráfego celular não eram reconhecidos até que a doença da célula I, uma grave doença de armazenamento lisossômico autossômica recessiva, fosse investigada no início da década de 1970. Os fibroblastos de pele cultivados de pacientes com doença da célula I continham vários lisossomos anormais, ou inclusões, pelo citoplasma (logo, células de inclusão ou células I).

Na doença da célula I, muitas das hidrolases ácidas normalmente presentes nos lisossomos são encontradas em excesso nos líquidos corpóreos, embora seus níveis celulares estejam gravemente diminuídos. Esta situação incomum surge porque as hidrolases lisossômicas nestes pacientes são anormais devido a uma modificação pós-traducional. Uma hidrolase típica é uma glicoproteína com muitas unidades manose, algumas das quais são fosforiladas. As unidades manose-6-fosfato são essenciais para o reconhecimento das hidrolases por receptores na célula e na superfície da membrana lisossômica. Na doença da célula I, há um defeito na enzima que transfere um grupo fosfato para as unidades manose. O fato de muitas enzimas serem afetadas é compatível com a diversidade de anomalias clínicas. O distúrbio tem uma gama de efeitos fenotípicos, que envolvem características faciais, alterações esqueléticas, grave retardo de crescimento e retardo mental. Caracteristicamente as crianças afetadas sobrevivem por apenas 5 a 7 anos.

Mutações que Impedem a Ligação de Co-fatores do Metabolismo

Algumas proteínas adquirem atividade biológica apenas depois que se associam a grupos prostéticos não-proteicos ou co-fatores que têm um papel crucial na função da proteína. Os co-fatores necessários para a atividade catalítica de algumas enzimas são um exemplo. As mutações que interferem na união de ligandos, síntese, transporte ou remoção de uma proteína (quando a união do ligando é covalente) já são conheci-

Fig. sintase met met teín

das ma lar sol dad

Ho Cis

A K tas rec rec dro rac lin bo ho toc

me da xir ma pa é r im

Di M

A da to tip dá

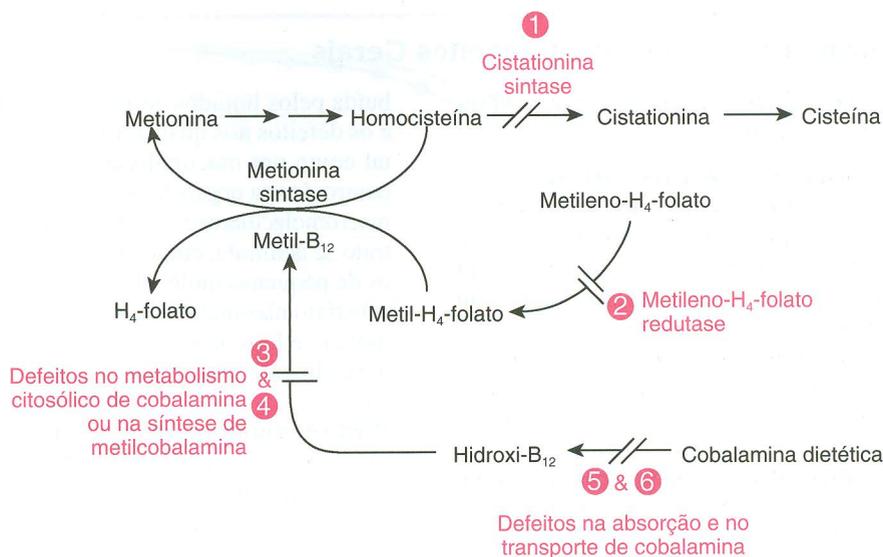


Fig. 12.7 Os seis tipos de defeitos genéticos que causam homocistinúria. (1) A homocistinúria clássica deve-se à falta de cistionina sintase. (2) Nos defeitos de metileno-H₄-folato redutase, a diminuição de metil-H₄-folato prejudica o funcionamento de metionina sintase. (3) Vários defeitos diferentes no metabolismo intracelular das cobalaminas levam a uma diminuição secundária na síntese de metilcobalamina (metil-B₁₂) e, assim, no funcionamento da metionina sintase. (4) Alguns distúrbios afetam diretamente a formação de metil-B₁₂. (5) A absorção de cobalamina intestinal é anormal em alguns pacientes. (6) Outros pacientes têm anomalias na principal proteína de transporte extracelular, a transcobalamina II. Hidroxicobalamina = hidroxi-B₁₂.

das. De todos os distúrbios genéticos, estes estão entre os que mais respondem à terapia bioquímica específica, em particular quando o co-fator ou seu precursor é uma vitamina hidrossolúvel que pode ser dada com segurança em grandes quantidades.

HOMOCISTINÚRIA DECORRENTE DE DEFICIÊNCIA DE CISTATIONINA SINTASE: NÃO-LIGAÇÃO DE CO-FATOR

A homocistinúria decorrente de deficiência de cistionina sintase (Fig. 12.7) foi uma das primeiras aminoacidopatias a ser reconhecida. O fenótipo clínico desta condição autossômica recessiva em geral é grave (e pode ser confundido com a síndrome de Marfan, um distúrbio do tecido conjuntivo). As características mais comuns incluem o deslocamento do cristalino, retardo mental, osteoporose, ossos longos e tromboembolismo de veias e artérias. Acredita-se que o acúmulo de homocisteína seja o fator central da maior parte, se não de toda, a patologia.

A homocistinúria foi uma das primeiras doenças genéticas que mostrou ser responsiva a vitamina: o piridoxal fosfato é o co-fator da enzima, e a administração de grandes quantidades de piridoxina, o precursor vitamínico do co-fator, em geral atenua a anomalia bioquímica (ver Cap. 13) e o quadro clínico. Em muitos pacientes, a afinidade da enzima mutante pelo piridoxal fosfato é reduzida, o que indica que a conformação alterada da proteína impede a ligação do co-fator.

DISTÚRBIOS DECORRENTES DE ANOMALIAS DO METABOLISMO DE CO-FATORES

A perda da função proteica às vezes é secundária à disponibilidade diminuída de uma molécula associada, tal como um co-fator enzimático. Os distúrbios desta classe são bem ilustrados pelos tipos de homocistinúria que resultam de vários defeitos secundários em outra enzima, a metionina sintase, que remete a ho-

mocisteína para formar metionina (ver Fig. 12.7). Como foi demonstrado, o co-fator da metionina sintase, a metilcobalamina, é o produto de uma série complexa de eventos bioquímicos. Vários distúrbios de transporte ou metabolismo da vitamina B₁₂ (cobalamina) reduzem a disponibilidade de metilcobalamina e, portanto, prejudicam, secundariamente, a atividade da metionina sintase.

Vários defeitos prejudicam a absorção intestinal de cobalamina ou seu transporte para outras células; outros perturbam etapas específicas do metabolismo de cobalamina (ver Fig. 12.7). A manifestação clínica destes distúrbios é variável e inclui anemia megaloblástica, retardo de desenvolvimento e falta de desenvolvimento. Estas condições em geral são parcial ou completamente tratáveis com altas doses de vitamina B₁₂. Todas são autossômicas recessivas.

Deficiência de Alfa₁-Antitripsina: Deficiência de um Inibidor de Protease

A deficiência de α_1 -AT é uma importante condição autossômica recessiva que leva à doença pulmonar obstrutiva crônica e à cirrose hepática. O locus α_1 -AT, no cromossomo 14, expressa-se principalmente no fígado, que secreta α_1 -AT no plasma. Embora a α_1 -AT iniba um amplo espectro de proteases, seu principal papel fisiológico é se ligar e inibir a elastase, particularmente a elastase liberada pelos neutrófilos nas vias respiratórias inferiores.

Encontrou-se uma grande variabilidade genética na α_1 -AT, com mais de 75 variantes genéticas, chamadas de tipos inibidores de protease (ver Cap. 6). Apenas cerca de uma dúzia destes alelos leva a um risco aumentado de doença pulmonar ou hepática, e apenas o alelo Z é relativamente comum. Nas populações caucasianas, a deficiência de α_1 -AT afeta cerca de 1 em 2.500 pessoas, e 3% são portadores. O motivo para a frequência relativamente alta do alelo Z nas populações caucasianas é desconhecido, embora a análise de haplótipos de DNA sugira uma origem

Deficiências Enzimáticas e Doença: Conceitos Gerais

Os conceitos que se seguem são fundamentais para a compreensão e o tratamento das enzimopatias:

1. **As enzimopatias são quase sempre recessivas.** A maioria das enzimas é produzida em quantidades significativas, além das necessidades bioquímicas mínimas, de modo que os heterozigotos com cerca de 50% da atividade residual são clinicamente normais. De fato, muitas enzimas podem manter níveis normais de substrato e produtos com atividades menores que 10% dos controles (p. ex., hex A). As enzimas de síntese de porfirina são exceções (ver discussão sobre porfiria intermitente aguda mais adiante, neste capítulo).
2. **Acúmulo de substrato ou deficiência de produto.** Como a função de uma enzima é converter um substrato em um produto, todas as conseqüências fisiopatológicas das enzimopatias podem ser atribuídas ao acúmulo do substrato, à deficiência do produto ou a alguma combinação de ambos (Fig. 12.8).
3. **Substratos difusíveis versus macromoleculares.** Uma distinção importante pode ser feita entre os defeitos enzimáticos nos quais o substrato é uma molécula “pequena”, tal como a fenilalanina, que pode ser prontamente distri-

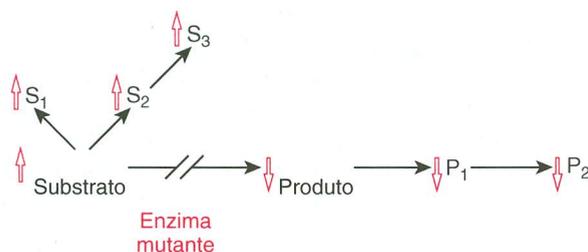


Fig. 12.8 Um modelo de via metabólica mostrando que os efeitos potenciais de uma deficiência enzimática incluem o acúmulo do substrato (S) ou dos derivados dele (S1, S2, S3), ou a deficiência do produto (P) ou dos compostos (P1, P2) feitos a partir dele. Em alguns casos, os substratos derivados normalmente são apenas metabólitos secundários que são formados em taxas aumentadas quando o substrato se acumula (p. ex., o fenilpiruvato na fenilcetonúria).

buída pelos líquidos corpóreos por difusão ou transporte, e os defeitos nos quais o substrato é uma macromolécula, tal como um mucopolissacarídeo, que permanece preso dentro de sua organela ou célula. A patologia das doenças macromoleculares é confinada aos tecidos nos quais o substrato se acumula, enquanto o sítio da doença nos distúrbios de pequenas moléculas em geral é imprevisível, pois o substrato não-metabolizado — ou seus derivados — pode mover-se livremente pelo corpo, danificando células que normalmente podem não ter relação com a enzima afetada.

4. **Perda de múltiplas atividades enzimáticas.** Um único paciente pode ter uma perda de função em mais de uma enzima. Existem vários mecanismos possíveis:
 - (a) As enzimas podem usar o mesmo co-fator (p. ex., deficiência de BH_4);
 - (b) As enzimas podem compartilhar uma subunidade comum ou uma proteína ativadora, de processamento ou estabilizadora (p. ex., as gangliosidoses G_M2);
 - (c) As enzimas podem ser processadas por uma enzima modificadora comum e, em sua ausência, podem ser inativas ou sua captação por uma organela pode estar prejudicada (p. ex., doença da célula I); e
 - (d) Um grupo de enzimas pode estar ausente ou ser ineficaz se a organela na qual normalmente estas enzimas são encontradas for anormal (p. ex., os distúrbios de biogênese de peroxissomo).
5. **Homologia fenotípica.** As características patológicas e clínicas que resultam de um defeito enzimático em geral são compartilhadas (a) pelas doenças decorrentes de deficiências de outras enzimas que funcionam na mesma área do metabolismo (p. ex., as mucopolissacaridoses) e (b) pelas diferentes doenças que podem resultar de defeitos parciais e completos da enzima. Os defeitos parciais em geral se manifestam com anomalias clínicas que são um subgrupo daquelas encontradas na deficiência completa, embora a relação etiológica entre as duas doenças possa não ser imediatamente óbvia (p. ex., a deficiência parcial de HPRT, que causa apenas hiperuricemia, versus a grave deficiência de HPRT, que causa a síndrome de Lesch-Nyhan).

única com subsequente dispersão pelo nordeste da Europa. Tendo em vista o aumento de risco de enfisema, a deficiência de α_1 -AT é um importante problema de saúde, afetando 100.000 pessoas só nos EUA.

A mutação no alelo Z (Glu342Lis) diminui a taxa de inibição de elastase pela α_1 -AT. A patologia hepática da proteína Z parece refletir uma nova propriedade: sua tendência a se agregar ao retículo endoplasmático granular dos hepatócitos. Embora a α_1 -AT normal seja rapidamente secretada pelo fígado, os pacientes Z/Z têm apenas 15% da concentração plasmática normal de α_1 -AT. A agregação da proteína Z parece ser responsável por sua captação pelo retículo endoplasmático granular dos hepatócitos. A base molecular desta agregação ou insolubilidade não está clara, mas Glu342 parece ser crucial para o dobramento ou a estabilidade normal, ou ambos, da molécula. A presença de α_1 -AT no fígado é tida como responsável pela doença hepática. Conseqüentemente, como

na mutação da anemia falciforme, o alelo Z é um forte exemplo de uma mutação que confere uma propriedade nova (ver Fig. 11.1) que é responsável pela doença, perturbando o funcionamento normal da proteína em um grau muito menor. Cerca de 17% dos homozigotos que apresentam icterícia neonatal e cerca de 25% deste grupo subsequente desenvolvem cirrose.

DEFICIÊNCIA DE ALFA₁-ANTITRIPSINA COMO UMA DOENÇA ECOGENÉTICA

A doença pulmonar deve-se ao nível plasmático diminuído de α_1 -AT, que altera o equilíbrio normal entre a elastase e a α_1 -AT e permite a degradação progressiva da elastina das paredes alveolares. O progresso do enfisema é muito aumentado pelo fumo e é um poderoso exemplo do efeito que os fatores ambientais podem ter no fenótipo de uma doença genética. Assim,

Fig.
va c
tura

par:
de i
cer
cul
met
pela
a el
(
AT,
nóti
tica
iden
doe
dro;
gen
inve
os n
No
farm

DE

O re
feito
Gol
baix
cole
tabo
sup
repr
corr
no C

Hip
Hip

As h
func

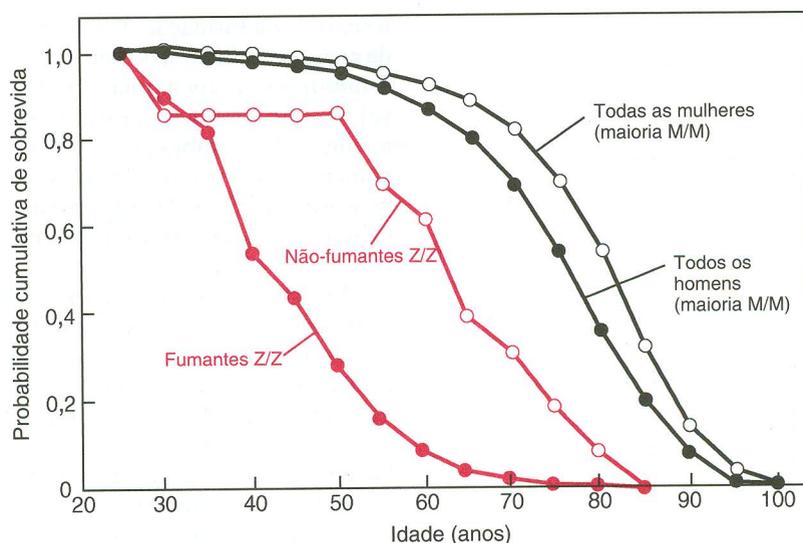


Fig. 12.9 O efeito do fumo na sobrevivência dos pacientes com deficiência de α_1 -antitripsina. As curvas mostram a probabilidade cumulativa de sobrevivência em idades específicas de fumantes com e sem a deficiência de α_1 -antitripsina. (Redesenhado de Larrson C. [1978] Natural history and life expectancy in severe α_1 -antitrypsin deficiency, Pi Z. Acta Med Scand 204:345-351.)

para pessoas com o genótipo Z/Z, a sobrevivência após os 60 anos de idade é de cerca de 60% nos não-fumantes, mas de apenas cerca de 10% nos fumantes (Fig. 12.9). Uma explicação molecular para o efeito do fumo é que o sítio ativo da α_1 -AT, na metionina 358, é oxidado tanto pelo fumo de cigarros quanto pelas células inflamatórias, reduzindo, assim, sua afinidade com a elastase em 2.000 vezes.

O campo da **ecogenética**, ilustrado pela deficiência de α_1 -AT, ocupa-se com a interação dos fatores ambientais e os genótipos humanos diferentes. É provável que esta área da genética médica adquira crescente importância à medida que forem identificados genótipos que causem um aumento de risco de doença com a exposição a alguns agentes ambientais (p. ex., drogas, substâncias industriais e vírus). Além disso, a variação genética que em si não produz a doença será objeto de crescente investigação na procura da contribuição genética dos distúrbios não-mendelianos, tais como a diabetes melito (ver Cap. 15). No momento, a área mais desenvolvida da ecogenética é a da farmacogenética, que será revista ao final deste capítulo.

DEFEITOS DE PROTEÍNAS RECEPTORAS

O reconhecimento de uma classe de doenças decorrentes de defeitos em moléculas receptoras começou com a identificação, por Goldstein e Brown, em 1974, do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como o polipeptídeo afetado na hipercolesterolemia familiar. Sua descoberta esclareceu muito o metabolismo normal do colesterol e a biologia dos receptores de superfície celular em geral. A deficiência do receptor de LDL é representativa de vários distúrbios hoje reconhecidos como decorrentes de defeitos de receptor, alguns dos quais são citados no Quadro 12.1.

Hipercolesterolemia Familiar: Uma Hiperlipoproteinemia Genética

As hiperlipoproteinemias genéticas são de significado clínico em função de seu papel no infarto do miocárdio, uma importante

causa de morte e incapacidade. As hiperlipoproteinemias são caracterizadas por níveis elevados de lipídeos plasmáticos (colesterol, triglicerídeos, ou ambos) e de lipoproteínas plasmáticas específicas. Várias formas monogênicas distintas com fenótipos clínicos e bioquímicos diferentes já foram definidas, embora em alguns casos os fenótipos ainda não tenham sido completamente caracterizados. Em cada locus, pode haver mais de um alelo mutante.

A **hipercolesterolemia familiar** é um dos vários distúrbios agrupados como tipo familiar 2 de hiperlipoproteinemia. Caracteriza-se pela elevação do colesterol plasmático levado pela LDL, a principal proteína de transporte do colesterol no plasma. A doença deve-se a mutações no gene estrutural que codifica o receptor de LDL, uma proteína de superfície celular responsável pela ligação de LDL e por seu encaminhamento para o interior da célula. Tanto os heterozigotos quanto os homozigotos desenvolvem doença cardíaca prematura em consequência de ateromas (depósitos de colesterol derivado de LDL nas artérias coronarianas), xantomas (depósitos de colesterol na pele e tendões; ver Fig. 5.13) e *arcus corneae* (depósitos de colesterol ao redor da periferia da córnea). Poucas doenças foram tão bem caracterizadas. A seqüência de eventos patológicos do locus afetado até seu efeito nas pessoas e populações foi bem documentada.

Genética. A hipercolesterolemia familiar é herdada como uma característica autossômica dominante. São conhecidos tanto fenótipos homozigotos quanto heterozigotos, e um claro efeito de dosagem gênica é evidente: a doença manifesta-se mais cedo e de forma mais grave nos homozigotos que nos heterozigotos (ver Fig. 5.13), refletindo a maior redução no número de receptores de LDL e a maior elevação de colesterol LDL no plasma (Fig. 12.10). Os homozigotos podem ter doença cardíaca coronariana clinicamente significativa na infância, e poucos vivem além da terceira década. Embora a forma homozigota seja rara (1 pessoa em 1 milhão), a forma heterozigota, com uma freqüência populacional de pelo menos 1 em 500, é um dos distúrbios monogênicos humanos mais comuns. Os heterozigotos têm níveis de colesterol plasmático que são cerca de

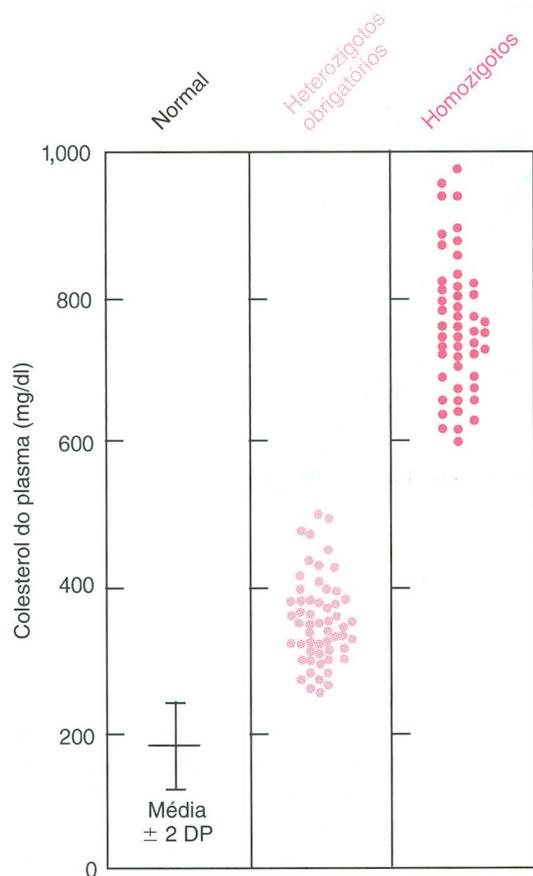


Fig. 12.10 Dosagem gênica na deficiência de lipoproteína de baixa densidade (LDL): a distribuição dos níveis totais de colesterol do plasma em 49 pacientes homozigotos para a deficiência de receptor de LDL, em seus genitores (heterozigotos obrigatórios), e em controles normais. (Redesenhado de Goldstein J. L., Brown M. S. [1989] *Familial hypercholesterolemia*. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 6.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1.215-1.250.)

dobro dos controles (Fig. 12.10). Devido à natureza genética da hipercolesterolemia familiar, é importante fazer o diagnóstico nos cerca de 5% dos sobreviventes de infartos que são heterozigotos para um defeito do receptor de LDL. Entretanto, apenas cerca de 1 em 20 pessoas da população em geral com aumento de colesterol plasmático e um padrão de hiperlipoproteína tipo 2 tem hipercolesterolemia familiar, enquanto a maioria tem uma hipercolesterolemia não-caracterizada de origem multifatorial.

Captação de Colesterol pelo Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade. As células normais obtêm colesterol, um componente essencial das membranas e precursor de hormônios esteróides e sais biliares, seja por síntese *de novo* ou por captação do plasma de colesterol exógeno ligado à LDL. O processo de captação é mediado pelo receptor da LDL, que reconhece a apoproteína B-100, a fração proteica da LDL. Os receptores de LDL na superfície celular estão localizados em depressões revestidas delimitadas pela proteína clatrina (Fig. 12.11). A LDL ligada ao receptor é levada para a célula pela invaginação das depressões revestidas, que ao final se unem a lisossomos onde a LDL é hidrolisada para liberar colesterol livre. O aumento de colesterol intracelular

livre reduz a formação de colesterol endógeno pela supressão da enzima limitadora de velocidade da via sintética (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, ou HMG CoA redutase). O colesterol desnecessário para o metabolismo celular ou a síntese da membrana pode ser reesterificado para armazenamento como ésteres de colesterol, um processo estimulado pela ativação de acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT). O aumento de colesterol também reduz a síntese do receptor (Fig. 12.11).

O receptor maduro de LDL tem cinco domínios estruturais distintos que, em sua maior parte, têm funções distintas. Algumas destas regiões são codificadas por éxons únicos ou por grupos de éxons que codificam regiões que são homólogas a domínios em outros polipeptídeos (Fig. 12.12). A análise do efeito das mutações no receptor nos vários domínios teve uma parte importante no estabelecimento de muitos dos domínios. Estes estudos exemplificam a importante contribuição que a análise genética pode ter na determinação da relação estrutura-função de uma proteína.

CLASSES DE MUTAÇÕES NO RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Foram identificadas mais de 400 mutações diferentes no gene do receptor de LDL, mutações estas que estão distribuídas pela seqüência. Dezesseis por cento de todas as mutações documentadas são grandes rearranjos estruturais, mas, como é o caso em muitos loci, este tipo de mutação é responsável apenas por 2% a 10% dos alelos do receptor de LDL na maioria das populações. Os alelos restantes são substituições de um único nucleotídeo, pequenas inserções ou deleções. Em algumas populações endogâmicas, alelos específicos podem contribuir para uma grande fração das mutações, o que provavelmente reflete um efeito do fundador (ver Cap. 7).

As culturas de fibroblastos dos pacientes afetados têm sido usadas para caracterizar os receptores mutantes e os distúrbios resultantes no metabolismo de colesterol. As mutações no gene do receptor de LDL podem ser agrupadas em cinco classes, dependendo de qual etapa do itinerário celular normal do receptor foi prejudicada pela mutação (ver Fig. 12.11). As **mutações classe 1** são alelos nulos que evitam a síntese de qualquer receptor detectável. Elas são o tipo mais comum de mutações causadoras de doenças neste locus. Alguns alelos classe 1 são decorrentes de deleções, enquanto outros produzem quantidades normais de mRNA para receptor de LDL e supostamente têm defeitos que impedem a formação ou a estabilidade do polipeptídeo. Nas quatro classes restantes, o receptor é sintetizado normalmente, mas seu funcionamento está prejudicado.

As mutações nas classes 2 e 4 (ver Fig. 12.11) definem características do polipeptídeo cruciais para sua localização subcelular. As **mutações classe 2**, relativamente comuns, são chamadas de *deficientes de transporte* porque os receptores de LDL se acumulam no sítio de sua síntese, o retículo endoplasmático, em vez de serem transportados para o complexo de Golgi. Supõe-se que estes alelos impeçam o dobramento apropriado da proteína, aparentemente um requisito para a saída do retículo endoplasmático.

Os **receptores mutantes classe 3** atingem a superfície celular, mas são incapazes de ligar LDL (ver Fig. 12.11). Conseqüentemente, estes alelos permitiram que os pesquisadores identificassem o domínio de ligação de LDL (ver Fig. 12.12). Em um mutante deste tipo, um crossing desigual decorrente de desali-

Fig. que men ando é evi (C) a de B hom

nar delet hom va de to ne A tor n do n ram xila ende que t na n míni gaçã reve: A (ver) ção d medi

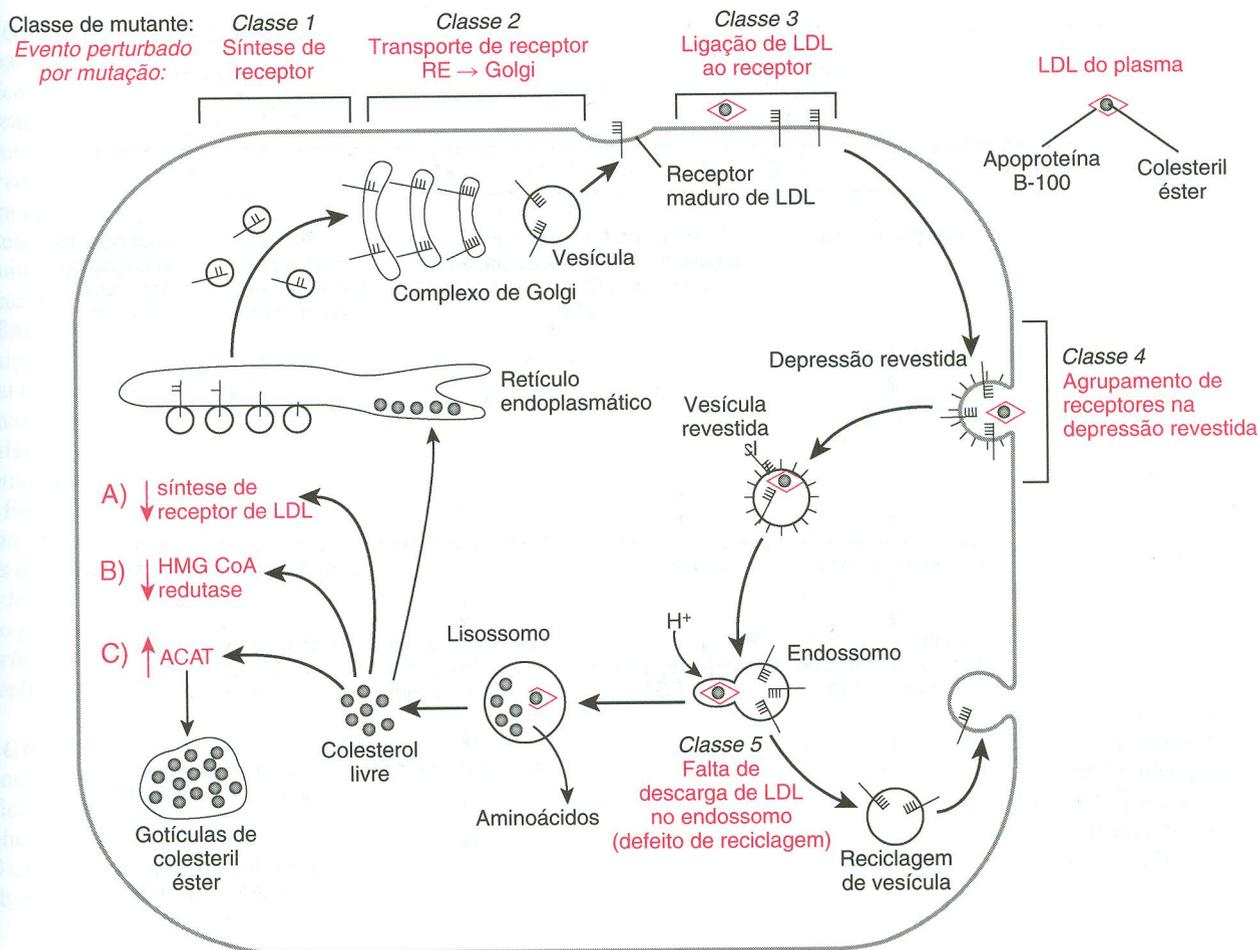


Fig. 12.11 A biologia celular e o papel bioquímico do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e as cinco classes de mutações que alteram sua função. Após a síntese no retículo endoplasmático, o receptor é transportado para o aparelho de Golgi e, subsequentemente, para a superfície celular. Os receptores normais estão localizados nas depressões revestidas por clatrina, que se invaginam, criando vesículas revestidas e então endossomos, os precursores dos lisossomos. Normalmente, o acúmulo intracelular de colesterol livre é evitado porque o aumento de colesterol livre (A) diminui a formação de receptores de LDL, (B) reduz a síntese *de novo* de colesterol e (C) aumenta o armazenamento de colesterol ésteres. O fenótipo bioquímico de cada classe de mutação é discutido no texto. (Modificado de Brown M. S., Goldstein J. L. [1985] The LDL receptor and HMG-CoA reductase — two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr Top Cell Regul* 26:3-15.)

nhamento e recombinação entre as seqüências de repetição *Alu* deletou parte do domínio de ligação de LDL. A recombinação homóloga desigual entre duas cópias de uma seqüência repetitiva de DNA foi vista como uma causa freqüente de deleções tanto neste gene quanto nos outros (ver Cap. 6).

As **mutações classe 4** prejudicam a localização do receptor na depressão revestida e, conseqüentemente, o LDL ligado não é internalizado (ver Fig. 12.11). Estas mutações alteram ou retiram o domínio citoplasmático no terminal carboxila do receptor, demonstrando que normalmente esta região endereça o receptor para a depressão revestida. Acredita-se que um destes alelos, uma substituição de tirosina por cisteína no éxon 17 (ver Fig. 12.12), altere a conformação do domínio citoplasmático do receptor, interferindo, assim, na ligação à proteína que direciona a incorporação à depressão revestida.

As **mutações classe 5** são alelos com defeito de reciclagem (ver Fig. 12.11). A reciclagem dos receptores requer a dissociação do receptor e do LDL ligado no endossomo. A dissociação é mediada pelo domínio de homologia do precursor do fator de

crescimento epidérmico (ver Fig. 12.12). As mutações neste domínio, ambas deleções de segmentos dele, bem como algumas substituições de sentido trocado, impedem a liberação do ligando. Esta falha leva à degradação do receptor, supostamente porque ele não pode retornar para a superfície da célula em um estado desocupado.

Patogenia das Placas Ateroscleróticas na Hipercolesterolemia Familiar. A despeito do grande conhecimento da biologia normal dos receptores de LDL e de seus defeitos moleculares na hipercolesterolemia familiar, os mecanismos pelos quais a elevação de LDL leva à formação das placas ateroscleróticas nas artérias não estão claros. Nos homozigotos, o aumento de LDL é eliminado do líquido extracelular por vias *independentes de receptor*, incluindo a captação por células removedoras, tais como os macrófagos. Os estudos de macrófagos *in vitro* mostram que o excesso de colesterol é estocado como gotículas de colesterol éster, produzindo o aspecto de célula espumosa tipicamente visto nos xantomas e nas placas ateroscleróticas, mas no momento a relevância *in vivo* deste trabalho é incerta.

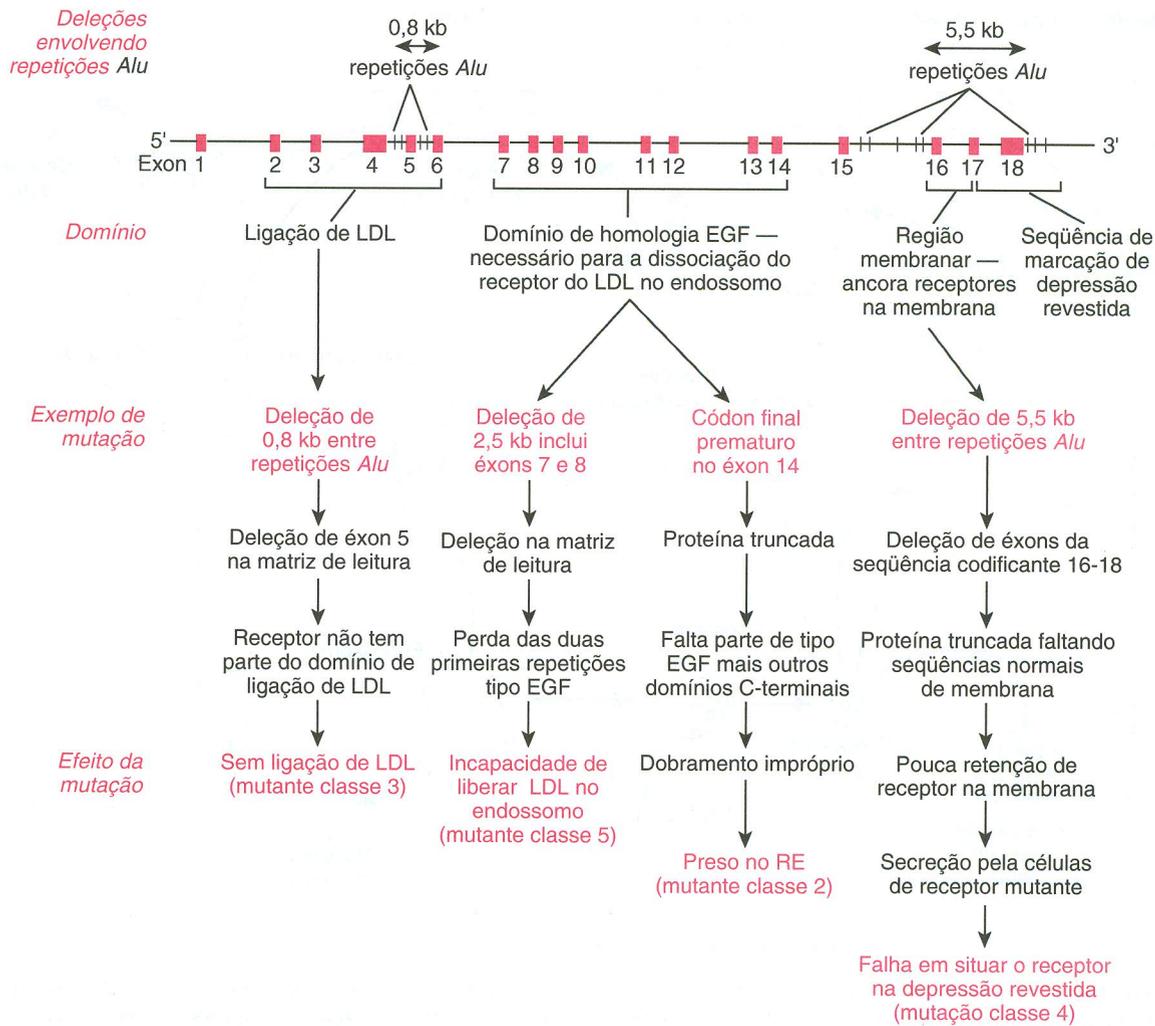


Fig. 12.12 A estrutura do gene receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) mostrando seus cinco domínios e a localização de mutações selecionadas que levam à hipercolesterolemia familiar. O tamanho de várias deleções é indicado pelas barras horizontais acima do gene (com éxons indicados em vermelho). EGF = domínio de homologia do precursor do fator de crescimento epidérmico. RE = retículo endoplasmático. Os éxons, íntrons e repetições *Alu* estão apenas aproximadamente em escala. (Modificado de Goldstein J. L., Brown M. S. [1989] *Familial hypercholesterolemia*. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 6.^a ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1.215-1.250.)

DEFEITOS DE TRANSPORTE

Fibrose Cística

Desde a década de 1960, a CF tem sido a mais pública de todas as doenças genéticas humanas. É o distúrbio genético autossômico recessivo fatal mais comum de crianças nas populações caucasianas, com uma incidência de aproximadamente 1 em 2.500 nascimentos de caucasianos e uma frequência de portadores de cerca de 1 em 25. A clonagem posicional (ver Cap. 8) do gene *CF* (chamado *CFTR*) em 1989 juntamente com o isolamento do gene da distrofia muscular Duchenne três anos antes foram os primeiros frutos importantes da promessa de que a biologia molecular colocaria os genes envolvidos nas doenças hereditárias nas mãos dos cientistas médicos, mesmo que inicialmente não se soubesse nada sobre a localização do locus afetado ou a função de seu produto normal. Logo após o gene ser clonado, as análises fisiológicas demonstraram que a proteína codificada pelo gene *CFTR* é um canal de Cl^- situado na membrana apical das células epiteliais afetadas pela doença.

Os Fenótipos da Fibrose Cística. Os pulmões e o pâncreas exócrino são os principais órgãos afetados pela doença, mas uma importante característica diagnóstica é o aumento das concentrações de Na^+ e Cl^- no suor (o que em geral é inicialmente observado quando os pais beijam seus filhos). Na maioria dos pacientes com CF, o diagnóstico pode ser baseado em achados pulmonares ou pancreáticos e no nível elevado de cloreto no suor (mais de 60 mEq/l). Menos de 2% dos pacientes têm cloreto normal no suor, mas apresentam um quadro clínico típico. Nestes casos, a análise molecular pode ser usada para avaliar se eles têm mutações no locus *CF*.

A doença pulmonar obstrutiva crônica desenvolve-se como um resultado de secreções espessas e infecções recorrentes, e as deficiências de enzimas pancreáticas (lipase, tripsina, quimotripsina) impedem a digestão normal. O intenso tratamento da doença pulmonar prolonga a vida, e a digestão e a nutrição podem ser amplamente restauradas por suplementos de enzimas pancreáticas. A morte resulta de insuficiência pulmonar e infecções. No momento, cerca de metade dos pacientes sobrevive até os 26 anos de idade, mas o curso clínico é variável. Cerca de 15% dos paci-

entes com CF têm função exócrina pancreática residual suficiente para a digestão normal e são chamados de *suficientes pancreáticos*. Além disso, os pacientes com CF que são suficientes pancreáticos têm melhor crescimento e funcionamento pulmonar, bem como um prognóstico geral superior aos *insuficientes pancreáticos*, que são maioria. A heterogeneidade clínica da doença pancreática é, pelo menos em parte, decorrente de heterogeneidade alélica, como será discutido mais adiante.

Muitos outros fenótipos são observados em pacientes com CF. Por exemplo, a obstrução pós-natal do trato intestinal inferior (**meconônio íleo**) ocorre em 10% a 20% dos neonatos com CF. Sua presença requer que o diagnóstico de CF seja excluído. O trato genital também é afetado. Embora as mulheres com CF tenham alguma redução da fertilidade, mais de 95% dos homens com CF são inférteis porque não têm *vas deferens*, um fenótipo conhecido como **ausência bilateral congênita de vas deferens** (CBAVD). Em um marcante exemplo de heterogeneidade alélica que origina um fenótipo parcial, observou-se que alguns homens inférteis que sob outros aspectos estão bem (não têm outros fenótipos de CF) têm CBAVD associada a alelos mutantes específicos no gene CF. Similarmente, algumas pessoas com **pancreatite crônica idiopática** possuem mutações no gene CF, embora não tenham outros sinais clínicos de CF.

O Gene de Fibrose Cística e a Proteína Cfr. O gene CF no cromossomo 7q31 tem cerca de 250 kb de DNA, e a região codificante, com 27 éxons, é prevista codificando uma grande proteína integrante da membrana com cerca de 170 kD (Fig. 12.13). Com base nas anomalias fisiológicas do transporte transmembranar de íons observado na CF, o polipeptídeo codificado

pelo gene da CF foi chamado de proteína cfr (regulador de condutância transmembranar de CF). Sua seqüência primária de aminoácidos indica que ela pertence à família ABC (ATP [trifosfato de adenosina]-cassete de ligação) de proteínas de transporte. Demonstrou-se que pelo menos sete outras doenças resultam da perda de função de transportadores ABC específicos.

O canal cfr Cl^- é caracterizado por cinco domínios, mostrados na Fig. 12.13: dois domínios membranares (MSDs), cada um com seis seqüências transmembranares, dois domínios de ligação-(ATP) de nucleotídeo (NBDs) e um domínio regulador (R) com múltiplos sítios de fosforilação. A importância de cada domínio é demonstrada pela identificação de mutações de sentido trocado causadoras de CF em cada um deles (Fig. 12.13). O poro do canal Cl^- é formado por 12 segmentos transmembranares. O ATP é ligado e hidrolisado por NBDs, e a energia liberada é usada para o transporte de íons. A regulação do canal é mediada, pelo menos em parte, pela fosforilação do domínio R.

Defeitos Fisiopatológicos na Fibrose Cística. Como manifestado pelo aumento dos níveis de Na^+ e Cl^- , a CF é devida ao transporte anormal de eletrólitos através das membranas epiteliais apicais. Esta anomalia leva à patologia nos pulmões, no pâncreas, no intestino, na árvore hepatobiliar e no trato genital masculino. As anomalias fisiológicas foram mais claramente elucidadas para as glândulas sudoríparas: a perda de função de cfr significa que o Cl^- no duto da glândula sudorípara não pode fluir pela luz e através das células do duto para a corrente sanguínea. Em conseqüência, o gradiente eletroquímico que normalmente ativa a entrada de Na^+ através da membrana apical está ausente ou diminuído, o que leva a um aumento secundário na

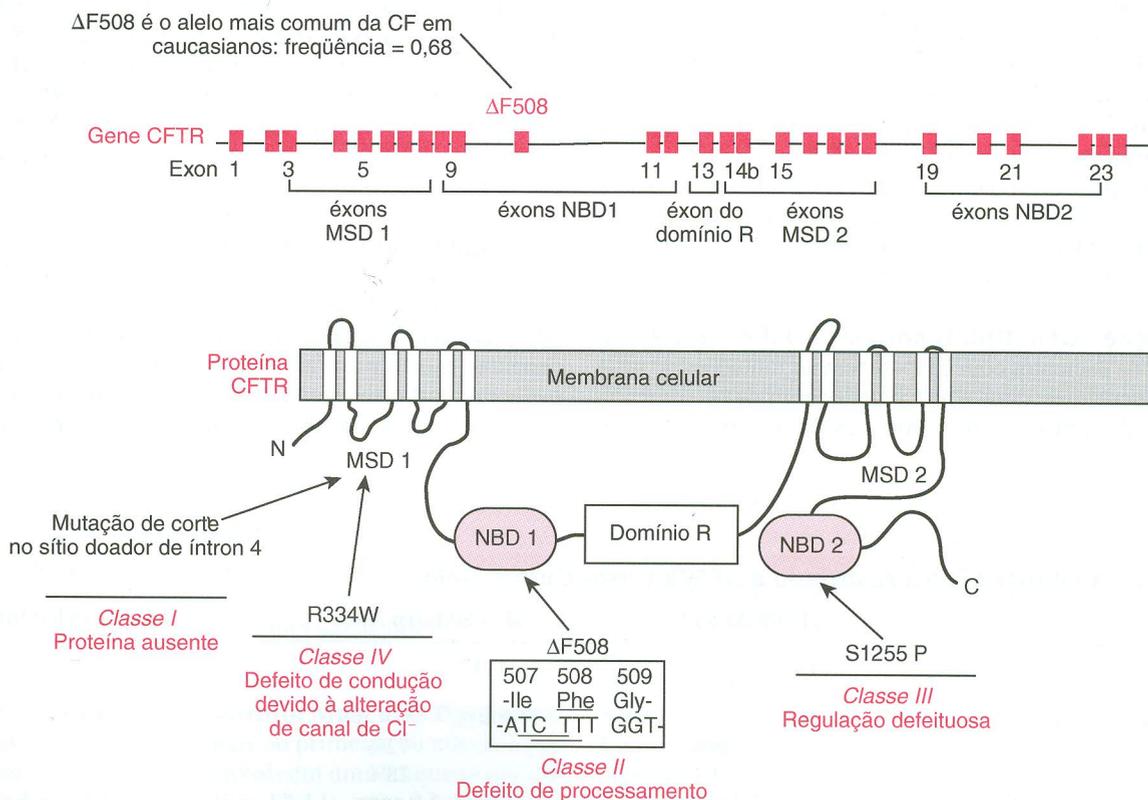


Fig. 12.13 A estrutura do gene *CFTR* e um esquema da proteína cfr. São mostradas mutações selecionadas. Os éxons, íntrons e domínios da proteína não estão desenhados em escala. (Baseado em Zielinski J. [2000] Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67:117-133.)

concentração de Na^+ na luz do ducto sudoríparo. Os efeitos no transporte de eletrólitos devidos a anomalias na proteína *cftr* também foram cuidadosamente estudados no epitélio das vias aéreas e pancreático. Em cada caso, o defeito fundamental está no transporte de Cl^- , mas os processos gerais são complexos, incompletamente compreendidos e estão além do escopo desta discussão.

A GENÉTICA DA FIBROSE CÍSTICA

Mutações no Polipeptídeo C_{fr}. A primeira mutação de CF identificada, uma deleção de uma fenilalanina na posição 508 ($\Delta F508$) na primeira dobra de ligação de ATP (NBD1; Fig. 12.13), é o defeito mais comum, contribuindo com cerca de 70% de todos os alelos CF nas populações caucasianas. Nestas populações, apenas outras sete mutações são mais frequentes que 0,5% e, portanto, a maioria é rara. Foram identificadas mutações de todos os tipos, mas o maior grupo isolado (quase metade) é de substituições de sentido trocado. O restante são mutações de ponto de outros tipos, e menos de 1% são rearranjos genômicos. Embora mais de 800 mudanças de seqüências do gene CF tenham sido associadas à doença, o número real de mutações de sentido trocado causadoras de doença ainda é incerto, pois poucas foram submetidas à análise funcional.

Embora as anomalias bioquímicas associadas a maioria das mutações CF não sejam conhecidas, quatro mecanismos gerais de disfunção proteica foram descritos. Os alelos representativos de cada uma destas quatro classes são mostrados na Fig. 12.13. As mutações de classe I são as que têm um defeito na produção da proteína, tais como as associadas a códons finalizadores prematuros ou mutações que geram RNAs instáveis. Como a *cftr* é uma proteína glicosilada da membrana, ela deve ser processada no retículo endoplasmático (RE) e Golgi para ser glicosilada e secretada. As mutações da classe II são o resultado de processamento proteico defeituoso decorrente de mau dobramento da proteína. O mutante $\Delta F508$ tipifica esta classe. Este mutante não se dobra normalmente o suficiente para permitir sua saída do RE.

As funções essenciais de NBDs e o domínio R (Fig. 12.13) são ilustrados pela ocorrência das mutações causadoras de CF que perturbam a regulação da proteína (mutações classe III). As mutações classe IV estão situadas em MSDs e, compatível com esta localização, têm condução defeituosa de cloreto.

Correlações Genótipo-fenótipo na Fibrose Cística.

Como todos os pacientes com CF parecem ter mutações no gene CF, a heterogeneidade clínica na CF deve surgir da heterogeneidade alélica, de efeitos de outros loci modificadores ou de fato-

res não-genéticos. Surgiram duas generalizações da análise genética e clínica dos pacientes CF. Primeiro, o genótipo *CFTR* é um bom predictor do funcionamento pancreático. Por exemplo, os pacientes homozigotos para a mutação comum $\Delta F508$ ou os previstos alelos nulos (tais como códons finalizadores prematuros) em geral têm insuficiência pancreática (Quadro 12.7). Por outro lado, os alelos que permitem a síntese de uma proteína *cftr* parcialmente funcional, tal como Arg334Trp (ver Fig. 12.13), tendem a estar associados à suficiência pancreática. Segundo, há pouca correlação geral entre o fenótipo pulmonar e o genótipo *CFTR*. Por exemplo, entre os pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$, a gravidade da doença pulmonar é muito variável. Os motivos desta pobre correlação pulmonar genótipo-fenótipo não estão claros. Não foram identificados genes modificadores para o fenótipo pulmonar. Um locus modificador para o fenótipo intestinal mecônio íleo da CF foi mapeado no cromossomo 19q13, mas o gene ainda não foi identificado.

O Gene da Fibrose Cística nas Populações. No momento, não é possível explicar a alta frequência alélica da CF de 1 em 45 que é observada nas populações caucasianas (ver Cap. 7). A doença é muito menos frequente em não-caucasianos, embora tenha sido relatada em americanos nativos, afro-americanos e asiáticos (cerca de 1 em 90.000 havaianos de descendência asiática). O alelo $\Delta F508$ é o único encontrado até hoje que é comum em quase todas as populações caucasianas. A análise de haplótipos de populações caucasianas indica que o alelo $\Delta F508$ tem uma só origem. A frequência deste alelo, entre todos os alelos mutantes, varia significativamente em diferentes populações européias, desde 88% na Dinamarca até 45% no sudeste da Itália.

Nas populações nas quais a frequência do alelo $\Delta F508$ é de aproximadamente 70% de todos os alelos mutantes, cerca de 50% dos pacientes são homozigotos para o alelo $\Delta F508$, e 40% adicionais têm genótipos compostos genéticos para $\Delta F508$ e outro alelo mutante. Além disso, aproximadamente 70% dos portadores de CF têm a mutação $\Delta F508$. Exceto para $\Delta F508$, as mutações no locus *CFTR* são raras, embora em populações específicas outros alelos possam ser bem comuns.

Triagem Populacional. As complexas questões que são levantadas na consideração da triagem populacional para doenças tais como a CF serão discutidas no Cap. 20. No momento, a CF atende a maioria dos critérios para um programa de triagem neonatal, exceto pelo fato de ainda não estar claro se a triagem melhora significativamente o prognóstico a longo prazo. Em geral é aceito que a triagem universal não deve ser considerada até que

QUADRO 12-7

O Fenótipo da Fibrose Cística Associado a $\Delta F508$ Versus Outros Alelos

	$\Delta F508/\Delta F508$	$\Delta F508/\text{Outro Alelo}$	Outro Alelo/Outro Alelo
Número de pacientes	151	117	25
% de todos os pacientes	52%	40%	8%
% com PI	99%	72%	36%
% com PS	1%	28%	64%
Idade do diagnóstico (\pm DP)	1,8 \pm 3,3 anos	4,4 \pm 5,9 anos	8,4 \pm 8,3 anos

PI = insuficiência pancreática; PS = suficiência pancreática.

Adaptado de Kerem E., Corey M., Kerem B-S., et al. (1990) The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis: Analysis of the most common mutation ($\Delta F508$). N Engl J Med 323:1517-1522.

pelo n
dores.
5% da
lo à tr

An
tico F
os pa
um di
comb
preve
ção da
com a
diagno
mutaç
ção é
a triag
tradas
princi
todas

Pa
por au
de bió
Cap.
basea
alcali
cisos,
falso
nas q
po pa
família

Ge
ca. N
da inf
cimer
to de j
te o fe
transf
tas di

DIST
Dist
Defe

Como
nidad
túrbic
comu
isolar
racter
sua as
da do
e sug

O
Os m
meirc
lar no
ter di
ção se
por v

pelo menos 95% das mutações possam ser detectadas nos portadores. O fato de que muitas mutações raras constituem mais de 5% das mutações na maioria das populações é um sério obstáculo à triagem.

Análise Genética de Famílias de Pacientes e Diagnóstico Pré-natal. A alta frequência do alelo $\Delta F508$ é útil quando os pacientes CF sem uma história familiar se apresentam para um diagnóstico de DNA. A identificação do alelo $\Delta F508$, em combinação com a análise de haplótipos, pode ser usada para prever a situação dos membros familiares para (1) a confirmação da condição da doença (p. ex., em um neonato ou um irmão com apresentação ambígua), (2) a detecção de portador e (3) o diagnóstico pré-natal. Tendo em vista o grande conhecimento das mutações CF em muitas populações, a detecção direta da mutação é o método de escolha para a análise genética. Tipicamente, a triagem é feita para 10 a 30 das mutações mais comuns encontradas na região geográfica de origem da família em questão. Em princípio, é possível um diagnóstico preciso em absolutamente todas as famílias.

Para fetos com um risco de 1 em 4, o diagnóstico pré-natal por análise de DNA entre 8 e 10 semanas, com tecido obtido de biópsia de vilosidades coriônicas, é o método de escolha (ver Cap. 18). Os métodos bioquímicos de diagnóstico pré-natal baseados na dosagem de enzimas intestinais (p. ex., fosfatase alcalina) no líquido amniótico também são razoavelmente precisos, com uma taxa de falso positivo de 2% a 5% e taxa de falso negativo de 2% a 10%. Este método agora é usado apenas quando o caso índice não está disponível ou quando o tempo para fazer os estudos mutacionais ou de ligação genética na família é insuficiente.

Genética Molecular e o Tratamento da Fibrose Cística. No momento, o tratamento da CF é dirigido para o controle da infecção pulmonar e a melhoria nutricional. Um maior conhecimento da patogenia molecular pode possibilitar o planejamento de intervenções farmacológicas que iriam corrigir diretamente o fenótipo bioquímico anormal. Alternativamente, a terapia de transferência gênica pode ser possível na CF, mas existem muitas dificuldades, como será discutido no Cap. 13.

DISTÚRBIOS DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

Distrofias Musculares Duchenne e Becker: Defeitos na Distrofina

Como a CF, a DMD tem recebido muita atenção tanto da comunidade em geral quanto da comunidade médica porque é um distúrbio grave, até o momento sem tratamento e relativamente comum, associado a uma deterioração clínica progressiva. O isolamento do gene afetado neste distúrbio ligado ao X e a caracterização de sua proteína (chamada de "distrofina" devido à sua associação à DMD) têm dado informações sobre cada aspecto da doença, informação genética melhorada às famílias afetadas e sugestões de tratamento.

O Fenótipo Clínico da Distrofia Muscular Duchenne.

Os meninos afetados são normais no primeiro ou nos dois primeiros anos de vida, mas desenvolvem uma fraqueza muscular no período de 3 a 5 anos (Fig. 12.14), quando começam a ter dificuldade para subir escadas e se levantar de uma posição sentada. A criança fica confinada a uma cadeira de rodas por volta dos 12 anos e sua sobrevivência além dos 20 anos é im-

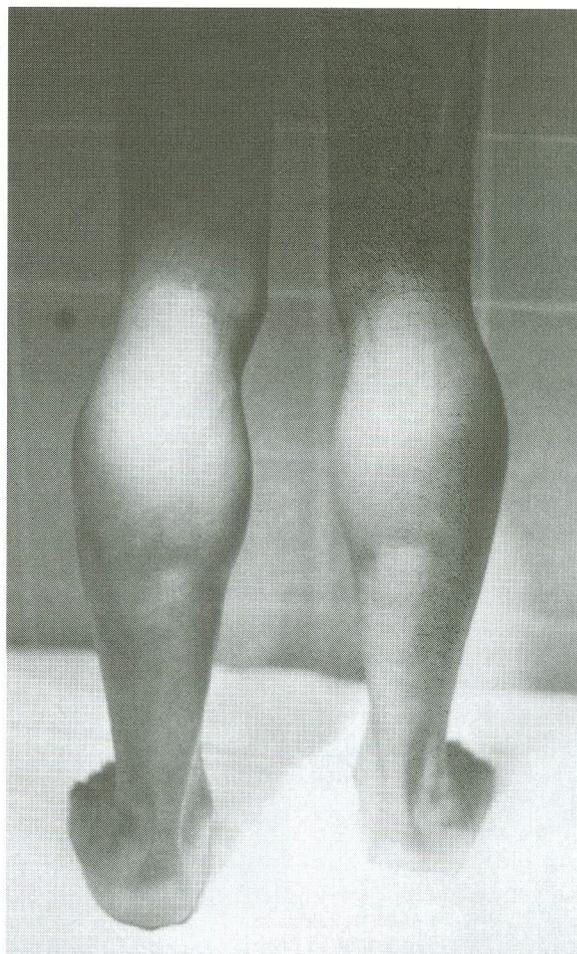


Fig. 12.14 Pseudo-hipertrofia das panturrilhas decorrente de substituição de tecido muscular normal por tecido conjuntivo e gordura em um menino de 8 anos com distrofia muscular Duchenne. (Cortesia de R. H. A. Haslam, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

provável. Os pacientes morrem de insuficiência respiratória ou de insuficiência cardíaca, uma vez que o músculo cardíaco também está afetado. Nos estágios pré-clínico e inicial da doença, o nível de creatina cinase sérica está muito elevado (de 50 a 100 vezes o limite superior do normal) em função de sua liberação pelo músculo afetado. O cérebro também é afetado e em média há uma pequena diminuição de QI de cerca de 20 pontos.

Distrofia Muscular Becker. A BMD também se deve a mutações no gene de distrofina, mas os alelos Becker produzem um fenótipo que é muito mais brando. Diz-se que os pacientes têm BMD se eles ainda estiverem andando aos 16 anos de idade. Há uma variabilidade significativa na progressão da doença, e alguns pacientes continuam andando por muitos anos. Em geral, os pacientes com BMD têm alelos mutados que conservam a matriz de leitura da proteína e assim expressam alguma distrofina, embora em geral um produto alterado em níveis reduzidos. A presença da distrofina no músculo dos pacientes BMD em geral é demonstrável nas transferências Western (ver Fig. 4.14) e por imunofluorescência (Fig. 12.15). Em contraste, os pacientes com DMD têm pouca ou nenhuma distrofina detectável usando ambas as técnicas.

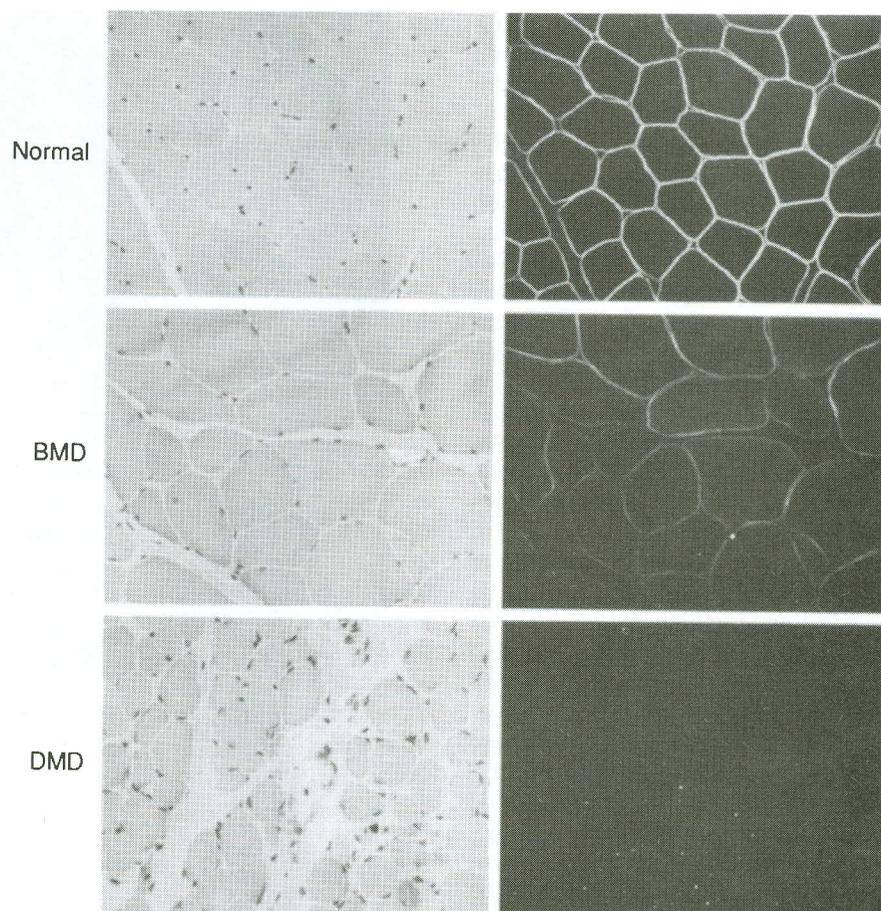


Fig. 12.15 Visualização microscópica do efeito das mutações no gene de distrofina em um paciente com distrofia muscular Becker (BMD) e um paciente com distrofia muscular Duchenne (DMD). Coluna da esquerda = coloração do músculo com hematoxilina e eosina. Coluna da direita = microscopia de imunofluorescência com coloração de um anticorpo específico para distrofina. Notar a localização da distrofina na membrana do miócito no músculo normal, a quantidade reduzida no músculo com distrofina BMD e a ausência total de distrofina nos miócitos do músculo com DMD. A quantidade de tecido conjuntivo entre os miócitos no músculo DMD está aumentada. (Cortesia de K. Arahata, National Institute of Neuroscience, Tokyo.)

A GENÉTICA DA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE E DA DISTROFIA MUSCULAR BECKER

Herança. A DMD tem uma incidência de cerca de 1 em 3.300 nativos masculinos, com uma taxa de mutação calculada em 10^{-4} , uma ordem de grandeza maior que a taxa observada em genes envolvidos na maioria das outras doenças genéticas. Na verdade, considerando-se uma produção de cerca de 8×10^7 espermatozoides por dia, um homem normal produz um espermatozoide com uma nova mutação no gene *DMD* a cada 10 a 11 segundos! No Cap. 5, a DMD foi apresentada como um típico recessivo ligado ao X que é letal nos homens, de modo que se prevê que um terço dos casos seja de mutantes novos e dois terços dos pacientes tenham mães portadoras (ver também Cap. 19). A grande maioria das mulheres portadoras não tem manifestações clínicas, embora 70% tenham níveis levemente elevados de creatina cinase sérica. De acordo com a inativação aleatória do cromossomo X (ver Cap. 5), entretanto, o cromossomo X normal parece ser inativado em uma proporção crítica das células em algumas mulheres heterozigotas. Cerca de 8% das mulheres portadoras adultas têm fraqueza muscular significativa e, em alguns casos, grave incapacidade muscular proximal. Em raros casos, mulheres foram relatadas com DMD (Quadro 12.8). Algumas têm translocações X; autossomo (ver Cap. 10), outras têm

apenas um cromossomo X (síndrome de Turner) com uma mutação *DMD* neste cromossomo e um grupo raro consiste em gêmeas monozigóticas heterozigotas.

A BMD corresponde a cerca de 15% das mutações no locus. Uma importante distinção genética entre estes fenótipos alélicos é que enquanto a DMD é um letal genético, a adaptabilidade reprodutiva dos homens com BMD é bem alta (até cerca de 70% do normal), de modo que podem transmitir o gene para suas filhas. Conseqüentemente, uma alta proporção de casos de BMD é herdada, e alguns (apenas cerca de 10%) representam mutações novas.

O Gene DMD e Seu Produto. A característica mais marcante do gene *DMD* é seu tamanho, avaliado como sendo de 2.300 kb, ou 1,5% do cromossomo X. Este gene enorme, como o gene para a neurofibromatose tipo 1 (NF1) e alguns outros, é o maior conhecido em qualquer espécie, em ordem de magnitude. A alta taxa de mutação pode, portanto, ser explicada em parte pelo fato de que o locus é um alvo grande para mutação. O gene *DMD* é estruturalmente complexo, com 79 éxons, 7 promotores histoespecíficos e recomposição diferencial, originando isoformas histoespecíficas reguladas no desenvolvimento. No músculo, o sítio primário de patologia, o grande transcrito de distrofina (14 kb), codifica uma

QUADRO

Mecanismo de

Duchenne

Deficiência

Em hom

Deleção

a todo

Mutaçã

Duplic

do ge

Deleçã

cont

Em m

Inativa

Síndro

Transl

BMD

enorm

o fen

músc

dos t

Fig

tat

pro

ter

gra

(D

QUADRO 12-8

Mecanismos de Mutação na Distrofia Muscular Duchenne ou Becker

Defeito Molecular ou Genético	Frequência	Fenótipo
Em homens afetados:		
Deleção gênica (1 éxon a todo o gene)	~60%	DMD ou BMD
Mutações de ponto	~34%	DMD ou BMD
Duplicação parcial do gene	~6%	DMD ou BMD
Deleção de genes contíguos	Rara	DMD mais outros fenótipos, dependendo de outros genes deletados
Em mulheres afetadas:		
Inativação não-aleatória do X	Rara	DMD
Síndrome de Turner (45, X)	Rara	DMD
Translocação X;autossomo	Rara	DMD

BMD = distrofia muscular Becker; DMD = distrofia muscular Duchenne.

enorme proteína com 427 kD (Fig. 12.16). Em concordância com o fenótipo clínico da doença, esta proteína é mais abundante nos músculos esqueléticos, cardíaco e no cérebro, embora a maioria dos tecidos expresse pelo menos uma isoforma de distrofina.

A distrofina muscular tem vários domínios homólogos a outras proteínas do citoesqueleto (Fig. 12.16 e Fig. 12.17). A distrofina parece ser uma proteína estrutural, com pelo menos dois papéis principais. Primeiro, é essencial para a manutenção da integridade da membrana muscular, ligando a actina do citoesqueleto à matriz extracelular. Segundo, ela parece ser necessária para a montagem da junção sináptica, pois os membros do complexo transmembranar participam do aglomerado do receptor de acetilcolina durante o desenvolvimento. Como indicado na Fig. 12.17, as mutações em outras proteínas no complexo de glicoproteína da distrofina são responsáveis pelas formas autossômicas recessivas de distrofia muscular similares à Duchenne, distrofia muscular da cintura dos membros e outras distrofias.

Análise Molecular da Distrofia Muscular Duchenne e da Distrofia Muscular Becker. Os defeitos moleculares mais comuns nos pacientes com DMD são as deleções (60% dos alelos) (ver Quadro 12.8, Fig. 12.16 e Fig. 12.18). A distribuição das deleções no gene não é aleatória. Elas estão aglomeradas em uma ou duas regiões dentro do gene, na metade 5' ou na região central que parece incluir um ponto quente de deleção (ver Fig. 12.16). As deleções centrais supostamente resultam de um desalinhamento de pareamento descrito na Fig. 11.8. As mutações de ponto contribuem com cerca de um terço dos alelos e estão distribuídas aleatoriamente pelo gene.

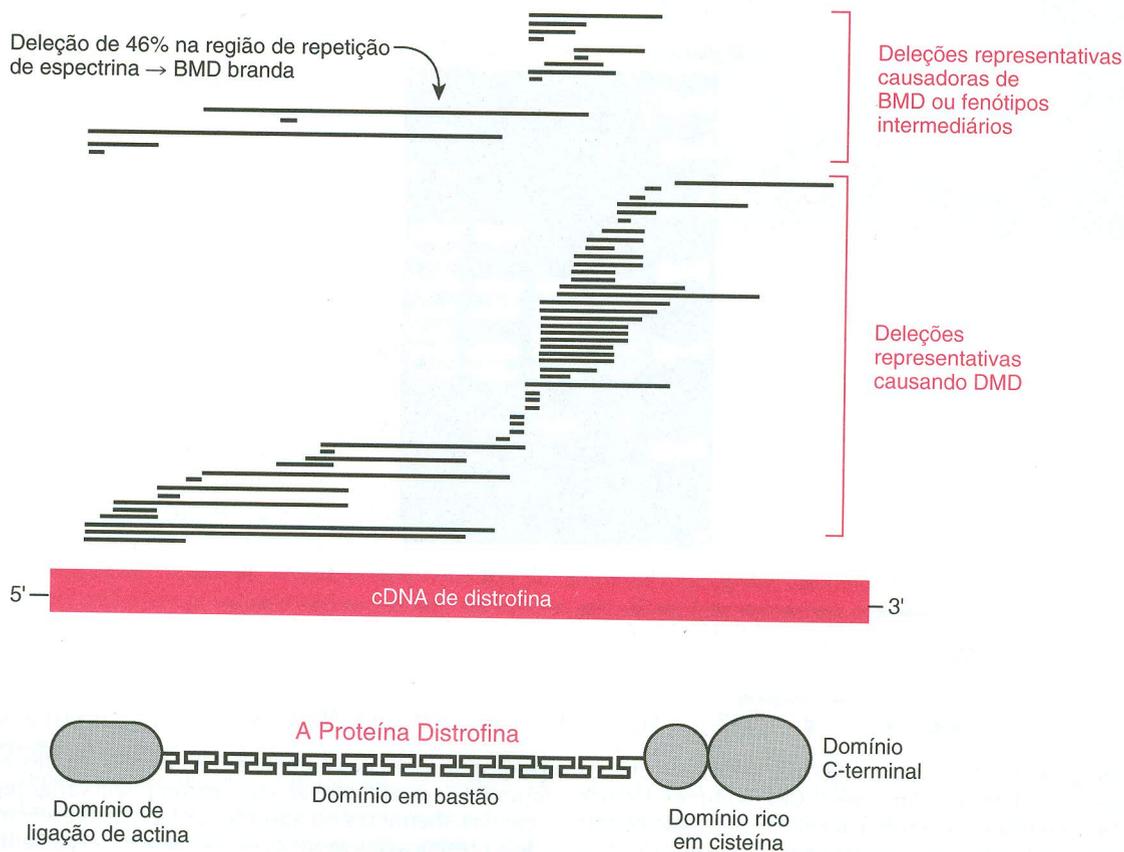


Fig. 12.16 Uma representação do tamanho total da proteína distrofina, o cDNA correspondente e a distribuição das deleções representativas em pacientes com distrofia muscular Becker (BMD) e distrofia muscular Duchenne (DMD). O domínio de ligação da actina liga a proteína ao citoesqueleto filamentar de actina. O domínio em bastão supostamente atua como um espaçador entre os domínios N-terminal e C-terminal. O domínio rico em cisteína medeia as interações proteína-proteína. O domínio C-terminal, que se associa a um grande complexo transmembranar de glicoproteína (ver Fig. 12.17), também é encontrado em três proteínas relacionadas à distrofina (DRPs): utrofina (DRP-1), DRP-2 e distrobrevina. Os domínios proteicos não estão desenhados em escala.

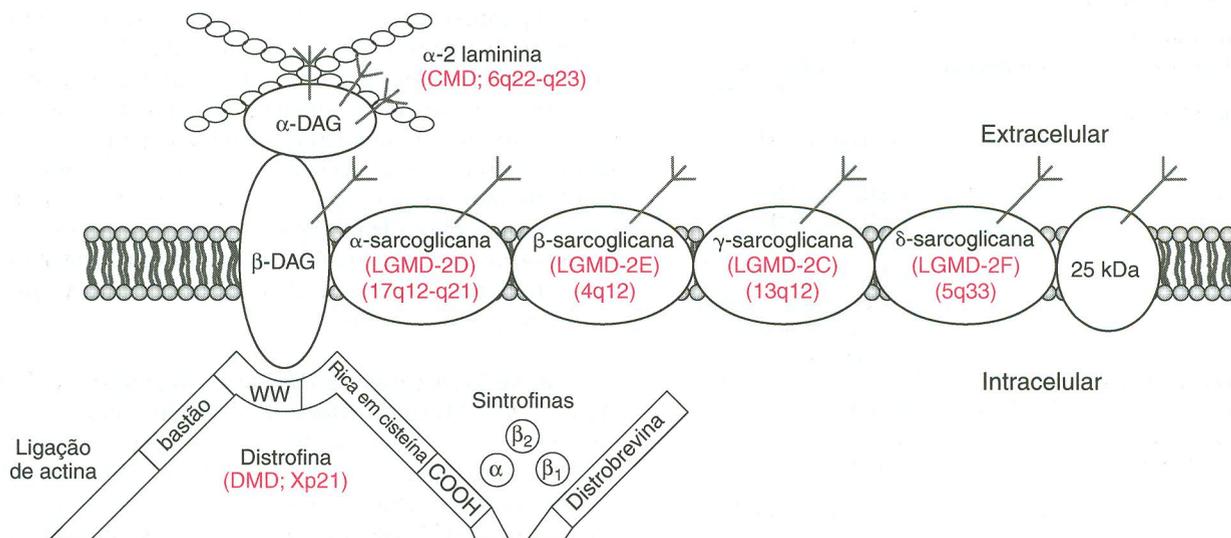


Fig. 12.17 No músculo, a distrofina liga a matriz extracelular (laminina) ao citoesqueleto de actina. A distrofina interage com um complexo multimérico composto de distroglicana (DAG), sarcoglicanas, sintrofinas e distrobrevina. O complexo α,β -distroglicana é um receptor da laminina e agrina na matriz extracelular. A função do complexo sarcoglicana é incerta, mas é integral à função muscular: mutações em sarcoglicanas foram identificadas nas distrofias musculares das cinturas dos membros (LGMD) tipo 2C, 2D, 2E e 2F. Mutações na laminina tipo 2 (merosina) causam uma distrofia muscular congênita (CMD).

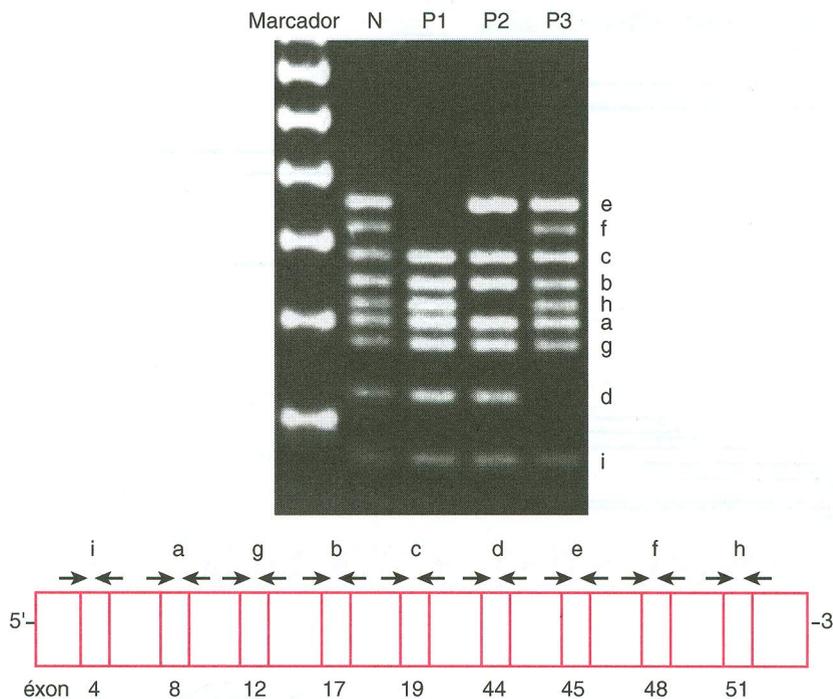


Fig. 12.18 O diagnóstico da distrofia muscular Duchenne envolve a triagem de deleções e duplicações usando um procedimento chamado de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Usando conjuntos de *primer* (*pares de setas*) que ampliam várias regiões do gene (*a-i*) em uma única reação, o DNA do paciente é analisado quanto às bandas aberrantes ou ausentes por eletroforese em gel. A coluna 2 mostra os nove produtos de PCR de uma pessoa normal (*N*), indicando a presença dos éxons correspondentes. O paciente 1 (*coluna P1*) não tem as bandas e e f, o que identifica uma deleção que inclui os éxons 45-48. O paciente 2 (*P2*) não tem as bandas f e h, o que indica uma deleção que envolve os éxons 48-51. O paciente 3 (*P3*) não tem a banda d e, portanto, tem uma deleção que envolve o éxon 44. (Cortesia de P. N. Ray, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

APLICAÇÕES CLÍNICAS DA GENÉTICA MOLECULAR À DISTROFIA MUSCULAR

Diagnóstico Pré-natal e Detecção de Portadoras. Com as técnicas moleculares, o diagnóstico pré-natal preciso está disponível para pacientes com deleções, duplicações e mutações de ponto conhecidas no gene *DMD*. Em 60% a 70% das famílias nas quais a mutação resulta de uma deleção ou duplicação, a presença ou ausência do defeito podem ser avaliadas pelo exame do DNA fetal por transferência de Southern ou, mais comumente, pela análise multiplex de cadeia da polimerase (ver Fig. 12.18). Na maioria das outras famílias nas quais o defeito molecular ainda não foi definido, os marcadores ligados permitem o diagnóstico pré-natal com uma precisão de cerca de 95%. A identificação da condição de portadora ou não-portadora é possível em cerca de 75% das genitoras de um menino afetado usando-se métodos de DNA e testando-se a elevação de creatina cinase sérica.

Mosaicismo Materno. Se um menino com DMD é o primeiro membro afetado de sua família e sua mãe não leva a mutação em seus linfócitos, a explicação usual é que ele tem uma mutação nova no locus *DMD*. Entretanto, cerca de 5% a 15% de tais casos parecem ser decorrentes de mosaicismo na linhagem germinativa materna e, neste caso, o risco de recorrência é significativo (ver Cap. 5).

Terapia. No momento, apenas o tratamento sintomático está disponível para a DMD. As possibilidades de terapia racional para a DMD aumentaram muito com o isolamento do gene de distrofina e a compreensão de seu papel normal no miócito. Algumas das considerações terapêuticas serão discutidas no Cap. 13.

Mutações em Genes de Colágeno: Osteogênese Imperfeita e Síndrome de Ehlers-Danlos

OSTEOGÊNESE IMPERFEITA: DEFEITOS NOS GENES ESTRUTURASIS DE COLÁGENO

A osteogênese imperfeita (OI) é um grupo de distúrbios herdados do colágeno tipo I que predispõe um paciente à fratura fácil dos ossos, mesmo com pequenos traumas, e à deformidade esquelética (Fig. 12.19). Uma grande gama de variações clínicas já foi reconhecida, desde a forma letal perinatal até apenas um leve aumento na frequência de fraturas. Os quatro principais fenótipos são mostrados no Quadro 12.9. A heterogeneidade clínica pode ser explicada, pelo menos em parte, pela heterogeneidade alélica: os fenótipos variam de acordo com que cadeia do pró-colágeno tipo I está afetada e de acordo com o tipo e a localização da mutação no locus. A incidência combinada de todas as formas da doença é de cerca de 1 em 10.000.

Estrutura Normal do Colágeno em Relação à Osteogênese Imperfeita. Algumas características do colágeno tipo I normal são essenciais na avaliação da patogenia da doença. O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural do osso e de outros tecidos fibrosos. A molécula de pró-colágeno tipo I é formada por duas cadeias $\text{pró}\alpha 1(\text{I})$ (codificadas no cromossomo 17) e uma cadeia similar, mas distinta, de $\text{pró}\alpha 2(\text{I})$ (codificada no cromossomo 7) (Fig. 12.20).

As proteínas compostas de subunidades, como o colágeno, em geral são sujeitas a mutações que evitam a associação de subunidades alterando as interfaces de subunidades (ver Quadro 11.1).

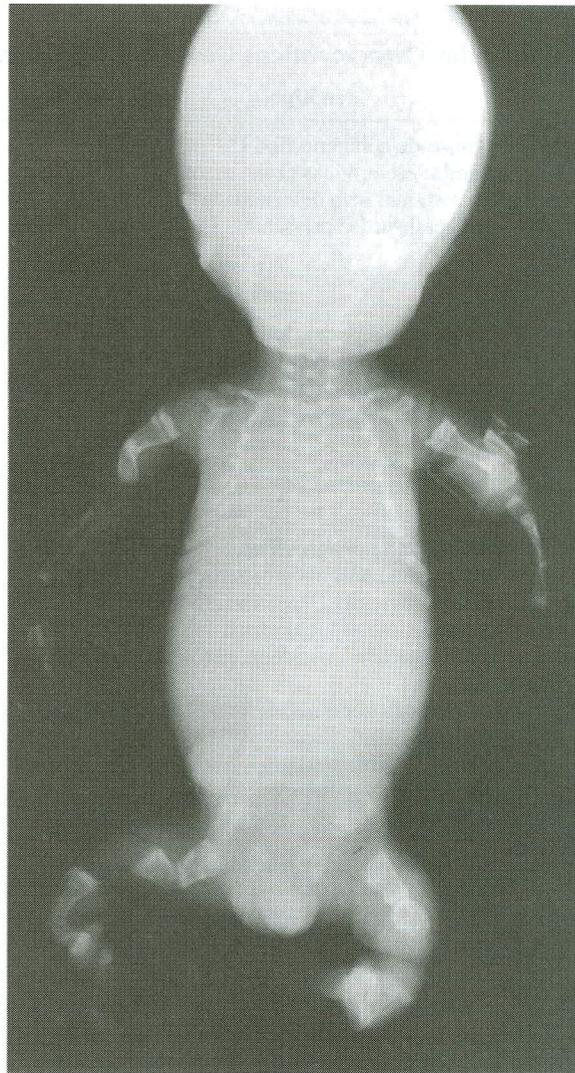


Fig. 12.19 Radiografia de um prematuro (26 semanas de gestação) com a forma letal perinatal (tipo II) de osteogênese imperfeita. O crânio é relativamente grande e não-mineralizado e era mole à palpação. A cavidade torácica é pequena, os ossos longos dos braços e das pernas são curtos e deformados, e os corpos vertebrais são achatados. Todos os ossos são desmineralizados. (Cortesia de T. Costa, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

A seção de hélice tripla (colágeno) é composta de 338 repetições *Gli-X-Y* dispostas em tandem. A prolina em geral está na posição X e a hidroxiprolina ou hidroxilisina em geral está na posição Y. A glicina, o menor aminoácido, é o único compacto o suficiente para ocupar a posição axial da hélice e, conseqüentemente, as mutações que resultam em substituições por outros aminoácidos perturbam muito a estrutura helicoidal.

Várias características da maturação do pró-colágeno são de significado especial para a fisiopatologia da OI. Primeiro, a montagem das cadeias individuais na hélice tripla começa na ponta C e move-se para a ponta N. Conseqüentemente, as mutações na parte C terminal da molécula são mais perturbadoras porque interferem mais cedo na propagação da hélice tripla (Fig. 12.21). Segundo, a modificação pós-traducional (p. ex., hidroxilação, glicosilação de prolina) do pró-colágeno continua em qualquer parte da cadeia não-montada na hélice tripla. Assim, quando a montagem da hélice tripla é diminuída por uma muta-

QUADRO 12-9

Um Resumo das Características Genéticas, Bioquímicas e Moleculares dos Tipos de Osteogênese Imperfeita

Tipo	Fenótipo	Herança	Defeito Bioquímico	Defeito Genético
Produção defeituosa de colágeno tipo I*				
Tipo I	Branda: escleróticas azuis, ossos frágeis, mas sem deformidade óssea; em geral surdez pré-senil	AD	Comum: Todo o colágeno feito é <i>normal</i> (pelo alelo normal), mas a quantidade é <i>reduzida</i> à metade. Raramente, substituições de gli (ver Fig. 12.21)	Comum: Alelos nulos que prejudicam a produção de cadeias pró $\alpha 1(I)$, tais como defeitos que interferem na síntese de mRNA
Defeitos estruturais no colágeno tipo I				
Tipo II	Letal perinatal: graves anomalias (fraturas, deformidades), escleróticas escuras, morte dentro de 1 mês	AD (mutação nova)	Comum: Produção de moléculas <i>anormais</i> de colágeno em função da substituição de gli em Gli-X-Y do domínio da hélice tripla, com alguma tendência para a parte COOH-terminal da proteína (ver Fig. 12.22)	Comum: Mutações esqueléticas de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$
Tipo III	Deformidade progressiva: fraturas, em geral ao nascimento, deformidade óssea progressiva, crescimento limitado, escleróticas azuis, dentinogênese imperfeita, perda auditiva	AD [†]	Moléculas anormais de colágeno: substituições gli de muitos tipos na hélice tripla. Situado ao longo da proteína (ver Fig. 12.22)	Mutações de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ ou $\alpha 2$
Tipo IV	Escleróticas normais, deformidade: deformidade óssea de branda a moderada, baixa estatura, fraturas, perda auditiva, dentinogênese imperfeita	AD	Moléculas anormais de colágeno: substituições gli de muitos tipos na hélice tripla. Situado ao longo da proteína (ver Fig. 12.22)	Mutações de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$

*Alguns pacientes com a doença tipo I têm substituições da glicina em uma das cadeias de colágeno tipo I (ver Fig. 12.22).

[†]Casos raros são autossômicos recessivos.

Modificado de Byers P. H. (1989) Disorders of collagen biosynthesis and structure. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2.805-2.842; e Byers P. H. (1990) Brittle bones-fragile molecules: Disorders of collagen structure and expression. Trends Genet 6:293-300.

ção, os trechos não-montados das cadeias que são aminoterminais ao defeito são muito modificados, o que diminui sua secreção no espaço extracelular. Uma grande modificação também pode interferir na formação das fibrilas de colágeno. Como resultado de todas estas anomalias, não só o número de fibrilas é reduzido, como muitas das que são secretadas são defeituosas. No osso, as cadeias anormais e seu número reduzido levam à mineralização diminuída (ver Fig. 12.19).

Anomalias Moleculares do Colágeno na Osteogênese Imperfeita

Mais de 200 mutações diferentes que afetam a síntese ou a estrutura do colágeno tipo I já foram encontradas em pacientes com OI. A heterogeneidade clínica desta doença reflete uma heterogeneidade ainda maior em nível molecular (ver Quadro 12.9). As mutações enquadram-se em duas classes gerais. Se a mutação diminui a *produção* do colágeno tipo I, o fenótipo relativamente brando da OI tipo I é a consequência. Se a mutação altera a *estrutura* da molécula, os fenótipos resultantes são os tipos II, III e IV de OI. Assim, de algum modo, hoje é possível prever o fenótipo que irá resultar de um tipo específico de defeito molecular (Fig. 12.22).

Tipo I: Produção Diminuída de Colágeno Tipo I. A grande maioria de pacientes com OI tipo I tem mutações que prejudicam gravemente a produção do colágeno tipo I, representado como alelo pró $\alpha 1^0$ na Fig. 12.21. Tipicamente, é a cadeia pró $\alpha 1$

(I) que está afetada. Códons finalizadores prematuros, pequenos trechos de inserção ou deleção (em geral de 1 ou 2 pares de bases) ou mutações de sítio de corte constituem a maioria das mutações. As mutações sem sentido originam esta forma branda de OI quando a mudança de aminoácido está situada no terminal N, porque as substituições neste local tendem a perturbar menos a montagem do colágeno (ver Fig. 12.22).

Tipos II, III e IV: Colágenos Estruturalmente Defeituosos. Os fenótipos tipos II, III e IV de OI resultam de mutações que produzem cadeias anormais pró $\alpha 1$ (ver Figs. 12.21 e 12.22) (as mutações na cadeia pró $\alpha 2$ têm um efeito comparável). A grande maioria destes pacientes tem substituições na hélice tripla que substituem uma glicina por um aminoácido mais volumoso. O gene afetado, a localização da substituição e o aminoácido substituído são todos determinantes fenotípicos importantes, mas algumas generalizações sobre o fenótipo provavelmente associado a uma substituição específica entretanto são possíveis. Assim, as substituições na cadeia pró $\alpha 1$ são mais prevalentes e em geral mais letais na população de pacientes com OI tipos II, III ou IV. Em qualquer cadeia, a substituição de glicina (um aminoácido neutro) por aspartato (que é ácido) geralmente é muito perturbadora e associada com mais frequência a um fenótipo grave (tipo II) (ver Fig. 12.22). Às vezes, uma substituição específica está associada a mais de um fenótipo, um resultado que provavelmente reflete a influência de poderosos genes modificadores deste distúrbio monogênico.

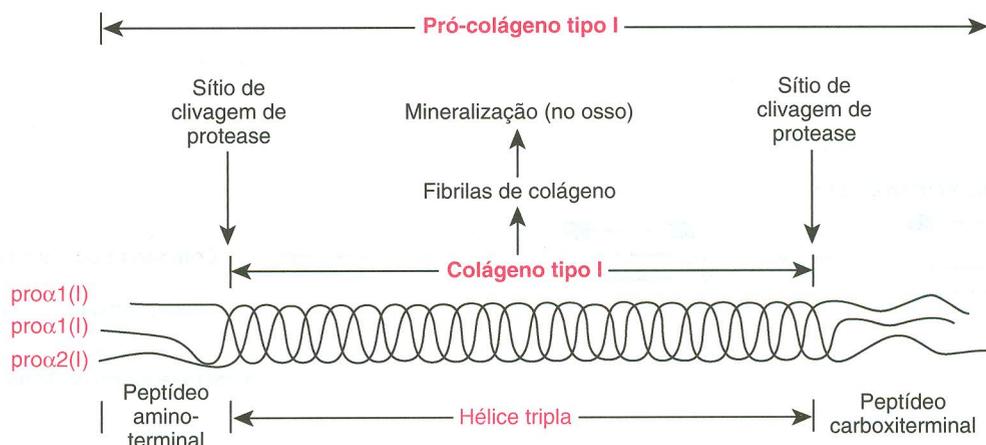


Fig. 12.20 A estrutura do pró-colágeno tipo I. Cada cadeia de colágeno é feita de uma tripla hélice que é secretada no espaço extracelular. Os domínios amino- e carboxi-terminal são clivados extracelularmente para formar colágeno; as fibrilas de colágeno maduras são então montadas e, no osso, mineralizadas. Notar que o pró-colágeno tipo I é composto de duas cadeias $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ e uma cadeia $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$. (Redesenhado de Byers P. H. [1989] Disorders of collagen biosynthesis and structure. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6.^a ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2.805-2.842.)

A Genética da Osteogênese Imperfeita

A maioria das mutações que causam a doença é de ação dominante, mas algumas são recessivas. Pelo menos alguns dos mecanismos pelos quais diferentes padrões de herança surgem de mutações diferentes em uma única molécula foram revelados pela caracterização dos defeitos bioquímicos. De modo mais geral, esta doença ilustra as complexidades genéticas que resultam de mutações que alteram proteínas estruturais, em particular as compostas por várias subunidades diferentes.

O fenótipo relativamente brando e a herança dominante do tipo I de OI são compatíveis com o fato de que embora apenas metade do número normal de moléculas seja produzido, elas são de qualidade normal (ver Fig. 12.21). As conseqüências mais graves da produção de cadeias $\text{pro}\alpha 1$ estruturalmente defeituosas (em comparação à não-produção de cadeias) reflete em parte a estequiometria do colágeno tipo I, que é de duas cadeias $\text{pro}\alpha 1$ para uma cadeia $\text{pro}\alpha 2$ (ver Fig. 12.21). Em concordância, se uma cadeia $\text{pro}\alpha 1$ é anormal, três das quatro moléculas tipo I têm pelo menos uma cadeia anormal. Em contraste, se uma cadeia $\text{pro}\alpha 2$ é defeituosa, apenas uma das duas moléculas é afetada. Mutações tais como o alelo de sentido trocado de $\text{pro}\alpha 1$ ($\text{pro}\alpha 1^M$) mostradas na Fig. 12.21 são **alelos negativos dominantes** porque impedem a contribuição dos alelos normais $\text{pro}\alpha 1$ e $\text{pro}\alpha 2$. Em outras palavras, o efeito do alelo mutante é ampliado devido à natureza polimérica da molécula de colágeno. Em conseqüência, nas doenças de herança dominante tais como a OI, é melhor ter uma mutação que não gere *nenhum* produto gênico do que uma que gere um produto gênico *anormal*.

Embora as mutações que produzam cadeias $\text{pro}\alpha 2$ estruturalmente anormais reduzam o número de moléculas de colágeno tipo I normal pela metade (*versus* três quartos nas cadeias estruturalmente anormais de $\text{pro}\alpha 1$; ver Fig. 12.21), esta redução, entretanto, é suficiente, no caso de algumas mutações, para causar o grave fenótipo letal pré-natal (ver Quadro 12.9).

A maioria das crianças com a forma letal perinatal tipo II de OI tem uma *nova* mutação dominante e, conseqüentemente, a probabilidade de recorrência na família é muito baixa. Em famílias ocasionais, entretanto, mais de um irmão é afetado com a doença tipo II. Tais recorrências parecem ser in-

variavelmente decorrentes de mosaïcismo germinativo parental (ver heredograma na Fig. 5.28). Não foi apresentada uma forte documentação de formas autossômicas recessivas do tipo II de OI, mas alguns exemplos de OI tipo III recessiva foram reconhecidos.

Tratamento Clínico e Diagnóstico Pré-natal. O conhecimento de OI que está surgindo tem aplicações úteis para o prognóstico. Se o defeito molecular de um paciente pode ser determinado, em geral é possível prever, até certo ponto, a história natural da doença. Além disso, demonstrar que um defeito é herdado de um genitor afetado (autossômico dominante), de um genitor não-afetado (com mosaïcismo germinativo), de dois genitores não-afetados mas heterozigotos (autossômico recessivo) ou como uma mutação nova permite que os riscos de recorrência sejam calculados. O diagnóstico pré-natal na OI tipo II, a forma letal perinatal, pode ser feito pelo exame do tamanho do crânio e dos membros por ultra-sonografia no segundo trimestre. Entretanto, para a maioria das gestações em risco, o diagnóstico pré-natal requer a análise do colágeno sintetizado por células cultivadas de amostras de vilosidades coriônicas ou análise direta de uma mutação (ou análise de sítios de restrição polimórficos) previamente identificados na família.

Embora o tratamento da OI seja restrito a medidas cirúrgicas e médicas em geral, esta situação é desafiadora, em função da descoberta dos efeitos benéficos dos bisfosfonatos, uma classe de drogas que atua diminuindo a reabsorção óssea. Estes compostos demonstraram aumentar tanto a densidade óssea quanto o conteúdo mineral dos pacientes com OI grave. O aspecto mais crítico, ou seja, se os bisfosfonatos reduzem a freqüência e a gravidade das fraturas na OI, está em estudo.

SÍNDROME DE EHLERS-DANLOS TIPO VI: MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DEFEITUOSA DO COLÁGENO

Em alguns casos, a modificação pós-traducional pode ser uma característica permanente essencial de uma estrutura ou função da proteína (ver Quadro 11.1). Os defeitos nas modificações pós-traducionais podem causar doença. Um distúrbio que

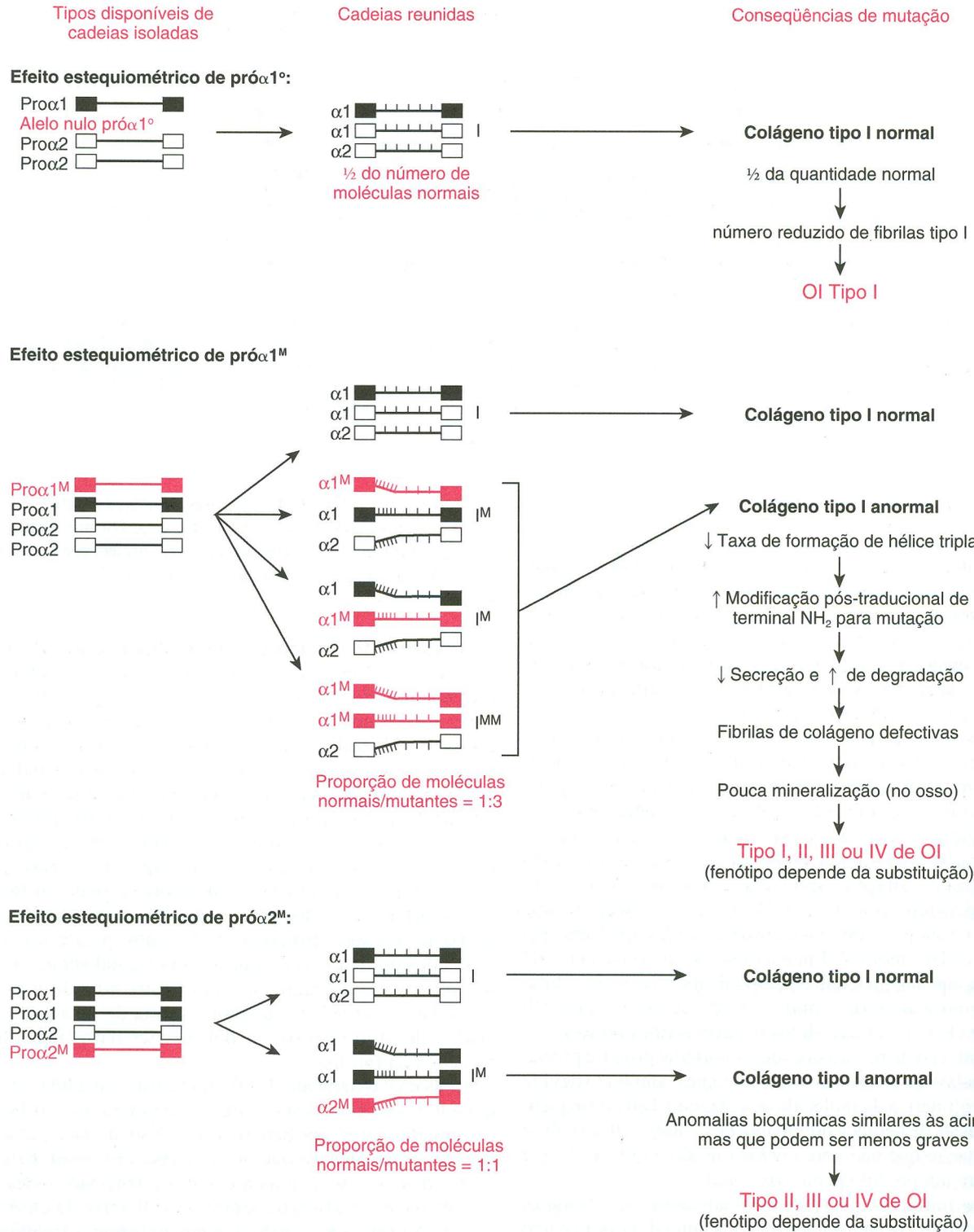


Fig. 12.21 A patogenia das principais classes de mutantes de pró-colágeno tipo I. Coluna 1: os tipos de cadeias de pró-colágeno disponíveis para montagem da tripla hélice. Coluna 2: o efeito da estequiometria do pró-colágeno tipo I na proporção de moléculas normais para anormais formadas em mutantes com cadeia pró α 1 versus mutações pró α 2. As pequenas barras verticais em cada cadeia de pró-colágeno indicam modificações pós-traducionais (ver texto). Coluna 3: o efeito de mutações no processamento bioquímico do colágeno. Pró α 1^M = uma cadeia pró α 1 com uma mutação de sentido trocado; pró α 2^M = uma cadeia pró α 2 com uma mutação de sentido trocado; pró α 1⁰ = um alelo nulo de cadeia pró α 1.

Glu
Ala
Val
Asp
Arg
Ser
Cis
resu
mar
Está
con
lida
12.2
estri
colá
tipo
tradi
defi
gum
gaçõ
las d
colá
DIS
Doe
Até p
tes a
ment
AD,

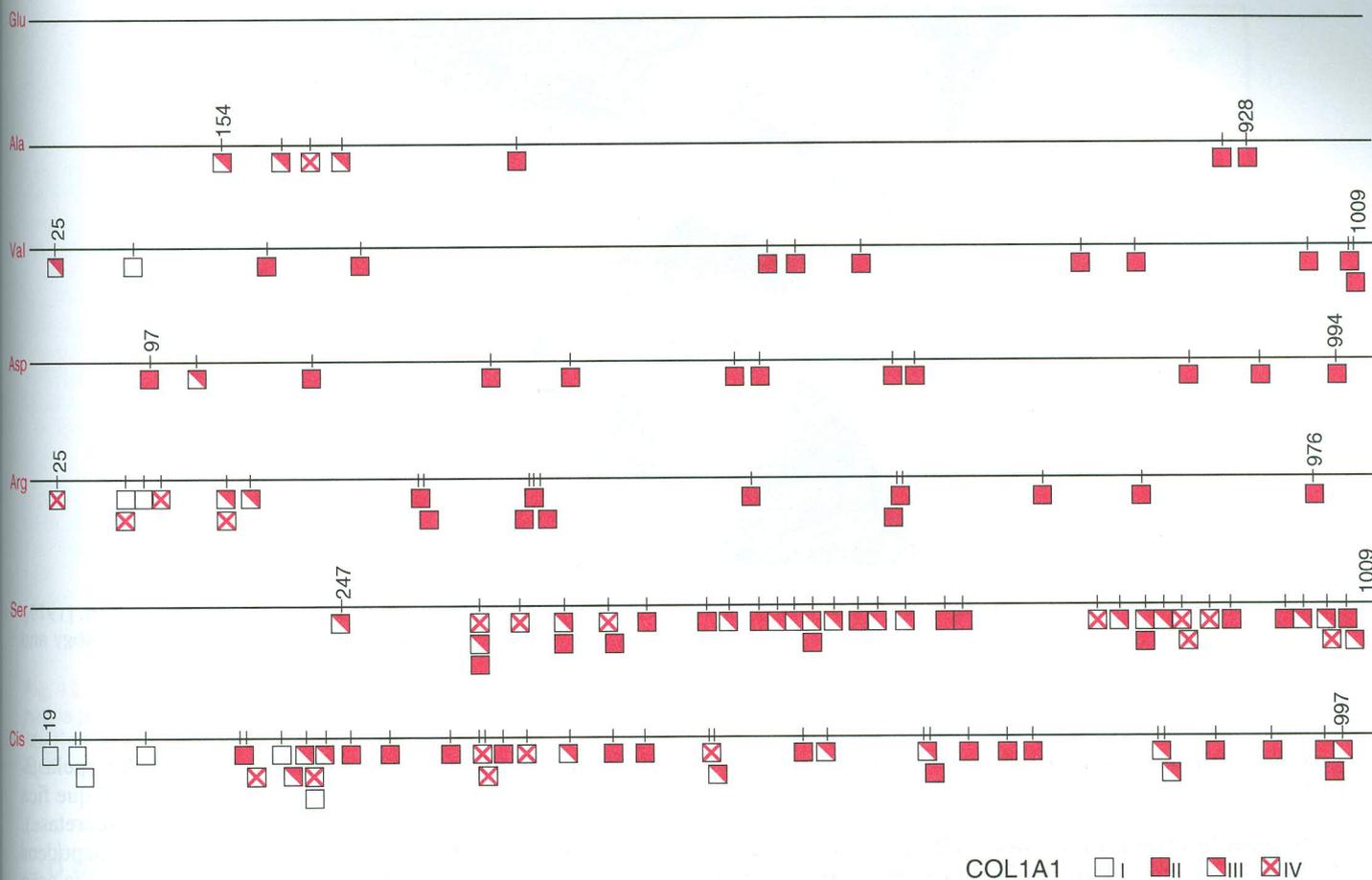


Fig. 12.22 O efeito fenotípico de substituições de cadeia pró α 1 do colágeno tipo I. I, II, III e IV = Tipos I-IV de osteogênese imperfeita. Os números acima da linha representam as moléculas de colágeno em que as glicinas foram substituídas pelo aminoácido indicado à esquerda de cada linha. Notar que, em geral, o efeito fenotípico das substituições perto do terminal carboxila são mais graves, mas o efeito também depende da natureza do aminoácido que substitui a glicina. (Redesenhado de Byers P. H. [1990] Brittle bones — fragile molecules: Disorders of collagen structure and expression. Trends Genet 6:293-300.)

resulta da deficiência de uma modificação pós-traducional permanente do colágeno é a síndrome de Ehler-Danlos tipo VI. Esta síndrome é um grupo heterogêneo de doenças do tecido conjuntivo caracterizadas por fragilidade da pele, hiper mobilidade das articulações e hiperextensibilidade da pele (Fig. 12.23). Em dois tipos, o defeito básico foi encontrado no gene estrutural das cadeias de colágeno I ou III, sendo estes os colágenos predominantes dos tecidos afetados. No distúrbio tipo VI, entretanto, a doença resulta de uma modificação pós-traducional defeituosa dos colágenos I e III, causada por uma deficiência da enzima lisil hidroxilase. A hidroxilação de algumas lisinas do colágeno é essencial para a formação de ligações cruzadas intermoleculares normais entre as moléculas de colágeno, um processo que estabiliza a rede fibrilar de colágeno.

DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS

Doença de Alzheimer

Até pouco tempo atrás, os mecanismos bioquímicos subjacentes a quase todas as doenças neurodegenerativas eram totalmente obscuros. Uma das mais comuns destas condições, a AD, afeta cerca de 1,4% das pessoas nos países desenvolvi-

dos e é responsável por 100.000 mortes por ano apenas nos EUA. A AD em geral se manifesta entre os 70 e os 90 anos, mas as formas monogênicas normalmente se apresentam mais cedo, às vezes tão cedo quanto na terceira década de vida. O quadro clínico é variável, mas inclui a deterioração progressiva da memória e das funções cognitivas superiores, tais como o raciocínio, além de mudanças comportamentais. Estas anomalias refletem a degeneração dos neurônios em regiões específicas do córtex cerebral, particularmente o córtex temporoparietal, e o hipocampo.

A Genética da Doença de Alzheimer. Aos 85 anos de idade, os parentes em primeiro grau dos pacientes com AD têm um risco final de 38% de adquirir a doença. Conseqüentemente, parece que a maioria dos casos com agregação familiar tem uma contribuição genética complexa. Esta contribuição vem de um ou mais genes incompletamente penetrantes que atuam de modo independente, da interação de múltiplos genes ou de alguma combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 10% dos pacientes têm uma forma monogênica da doença, a AD familiar (FAD), com herança autossômica dominante relacionada à idade altamente penetrante. Na década de 1990, a identificação de quatro genes AD (Quadro 12.10) esclareceu não só a FAD, mas também, como comumente é o caso em

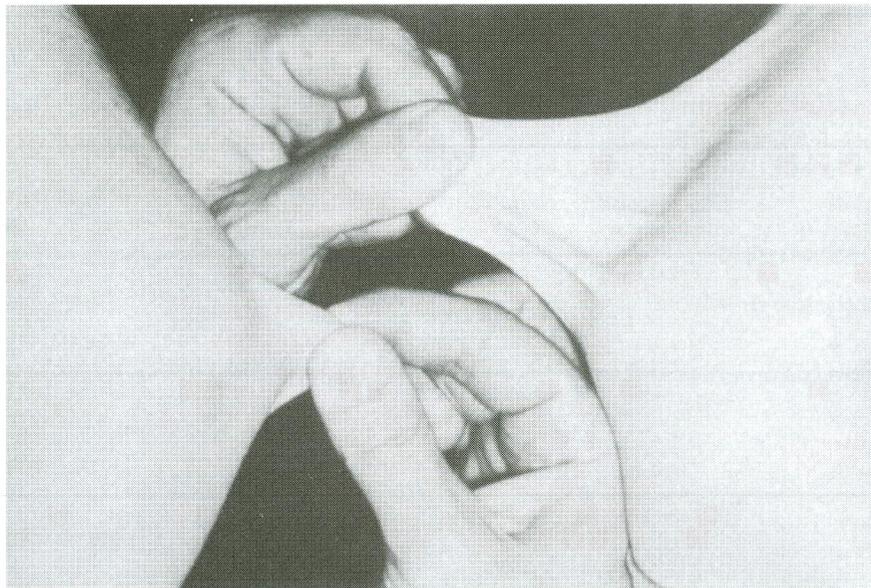


Fig. 12.23 A pele hiperextensível de um paciente com síndrome de Ehlers-Danlos. (Reproduzida de Byers P. H., Holbrook K. A. [1979]. Heritable disorders of connective tissue. In Cohen A. S. [ed] The Science and Practice of Clinical Medicine, vol. 4: Rheumatology and Immunology. Grune and Stratton, New York, p. 344.)

genética médica, a base bioquímica da forma mais comum, a AD esporádica.

O Peptídeo Beta-amilóide e os Depósitos da Proteína Tau São Centrais à Patogenia da Doença de Alzheimer.

As anomalias patológicas mais importantes da AD são o depósito no cérebro de duas proteínas fibrilares, o peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e a proteína Tau. O peptídeo $A\beta$, que é gerado a partir da proteína codificada em um dos genes FAD de suscetibilidade (Quadro 12.10), é encontrado nas placas amilóides ou senis no espaço extracelular cerebral dos cérebros com AD. As placas amilóides contêm outras proteínas além do peptídeo $A\beta$, notadamente a apolipoproteína E (ApoE), também codificada por um gene AD de suscetibilidade (*APOE*) (Quadro 12.10). As formas hiperfosforiladas da proteína Tau compreendem os emaranhados neurofibrilares que, em contraste com as placas amilóides, são encontrados *dentro* dos neurônios na AD. Tau é uma proteína associada a microtúbulos expressa abundantemente nos neurônios do cérebro. A proteína promove a montagem e a estabilização dos microtúbulos, funções que estão diminuídas pela fosforilação. Embora a formação dos emaranhados neurofibrilares de Tau pareça ser uma das causas da degeneração neuronal na AD, as mutações no gene *TAU* estão associadas não à AD, mas a um distúrbio autossômico dominante correlato, a demência frontotemporal.

A Proteína Precursora Amilóide Origina o Peptídeo Beta-amilóide. As principais características da proteína precursora amilóide (*BAPP*) e seu gene correspondente estão resumidas no Quadro 12.10. A proteína, que tem um único domínio transmembranar, está sujeita a dois destinos catabólicos proteolíticos distintos. Em sua principal via catabólica, um domínio de 40-42 aminoácidos de *BAPP*, chamado de peptídeo $A\beta$, é clivado por uma protease de superfície α -secretase (Fig. 12.24). Esta clivagem evita a formação de $A\beta$, porque digere a proteína dentro do domínio que origina o peptídeo (Fig. 12.24). Uma segunda via, a secundária, está envolvida na clivagem de

BAPP na N-terminal do domínio do peptídeo $A\beta$ (pela β -secretase) no terminal C do domínio do peptídeo $A\beta$ que fica dentro da região transmembranar de *BAPP* (pela γ -secretase). Estes dois eventos de clivagem geram uma série de peptídeos $A\beta$, com 40 a 42 aminoácidos de tamanho ($A\beta_{40-42}$), via ação conjunta de β -secretase e γ -secretase. O peptídeo $A\beta_{42}$ é considerado o mais neurotóxico, porque é o mais fibrillogênico. Várias das mutações no gene *BAPP* aumentam seletivamente a produção de $A\beta_{42}$, e a superprodução do peptídeo $A\beta$ parece ser o evento patogênico central na doença. Compatível com este modelo é o fato de que os pacientes com síndrome de Down, com três cópias do gene *BAPP* (que está no cromossomo 21), desenvolvem a neuropatologia da AD aos 40 anos de idade. Além disso, as mutações nos genes de AD presenilina 1 (*PS1*) e presenilina 2 (*PS2*) (ver Quadro 12.10) também levam a um aumento de produção de $A\beta_{42}$.

Os Genes de Presenilina 1 e 2. Os genes *PS1* e *PS2* (ver Quadro 12.10) foram identificados por estratégias de clonagem posicional em famílias com FAD. A função normal exata destas proteínas é desconhecida, mas a presenilina 1 é necessária para a clivagem de γ -secretase dos derivados *BAPP*. De fato, algumas evidências sugerem que a presenilina 1 pode ser a própria γ -secretase. As mutações em *PS1* associadas à AD provavelmente são de ganho de função, sendo o aumento de produção do peptídeo $A\beta_{42}$ o efeito principal. A proteína presenilina 2 é 60% idêntica em sequência à presenilina 1, o que sugere que os dois polipeptídeos têm funções correlatas. Uma diferença importante entre as mutações *PS1* e *PS2* é que a idade de início com a última é muito mais variável (*PS1*, de 35 a 60 anos; *PS2*, de 40 a 85 anos), e em uma família um octogenário assintomático portador da mutação *PS2* transmitiu a doença para sua prole. A base desta variação é desconhecida, mas foi demonstrado que o único gene modificador conhecido do fenótipo AD, o gene da apolipoproteína E (*APOE*) (ver Quadro 12.10 e discussão posterior), não é o responsável.

Fig.
nati
Mar
Med

enc
imp
linh
míl
de a
os c
por
liga
cas
tad
ce c
é d
iníc
cóp
con
mei
Os
ma
dos
exe
duç
te f

Dis
Mu

Em
mu
é, t
um
se
dec

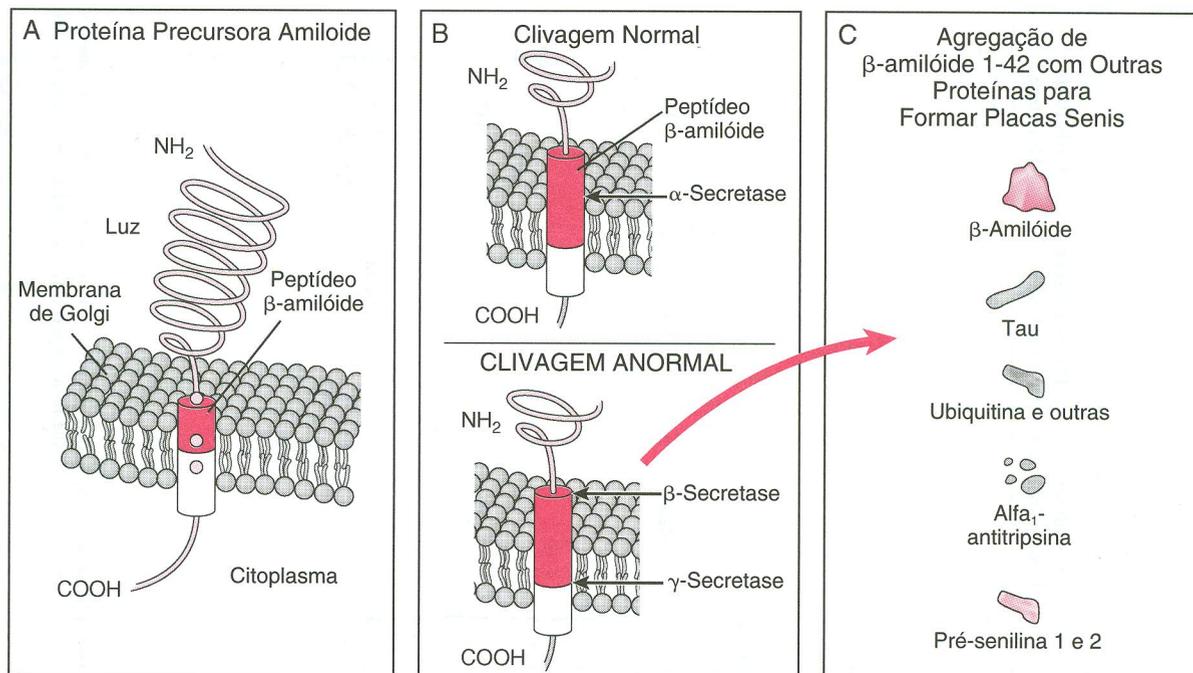


Fig. 12.24 A topologia da proteína precursora amiloide (β APP), sua clivagem não-amiloidogênica pela α -secretase e sua clivagem alternativa por β -secretase e γ -secretase hipotéticas para gerar o peptídeo amiloidogênico β -amilóide ($A\beta$). (Reproduzido com permissão de Martin J. B. [1999] Molecular basis of the neurodegenerative disorders. New Engl J Med 340:1970-1980. Copyright © 1999 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

O Gene APOE É um Locus de Suscetibilidade à Doença de Alzheimer. O papel do gene *APOE* como um locus importante de suscetibilidade na AD foi sugerido por quatro linhas independentes de evidência: análises de ligação em famílias com manifestação tardia e agregação de AD, aumento de associação do alelo $\epsilon 4$ em pacientes AD comparados com os controles, a descoberta de que a proteína ApoE é um componente das placas amilóides de AD e o achado de que ApoE liga-se ao peptídeo $A\beta$. A proteína ApoE tem três formas alélicas comuns (Quadro 12.11). O alelo $\epsilon 4$ tem frequência aumentada nos pacientes com AD e está associado a um início precoce de AD. Além disso, a correlação entre o alelo $\epsilon 4$ e a doença é dose-dependente: duas cópias de $\epsilon 4$ estão associadas a um início mais precoce (média de início antes dos 70 anos) que uma cópia (média de início após os 70 anos) (ver Fig. 15.6). Em contraste, o alelo $\epsilon 2$ tem um efeito protetor e, correspondentemente, é mais comum na população em geral (Quadro 12.11). Os mecanismos subjacentes a estes efeitos não são conhecidos, mas os polimorfismos de ApoE podem influenciar o acúmulo dos peptídeos $A\beta$ nos cérebros dos pacientes com AD. Por exemplo, os camundongos sem ApoE têm uma acentuada redução no depósito de peptídeo $A\beta$ gerado por um alelo mutante β APP associado à FAD.

Distúrbios de Repetição de Trinças: Mutações Dinâmicas Instáveis

Em todos os tipos de herança já apresentados (ver Cap. 5), a mutação responsável é *estável* de geração para geração. Isto é, todos os membros afetados de uma família compartilham uma mutação idêntica herdada. Em contraste, toda uma classe nova de doenças genéticas foi reconhecida, as doenças decorrentes de **mutações dinâmicas instáveis** em um gene,

das quais as mais comuns são os **distúrbios de repetição de trinças**. Por definição, estas condições são caracterizadas pela expansão, dentro do gene afetado, de um segmento de DNA que contém uma repetição de três nucleotídeos (repetições de trinca) tais como CAGCAGCAG...CAG ou CCGCCGCCG...CCG. À medida que o gene é passado de geração em geração, o número de repetições de trinças aumenta (sofre **expansão**), levando a anomalias na expressão do gene e em seu funcionamento.

O reconhecimento das doenças de repetições de trinças começou em 1991, com relatos de expansão de repetição de trinças instáveis tanto no locus da síndrome do X frágil quanto no gene de receptor de andrógenos em pacientes com o raro distúrbio genético conhecido como doença de Kennedy (ou atrofia muscular espinobulbar). Logo depois, uma alteração genética similar foi encontrada subjacente à distrofia miotônica e doença de Huntington, demonstrando, assim, a existência de um mecanismo mutacional inteiramente novo que, notadamente, nunca tinha sido observado em qualquer outro genoma.

Mais de uma dúzia de doenças resultantes de expansões de repetições de trinças são conhecidas. Os exemplos representativos destes distúrbios estão resumidos no Quadro 12.12. Todas estas condições são primariamente neurológicas. A descoberta deste grupo incomum de condições contradiz as noções ortodoxas de estabilidade da linhagem germinativa e dá uma base biológica para tais fenômenos excêntricos como a antecipaçaõ e a tendenciosidade de transmissão parental.

Características Comuns e Contrastantes dos Distúrbios de Repetição de Trinças. Embora todos os distúrbios de repetições de trinças sejam causados por mutações dinâmicas de repetições de trinças, existem também diferenças significativas

QUADRO 12-10

Os Genes e as Proteínas Associados à Suscetibilidade Herdada para a Doença de Alzheimer

Gene	Características da Proteína	Função Normal	Papel na Doença de Alzheimer Familiar (FAD)	Localização Cromossômica	Porcentagem de FAD	Padrão de Herança
Proteína precursora amilóide (βAPP)	Uma única proteína transmembrantar, encontrada nos endossomos, lisossomos, RE e Golgi. Normalmente, β APP é clivada endoproteoliticamente dentro do domínio transmembrantar, e assim é formado pouco peptídeo β -amilóide ($A\beta$).	Desconhecida	O peptídeo β -amilóide ($A\beta$) é o principal componente das placas senis. O aumento de produção de $A\beta$, especialmente da forma $A\beta_{42}$, é um importante evento patogênico. < 10 mutações FAD conhecidas. Provavelmente elas aumentam a produção de $A\beta_{42}$.	21	< 1%	AD
Pré-senilina 1 (PS1)	Um domínio de 5-10 proteínas de membrana presentes em muitos tipos de células tanto dentro quanto fora do cérebro. Situada nas membranas intracelulares no RE, Golgi e outras vesículas citoplasmáticas não-caracterizadas. Estrutura similar à PS1. A expressão máxima é fora do cérebro. Similar à PS1 em localização. Pode ter funções similares à PS1.	Desconhecida, mas necessária para a clivagem de γ -secretase da β APP. Algumas evidências sugerem que seja a γ -secretase.	Pode participar do tráfego de β APP e suas proteínas derivadas. Mais de 40 mutações em FAD. A maioria provavelmente de ganho de função e aumento de produção de $A\beta_{42}$. Apenas duas mutações de sentido trocado identificadas.	14q24.3	50%	AD
Pré-senilina 2 (PS2)	Um componente proteico de várias lipoproteínas plasmáticas (p. ex., VLDL). O mRNA de APOE não é transcrito nos neurônios; a proteína é importada do espaço extracelular para o citoplasma.	Desconhecida		1q42.1	< 1%	AD
Apolipoproteína E (APOE)		Desconhecida a função normal nos neurônios. Fora do cérebro, APOE participa do transporte de lipídeos entre os tecidos e as células. A perda de função causa uma forma (tipo III) de hiperlipoproteïnemia.	Um gene de suscetibilidade à doença de Alzheimer (ver Quadro 12.11). APOE é um componente das placas senis.	19q13	<< 1% de taxa	Ver Quadro 12.11

FAD = doença de Alzheimer familiar.

Dados derivados de St George-Hyslop P. H., Farrer L. A., Goedert M. (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Diseases with cerebral deposition of fibrillar proteins. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York; e Martin J. B. (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. New Engl J Med 340:1970-1980.

QUA
As S
AlelAmin
Amin
Frequ
pop
caud
Frequ
pac
doe
Alz
Efeito
de ADados
Alzhe
depos
D. (e
McGrentre
ocor
gene
cos,
des
unid
raro
plos
dron
C
ção;
ticas
dent
peti
tos e
dife
e as
tas e
doe
tiva
a at
pan
sínc
Friede
as e
te é
mec
nha
plic
repe
part
o fi
dur
der

QUADRO 12-11

As Substituições de Aminoácidos Subjacentes a Três Alelos Comuns de ApoE

Alelo	ε2	ε3	ε4
Aminoácido 112	Cis	Cis	Arg
Aminoácido 158	Cis	Arg	Arg
Frequência na população caucasiana	10%	75%	15%
Frequência nos pacientes com doença de Alzheimer	2%	58%	40%
Efeito na doença de Alzheimer	Protetora	Nenhum conhecido	de 30% a 50% do risco genético de AD

Dados derivados de St George-Hyslop P. H., Farrer L. A., Goedert M. (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Disease with cerebral deposition of fibrillar proteins. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5.875-5.902.

entre os vários distúrbios. Um padrão de herança dominante ocorre em alguns, e a herança recessiva em outros. Em geral, os genes tipo selvagem associados a estas doenças são polimórficos, com números variáveis mas relativamente baixos de unidades repetidas em tandem (adjacentes). O grau de expansão da unidade repetida que causa a doença às vezes é sutil (como no raro distúrbio distrofia muscular oculofaríngea) e às vezes é explosivo (como na distrofia miotônica congênita ou na grave síndrome do X frágil) (Quadro 12.12).

Outras diferenças incluem a seqüência de bases da repetição; o tamanho da repetição em pessoas normais, pré-sintomáticas e naquelas totalmente afetadas; a localização da repetição dentro dos genes; a patogenia da doença; o grau no qual as repetições são instáveis durante a meiose ou a mitose; e os efeitos do genitor de origem na expansão da repetição. As quatro diferentes doenças que revimos aqui ilustram as similaridades e as diferenças entre as doenças de repetição de trincas descritas até hoje (Quadro 12.12). Estes quatro distúrbios são (1) a doença de Huntington (HD) (e outras doenças neurodegenerativas progressivas, tais como a atrofia muscular espinobulbar e a ataxia espinocerebelar autossômica dominante) devida à expansão de vias de múltiplas glutaminas (poliglutamina); (2) a síndrome do X frágil; (3) a distrofia miotônica e (4) a ataxia de Friedreich.

O Pareamento Desalinhado É Subjacente à Expansão de Repetição de Trincas. O mecanismo bioquímico pelo qual as expansões de repetições de trincas são geradas provavelmente é o mesmo para todas as doenças de repetição de trincas. O mecanismo considerado mais provável é o pareamento desalinhado, que foi apresentado no Cap. 11 (ver Fig. 11.8) como explicação para muitas pequenas deleções em regiões de curtas repetições de seqüências. As inserções também podem surgir por pareamento desalinhado na forquilha de replicação, mediado por repetições diretas tais como $(CAG)_n$. Ocorre uma inserção quando o filamento recém-sintetizado se dissocia do filamento molde durante a síntese de replicação. O novo filamento pode retroceder para se alinhar com uma cópia repetida que não sua cópia

cognata. Uma vez retomada a síntese de DNA, a molécula desalinhada conterá uma ou mais cópias extras da repetição (dependendo do número de cópias da repetição que foram puladas no evento de desalinhamento).

DISTÚRBIOS DE POLIGLUTAMINA

Doença de Huntington. A HD é um distúrbio bem-conhecido que ilustra muitas das características genéticas e bioquímicas comuns dos distúrbios de poliglutamina. A HD foi inicialmente descrita pelo médico George Huntington, em 1872, em uma família americana de descendência inglesa. A neuropatologia é dominada por degeneração do estriado e do córtex. Os pacientes apresentam-se clinicamente pela primeira vez na meia-idade e manifestam um fenótipo característico de anomalias motoras (coréia, distonia), mudanças de personalidade, perda gradual da cognição e, finalmente, morte.

A HD é um distúrbio autossômico dominante. A perda de função do alelo mutante, causando haploinsuficiência, parece não ser subjacente à herança dominante na HD, pois os pacientes heterozigotos e homozigotos que têm a mutação têm fenótipos idênticos e porque uma deleção de um gene *HD* não tem fenótipo em humanos. Como será discutido mais adiante, os alelos mutantes parecem conferir propriedades novas à proteína.

Embora inicialmente a HD pareça se comportar como uma condição direta autossômica dominante, havia peculiaridades óbvias em sua ocorrência que não podiam ser explicadas. A idade de manifestação da HD é variável. Apenas cerca de metade dos indivíduos que portam um alelo *HD* mutante apresenta sintomas com a idade de 40 anos. A doença de manifestação bem precoce, começando durante a infância ou adolescência, ocorre em algumas famílias, mas apenas quando o gene mutante é herdado paternamente. A doença parece se desenvolver em idade cada vez mais jovem quando transmitida ao longo do heredograma, um fenômeno chamado de **antecipação**, mas apenas quando transmitida por um pai afetado e não por uma mãe afetada.

As peculiaridades de herança da HD são hoje prontamente explicadas pela descoberta da mutação: uma expansão de um trecho de repetições de trinca CAG, o códon que especifica o aminoácido glutamina, na região codificante de um gene para uma proteína de função desconhecida chamada huntingtina. Os indivíduos normais possuem entre 9 e 35 repetições CAG em seu gene *HD*, com uma média de 18 a 19. Os indivíduos afetados por HD têm 40 ou mais repetições, com uma média por volta de 46. Um número limítrofe de repetições de 36 a 39, embora em geral associado à HD, pode ser encontrado em alguns indivíduos que não apresentam sinais da doença mesmo em idade um pouco avançada. Quando a expansão é maior que 40, entretanto, sempre ocorre a doença, e quanto maior a expansão, mais cedo é o início da doença (Fig. 12.25).

Então como uma pessoa tem uma expansão da repetição CAG em seu gene de *HD* (Fig. 12.26)? De maneira mais comum, ela a herda como uma característica autossômica direta de um genitor afetado que já tem uma repetição expandida (>36). Ao contrário das mutações estáveis, entretanto, o tamanho da repetição pode se expandir na transmissão, resultando em início mais precoce da doença nas últimas gerações (explicando, assim, a antecipação). Por outro lado, as repetições na faixa de 40 a 50 podem não resultar em doença até um período mais tardio da vida, explicando, assim, a penetrância dependente de idade. No heredograma mostrado na Fig. 12.26, a pessoa

QUADRO 12-12

Quatro Exemplos Representativos de Doenças por Repetições de Trinças

Doença	Padrão de Herança	Trinca Repetida	Gene Afetado	Localização do Gene	Mecanismo da Doença	N.º de Repetições		
						Normais	Intermediário Instável	Afetado
Doença de Huntington	Autossômica dominante	CAG	huntingtina	região codificante	Efeito tóxico de glutaminas?	< 36	29-35 em geral não-afetados	> 35
X frágil	Ligada ao X	CGG	<i>FMR1</i>	5' não-traduzida	Causa metilação excessiva levando à expressão reduzida de <i>FMR1</i>	< 60	60-200 geralmente não-afetados	> 200
Distrofia miotônica	Autossômica dominante	CTG	<i>DMPK</i>	3' não-traduzida	Obscura?	< 30	50-80 em geral brandamente afetados	80-2.000
Ataxia de Friedreich	Autossômica recessiva	AAG	fataxina	íntron	Interfere no processamento de RNA, levando à expressão reduzida de fataxina	< 34	36-100 (não-interrompida)	> 100

Fig. das de r

I-1, exp o al em rep pes

Fig cad cóp pes por ma rep

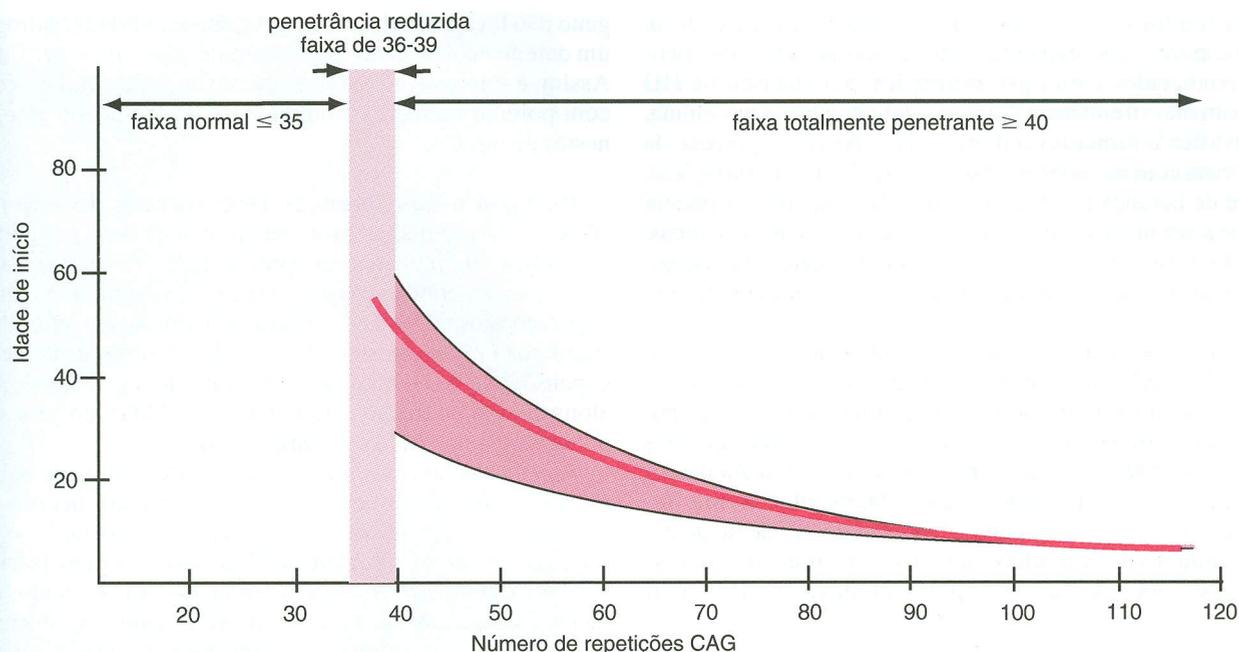


Fig. 12.25 Gráfico correlacionando a idade aproximada de início da doença de Huntington com o número de repetições CAG encontradas no gene *HD*. A linha contínua é a média de idade de início e a área sombreada mostra a faixa da idade de início para cada número de repetições. (Dados por cortesia do Dr. M. Macdonald, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts.)

I-1, falecida, foi diagnosticada com HD aos 64 anos e tinha uma expansão de 46 repetições CAG. Seis de seus filhos herdaram o alelo expandido, e em cinco deles a expansão era maior que em I-1. A pessoa II-3, em particular, tinha o maior número de repetições e tornou-se sintomática durante a adolescência. A pessoa II-9, em contraste, herdou um alelo expandido, mas

continuou assintomática e desenvolverá a doença em algum momento mais tardio da vida.

Ocasionalmente, as pessoas não-afetadas possuem alelos com tamanhos da repetição no limite superior da faixa normal (de 29 a 35 repetições CAG) que, entretanto, podem se expandir durante a meiose para 40 ou mais repetições. Os alelos com repetições

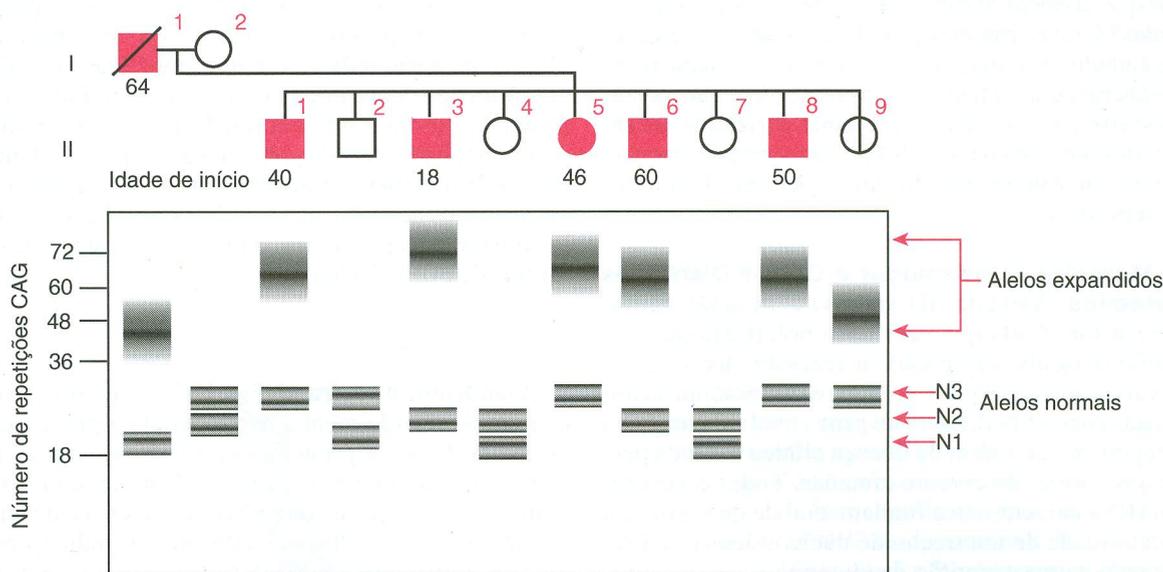


Fig. 12.26 Heredograma de família com doença de Huntington. Abaixo um diagrama esquemático de eletroforese em gel. Abaixo de cada símbolo das pessoas estão os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) contendo a repetição CAG derivada de duas cópias do gene *HD* da pessoa. A idade dos primeiros sintomas é mostrada abaixo do símbolo de cada indivíduo do heredograma. A pessoa I-1 tem uma expansão repetida que sofreu maior expansão quando passada para seis de seus filhos. Note que a pessoa II-9 é um portador assintomático de um alelo expandido no qual a doença ainda não teve penetrância. (O padrão de banda tripla dos alelos normais e o aspecto mais difuso das bandas dos alelos expandidos resulta de dificuldades técnicas nas amplificações de PCR de uma trinca repetida, bem como de mosaïcismo somático ao longo da repetição dos alelos expandidos.)

CAG nos limites superiores do normal que não causam doença, mas são capazes de se expandir para a faixa causadora de doença, são conhecidos como **pré-mutações**. A expansão na HD ocorre com mais frequência durante a gametogênese masculina, o que justifica a forma juvenil mais grave de início precoce da doença, vista com as maiores expansões (de 70 a 121 repetições), é sempre de herança paterna. As repetições expandidas podem continuar a ser instáveis durante a mitose de células somáticas, resultando em algum grau de mosaicismo somático (ver adiante) para o número de repetições em tecidos diferentes do mesmo paciente.

O maior número de pacientes HD conhecido vive na região do Lago Maracaibo, na Venezuela. Estes pacientes são descendentes de um único indivíduo que introduziu o gene na população no início do século XIX. Cerca de 100 pessoas afetadas vivas e outras 900, cada uma com 50% de risco, são atualmente conhecidas na comunidade do Lago Maracaibo. A alta frequência da doença em uma população local descendente de um pequeno número de indivíduos, um dos quais tinha o gene responsável pela doença, é um exemplo de efeito do fundador (ver Cap. 7).

Aspectos Éticos e Consulta Genética na Doença de Huntington. Como a HD em geral não aparece senão após o fim dos anos reprodutivos, é provável que seja transmitida por pessoas que possuem o gene mutante e não sabem que estão em risco. A descoberta inicial de marcadores geneticamente ligados para HD (ver Cap. 8) e depois do gene *HD* com uma expansão CAG como a causa da doença permite um diagnóstico molecular preciso baseado em marcadores de DNA em pessoas assintomáticas em risco. Como não há tratamento ou cura para a HD, entretanto, e como a doença tem um grave prognóstico, existem importantes implicações éticas associadas à análise molecular e à consulta genética para famílias com a doença. Uma pessoa assintomática em risco tem o dever de se submeter ao teste e saber o resultado antes de se reproduzir? É ético deixar que crianças assintomáticas de famílias com HD sejam testadas? Graves traumas psicológicos, inclusive grave depressão e suicídio, resultaram em pessoas assintomáticas em risco que souberam que tinham a mutação de repetição expandida. Em vista destes e de outros problemas correlatos, os enfoques dos testes pré-sintomáticos de HD estão sendo feitos com cautela e com grande preocupação com os membros familiares descobertos em risco.

Atrofia Muscular Espinobulbar e Outros Distúrbios de Poliglutamina. Além da HD, outras doenças são causadas pelas expansões CAG que codificam poliglutamina, tais como a atrofia muscular espinobulbar recessiva ligada ao X (SBMA) e várias ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes. Estas condições diferem no gene envolvido, na faixa normal de repetição, no limiar da doença clínica causada pela expansão e nas regiões do cérebro afetadas. Todas compartilham com a HD a característica fundamental de que resultam de uma instabilidade de um trecho de nucleotídeos CAG repetidos, levando a uma expansão de glutaminas em uma proteína.

O funcionamento normal das proteínas que podem conter as repetições expandidas é amplamente desconhecido, com exceção da SBMA, na qual a expansão ocorre no gene de receptor de hormônio andrógeno. O exemplo da SBMA é importante para a compreensão da patogenia dos distúrbios de poliglutamina, pois já se sabe que a perda completa de função do receptor de andró-

geno não leva à SBMA, mas causa insensibilidade androgênica, um defeito no desenvolvimento genital masculino (ver Cap. 10). Assim, é improvável que a perda de função de várias proteínas com poliglutaminas expandidas seja o mecanismo patogênico nestes distúrbios.

Patogenia das Doenças Decorrentes de Expansões (CAG)_n. Parece que as proteínas mutantes com poliglutamina expandida são mutantes com propriedades novas (ver Cap. 11), e a expansão confere características à proteína que danificam populações específicas de neurônios e produzem neurodegeneração por um mecanismo tóxico único. Conseqüentemente, as expansões (CAG)_n não são tidas como patogênicas devido ao alongamento do trecho com repetições (CAG)_n no gene correspondente ou nos RNAs produzidos em si.

A cadeia de eventos que leva da via expandida de poliglutamina — que está presente bem cedo na vida dos neurônios afetados — até a morte das células, décadas mais tarde, é desconhecida e é um dos problemas não-resolvidos mais fascinantes na genética humana e médica. Entretanto, vários achados importantes começaram a dar esclarecimentos sobre o problema. Primeiro, apenas um subgrupo de neurônios é afetado, muito embora a proteína mutante (huntingtina) seja amplamente expressa no sistema nervoso, bem como em outros tecidos. Este achado sugere que algumas características da população neuronal afetada a tornam unicamente vulnerável aos efeitos tóxicos da proteína mutante.

Segundo, várias anomalias histológicas foram identificadas nos tecidos afetados (amplamente em modelos de camundongo destas doenças), mas a mais marcante é a presença de inclusões nucleares em algumas das doenças de expansão. As inclusões contêm, além de outras proteínas, a proteína mutante com expansão de poliglutamina e podem refletir eventos de mau dobramento da proteína. Entretanto, embora estas inclusões sejam marcantes, parece que sua formação não é essencial para a morte neuronal. Em pelo menos algumas doenças de expansão de (CAG)_n, a localização nuclear da proteína expandida não é necessária para a patogenia. Terceiro, a via expandida de poliglutamina, e não toda a proteína com a via expandida, parece ser suficiente para causar a morte neuronal. Embora um modelo unificador da morte neuronal mediada por poliglutamina expandida não esteja disponível, parece provável que o estudo de modelos animais destes distúrbios virá a fornecer informações cruciais nesta década. Tais informações podem muito bem levar a terapias para evitar ou reverter a patogenia destes distúrbios de evolução lenta.

SÍNDROME DO X FRÁGIL

A **síndrome do X frágil** (Fig. 12.27) é a forma herdável mais comum de retardo mental de moderado a grave, sendo a síndrome de Down a primeira entre todas as causas de retardo mental moderado em homens. A síndrome é tão comum que requer consideração no diagnóstico diferencial de retardo mental em homens e mulheres e está entre as indicações mais frequentes para a análise de DNA, a consulta genética e o diagnóstico pré-natal. O nome “X frágil” refere-se a um marcador citogenético no cromossomo X em Xq27.3, um “sítio frágil” no qual a cromatina não se condensa apropriadamente durante a mitose (Fig. 12.28). A síndrome do X frágil, que tem uma frequência de pelo menos 1 em 4.000 nascimentos masculinos, pode responder por grande parte do excesso de homens na população mentalmente retardada.

Fig.
X frá
sity,

per
ago
bio
são
nã
(re
çõe
sã
Ma
ces

Fi
li.



Fig. 12.27 Face característica de um paciente com a síndrome do X frágil. (Foto por cortesia de Michael Partington, Queen's University, Kingston, Ontario.)

A análise genética da síndrome revela alguns achados inesperados que inicialmente foram muito desafiadores, mas que agora podem ser explicados pela descoberta de que o distúrbio é causado por uma mutação dinâmica, uma enorme expansão de outra repetição de trinca, CGG, situada na região 5' não-traduzida do primeiro éxon de um gene chamado *FMRI* (retardo mental 1 de X frágil). O número normal de repetições é superior a 60, enquanto vários milhares de repetições são encontrados em pacientes com a síndrome do X frágil. Mais de 200 cópias da repetição levam a uma metilação excessiva de citosinas no promotor de *FMRI*, uma forma de

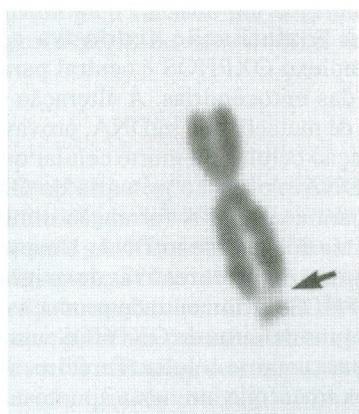


Fig. 12.28 O sítio X frágil em Xq27.3 associado a retardo mental ligado ao X.

modificação do DNA que impede o funcionamento normal e extingue a expressão do gene. Uma intensa expansão e metilação também parecem interferir na replicação ou condensação da cromatina, ou ambas, produzindo o sítio frágil cromossômico característico. Esta perda de função do *FMRI* é a causa da síndrome do X frágil, apoiada pelo achado de alguns raros pacientes com a síndrome nos quais as deleções ou uma mutação de sentido trocado aboliram a expressão ou o funcionamento do *FMRI*.

A comparação da HD (e outras doenças neurodegenerativas de poliglutamina) com a síndrome do X frágil revela algumas similaridades, mas também muitas diferenças. Embora as expansões de repetições de trincas estejam envolvidas em ambos os tipos de doença, a expansão nas doenças de poliglutaminas é na região codificante e varia de 40 a 120 cópias de CAG, enquanto a repetição na síndrome do X frágil é uma CGG na parte não-traduzida 5' de um gene, e expansões de 200 a muitos milhares são vistas em pacientes afetados pelo distúrbio. Segundo, as doenças neurodegenerativas de poliglutamina e a síndrome do X frágil diferem porque a síndrome do X frágil deve-se à perda de função de um gene, e não à toxidez de uma proteína anormal. Terceiro, os indivíduos assintomáticos portadores de expansões pré-mutacionais e o fenômeno de antecipação são vistos em ambas as doenças. Entretanto, o número de repetições nos alelos pré-mutação de *FMRI* varia de 60 a 200 cópias, muito maior que na HD, e a expansão dos alelos de pré-mutação ocorre na *mulher*, e não na linhagem germinativa masculina. Finalmente, o grau de instabilidade mitótica na síndrome do X frágil é muito maior que aquela vista na HD e resulta em variabilidade muito maior nos números de repetições encontradas entre células do mesmo tecido e entre tecidos somáticos diferentes em um mesmo indivíduo.

DISTROFIA MIOTÔNICA

Uma terceira doença de expansão de repetição de trinca é a **distrofia miotônica**, uma miopatia dominante autossômica caracterizada por miotonia, distrofia muscular, cataratas, hipogonadismo, calvície frontal e mudanças no eletroencefalograma. A doença é notória pela falta de penetrância e por sua expressão variável tanto na gravidade clínica quanto na idade de manifestação (Fig. 12.29). Uma forma de distrofia miotônica, a forma congênita, é particularmente grave e pode ameaçar a vida, bem como causar retardo mental. Cada filho com a forma congênita resulta de uma mãe afetada, sendo que ela mesma pode ter apenas uma expressão branda da doença e pode não saber que é afetada. Assim, os heredogramas de distrofia miotônica, como os de HD e da síndrome do X frágil, apresentam uma clara evidência de antecipação.

Algumas, mas nem todas, das intrigantes características da herança da distrofia miotônica podem ser explicadas pela descoberta de que a doença está associada a uma ampliação de repetição da trinca CTG na região não-traduzida 3' de um gene de cinase proteica (*DMPK*) no cromossomo 19. A faixa normal de repetições no *DMPK* é de 5 a 30. As pessoas afetadas de forma branda têm de 50 a 80 cópias, e várias pessoas afetadas têm mais de 2.000 cópias. Qualquer um dos genitores pode transmitir uma cópia ampliada, mas os homens podem transmitir até 1.000 cópias da repetição, enquanto grandes expansões, contendo muitos milhares de repetições, ocorrem apenas na gametogênese feminina. Como a distrofia miotônica congênita deve-se a expansões enormes (muitos milhares), esta forma de distrofia miotô-



Fig. 12.29 Distrofia miotônica, uma condição autossômica dominante com expressividade variável em gravidade clínica e idade de início. Nesta família, a avó (*esquerda*) teve catarata bilateral, mas não a fraqueza facial ou os sintomas musculares. Sua filha foi tida como não-afetada até o nascimento de seu filho gravemente afetado, mas ela agora apresenta uma fraqueza facial moderada e ptose, com miotonia, e submeteu-se à extração de catarata. A criança tem distrofia miotônica congênita. (De Harper P. S. [1989] *Myotonic Dystrophy*, 2.^a ed. WB Saunders, Philadelphia, p. 18.)

nica é quase sempre de origem materna. Não sabemos se a expansão de CAG no gene *DMPK* causa a doença interferindo na expressão do próprio *DMPK*, na expressão de outros genes vizinhos, ou ambos.

ATAXIA DE FRIEDREICH

A **ataxia de Friedreich**, uma ataxia espinocerebelar, constitui uma quarta categoria de doenças por repetição de trinca (ver Quadro 12.12). A doença é autossômica recessiva, em contraste com a HD, a distrofia miotônica e a síndrome do X frágil. O distúrbio normalmente se manifesta antes da adolescência e em geral é caracterizado por movimentos descoordenados dos membros, dificuldade de fala, diminuição ou ausência de reflexos, prejuízo posicional e de sensações vibratórias, escoliose e deformidades dos pés. Na maioria dos casos, a ataxia de Friedreich é causada por ampliação de outra repetição de trinca, AAG, situada em um íntron de um gene que codifica uma proteína mitocondrial chamada frataxina, envolvida no metabolismo do ferro. Nas pessoas normais, o tamanho da repetição varia de 7 a 34 cópias, enquanto a expansão da repetição nos pacientes está entre 100 e 1.200 cópias. A expansão dentro do íntron interfere na expressão normal do gene de frataxina. Como a ataxia de Friedreich é recessiva, é necessário que haja perda de expressão de ambos os alelos para que a doença ocorra. De fato, alguns pacientes são conhecidos como heterozigotos compostos, nos quais um alelo tem a mutação de repetição AAG intrônica ampliada e o outro uma mutação de nucleotídeo.

Doenças de DNA Mitocondrial e Herança Materna

A Molécula de mtDNA. Como foi descrito no Cap. 3, nem todo o RNA e a proteína sintetizada em uma célula são codificados pelo DNA do núcleo. Uma pequena mas importante fra-

ção é codificada por genes dentro do genoma mitocondrial. Este genoma, cuja seqüência completa foi relatada em 1981, tem aproximadamente 16,5 kb de tamanho (Fig. 12.30). O DNA mitocondrial (mtDNA) é embalado em um cromossomo circular dentro da organela mitocondrial, não no núcleo. A molécula compacta de mtDNA contém 37 genes. Os genes codificam dois tipos de RNA ribossômico, 22 tRNAs e 13 polipeptídeos que são subunidades de enzimas de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Os outros 74 polipeptídeos do complexo OXPHOS são codificados pelo genoma nuclear. Assim, as doenças de OXPHOS podem ser decorrentes de mutações no genoma de mtDNA ou de mutações nos genes nucleares que codificam os componentes de OXPHOS. A maioria das células contém pelo menos 1.000 moléculas de mtDNA, distribuídas entre centenas de mitocôndrias individuais. Uma marcante exceção é o ovócito maduro, que tem mais de 100.000 cópias de mtDNA, compreendendo cerca de um terço do conteúdo total de DNA destas células.

Funções da Fosforilação Oxidativa e Doenças de mtDNA. O complexo OXPHOS é central para três das principais funções das mitocôndrias. A alteração destas atividades, decorrente de mutações no mtDNA, provavelmente é subjacente à disfunção celular e à morte celular que ocorrem nas doenças de mtDNA. A função primária do OXPHOS é produzir energia para a célula. A formação diminuída de ATP caracteriza muitas doenças de mtDNA. Uma segunda função de OXPHOS é gerar espécies reativas de oxigênio, como subproduto de OXPHOS. O aumento de produção destas espécies ocorre em alguns defeitos de OXPHOS, um fator que também contribui para a morte celular. Terceiro, as mitocôndrias integram muitos sinais que iniciam a apoptose. Este processo usa alguns polipeptídeos de OXPHOS, e as mutações no mtDNA podem aumentar a predileção pela apoptose. A miopatia mitocondrial em geral associada a mutações de mtDNA é

Fig
cor
de
sor
ex.
Co
oxi
ME
In
cei
63

ca
ur
m
m

A
A
ca
ca
de
ni
er
ra
a
se
F
ic

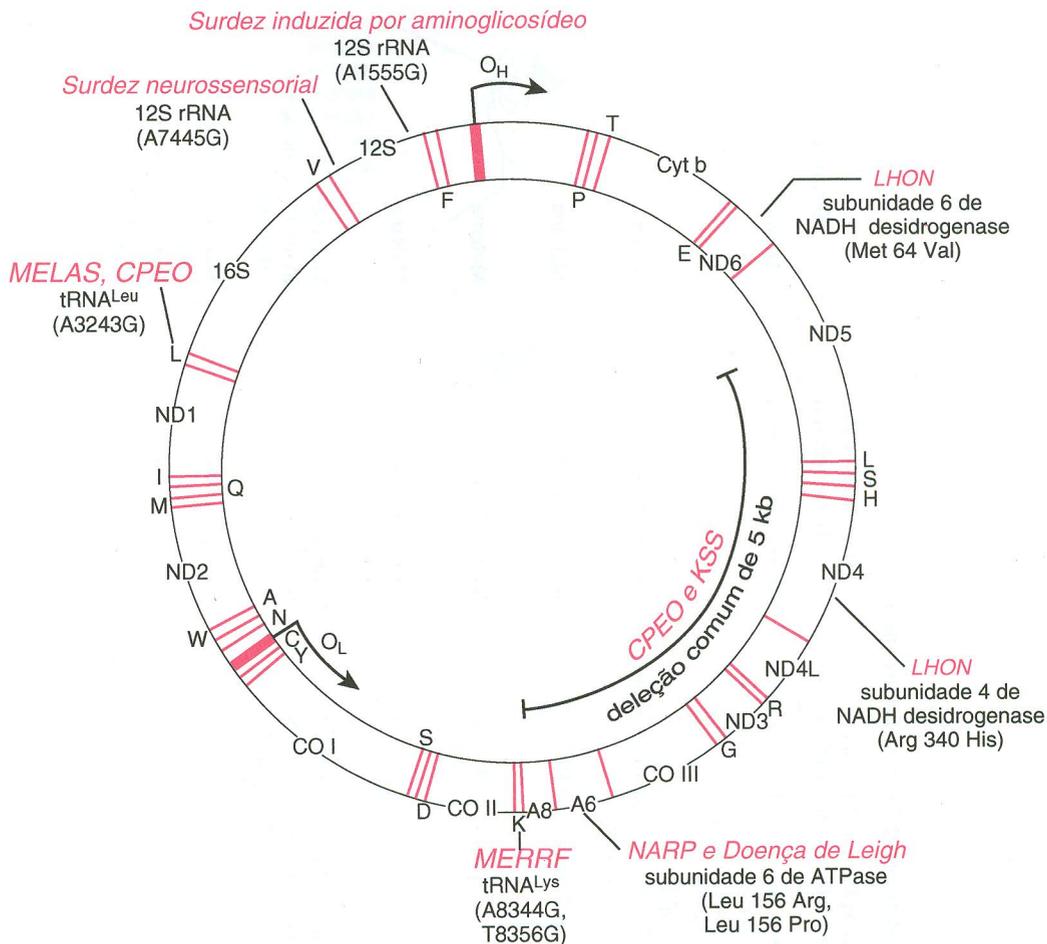


Fig. 12.30 A molécula de DNA mitocondrial mostrando a localização dos genes codificantes de 22 tRNAs, dois rRNAs e 13 proteínas do complexo de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Algumas das substituições mais comuns causadoras de doença e deleções no genoma de mtDNA também são ilustradas. O_H e O_L são as origens de replicação dos dois filamentos de DNA, respectivamente; 12S = RNA ribossomal 12S; 16S = RNA ribossomal 16S. Os tRNAs são indicados pelo código de uma letra para seus aminoácidos correspondentes (p. ex., L para leucina, K para lisina, e assim por diante). Os polipeptídeos 13 OXPHOS codificados pelo mtDNA incluem componentes do *Complexo I*: NADH desidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6); *Complexo III*: citocromo *b* (Cit *b*); *Complexo IV*: citocromo *c* oxidase I ou Cit *c* (COI, COII, COIII); e *Complexo V*: ATPase 6 (ATP-6, ATP-8). As abreviações de doenças usadas nas figuras (p. ex., MELAS, MERRF) são explicadas no Quadro 12.13. (Adaptada em parte de Shoffner J. M., Wallace D. C. [1995] Oxidative phosphorylation disease. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 7.^a ed. McGraw-Hill, New York. O conceito de ilustrar as mutações na molécula de mtDNA surgiu de Johns D. R. [1995] *Mitochondrial DNA and disease*. *New Engl J Med* 333: 638-644.)

caracterizada pelas chamadas fibras vermelhas anfractuadas, um fenótipo histológico causado por degeneração das fibras musculares e proliferação de mitocôndrias musculares anormais.

A GENÉTICA DAS DOENÇAS DE mtDNA

As primeiras mutações patogênicas no mtDNA foram identificadas no início da década de 1990. Inesperado e ainda inexplicado é o fato de que o genoma de mtDNA muta a uma taxa cerca de 10 vezes maior que o DNA nuclear. A gama de doenças clínicas resultantes de mutações no mtDNA é diversa (Fig. 12.31), embora predomine a doença neuromuscular. Mais de 100 rearranjos diferentes e 50 mutações de ponto que são relacionadas a doenças foram identificados no mtDNA. As mutações representativas e as doenças a elas associadas são apresentadas na Fig. 12.30 e no Quadro 12.13. Três tipos de mutações foram identificados no mtDNA: (1) mutações de sentido trocado nas

regiões codificantes dos genes que alteram a atividade de uma proteína OXPHOS; (2) mutações de ponto nos genes de tRNA ou rRNA que prejudicam a síntese de proteínas mitocondriais e (3) rearranjos que geram deleções ou duplicações da molécula de mtDNA.

Como indicado no Cap. 5, alguns heredogramas de doenças herdadas que não podiam ser explicadas por herança mendeliana típica de genes nucleares são hoje conhecidas como sendo causadas por mutações no mtDNA e por manifestar herança materna. Os distúrbios causados por mutações no mtDNA demonstram várias características incomuns que resultam de aspectos únicos da biologia e do funcionamento mitocondrial.

Herança Materna do mtDNA

Uma característica particular da genética do mtDNA, comparada com o genoma nuclear, é sua **herança materna**. Em contraste com a abundância de mitocôndrias em cada ovócito, os es-

QUADRO 12-13

Exemplos Representativos de Distúrbios Decorrentes de Mutações no DNA Mitochondrial e sua Herança

Doença	Fenótipo	Mutação mais Frequentemente na Molécula de mtDNA	Homoplásmia versus Heteroplásmia	Herança
Neuropatia óptica hereditária de Leber	Morte rápida do nervo óptico, levando à cegueira na vida adulta jovem	Substituição Arg340His no gene <i>ND1</i> do complexo I da cadeia de transporte de elétrons; outras mutações de sentido trocado do complexo I	Homoplásmica (geralmente)	Materna
NARP, doença de Leigh	Neuropatia, ataxia, retinite pigmentosa, retardo de desenvolvimento, retardo mental, acidemia láctica	Mutações de ponto na subunidade ATPase do gene 6	Heteroplásmica	Materna
MELAS	Encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo derrame; pode se manifestar apenas como diabetes melito	Mutação de ponto no tRNA ^{Leu}	Heteroplásmica	Materna
MERRF	Epilepsia mioclônica, fibras vermelhas anfractuadas no músculo, ataxia, surdez neurossensorial	Mutação de ponto no tRNA ^{Lis}	Heteroplásmica	Materna
Surdez	Surdez neurossensorial progressiva, em geral induzida por antibióticos aminoglicosídicos	Mutação A1555G no rRNA 12S	Homoplásmica	Materna
Oftalmoplegia externa progressiva crônica (CPEO)	Surdez neurossensorial não-sindrômica Fraqueza progressiva dos músculos extra-oculares	Mutação A7445G no rRNA 12S A mutação de ponto MELAS comum no tRNA ^{Lis} ; grandes deleções similares à KSS	Homoplásmica Heteroplásmica	Materna Materna, se mutações de ponto
Síndrome de Pearson	Insuficiência pancreática, pancitopenia, acidose láctica	Grandes deleções	Heteroplásmica	Mutações somáticas, esporádicas
Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)	PEO de início precoce com bloqueio cardíaco, pigmentação da retina	Grande deleção de 5 kb	Heteroplásmica	Mutações somáticas, esporádicas

Fig.
M. |per
pass
mtD
tem
uma
enq
taçã
gra
NA
é mFig
ça
mi

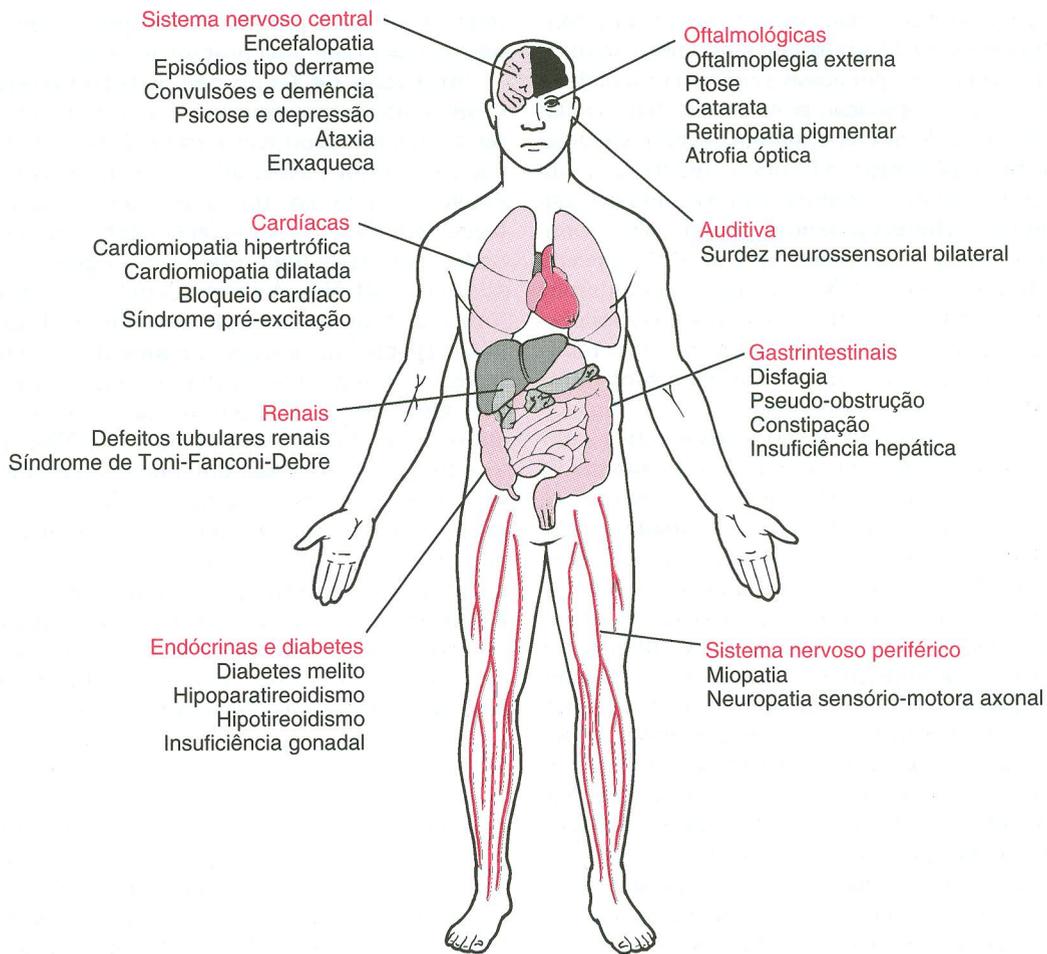


Fig. 12.31 A gama de tecidos afetados e fenótipos clínicos associados a mutações no mtDNA. (Modificado de Chinnery P. F., Turnbull D. M. [1999] Mitochondrial DNA and disease. Lancet 354:SI17-SI21.)

permatozóides contêm poucas mitocôndrias, e estas poucas não passam para a prole. Uma criança, portanto, herda todo o seu mtDNA da mãe e nada do pai. Suas filhas, por sua vez, transmitem o mtDNA, mas seus filhos não. Assim, todos os filhos de uma *mulher* com uma mutação no mtDNA herdam a mutação, enquanto nenhuma prole de um *homem* portador da mesma mutação herdará o DNA defeituoso. Um exemplo de um heredograma que manifesta herança materna de uma mutação no mtDNA que causa **neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON)** é mostrado na Fig. 12.32.

Homoplasmia e Heteroplasmia

Uma segunda característica única da genética do mtDNA surge do fato de que a maioria das células contém, como já foi mencionado, mais de 1.000 moléculas de mtDNA. Quando surge uma mutação no mtDNA, ela primeiro se apresenta em apenas uma das moléculas de mtDNA de uma mitocôndria. Quando a mitocôndria se divide por simples fissão, cada molécula de mtDNA replica-se dentro da mitocôndria. As moléculas de mtDNA distribuem-se aleatoriamente entre as novas organelas, e as mitocôndrias distribuem-se aleatoria-

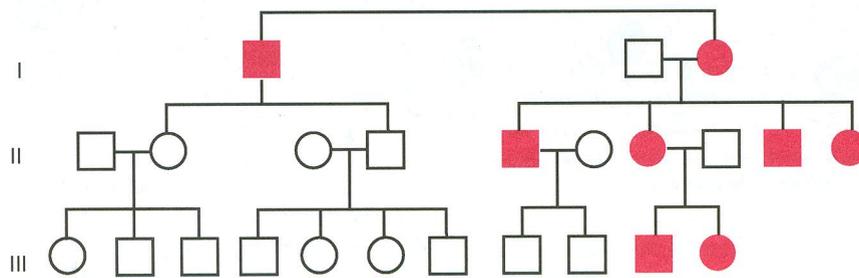


Fig. 12.32 Heredograma da neuropatia óptica hereditária de Leber, um distúrbio causado por um defeito no DNA mitocondrial. A herança é apenas pela linhagem materna, de acordo com a conhecida herança materna de DNA mitocondrial. Nenhum homem afetado transmite a doença.

mente entre as células filhas. Assim, quando uma célula contendo uma mistura de mtDNAs normais e mutantes se divide, suas células filhas podem, por acaso, receber mitocôndrias que contêm apenas uma população pura de mtDNA normal ou uma população pura de mtDNA mutantes (uma situação conhecida como **homoplasmia**). Alternativamente, a célula filha pode receber uma mistura de mitocôndrias, algumas com e outras sem a mutação (**heteroplasmia**) (Fig. 12.33). Como a expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA normal e mutante nas células que constituem tecidos diferentes, a penetrância reduzida, a expressividade variável e a pleiotropia são todas características típicas de heredogramas de distúrbios mitocondriais.

A heteroplasmia está associada a três características adicionais da genética do mtDNA que são de significado médico. Primeiro, as moléculas de mtDNA deletadas, uma classe comum de mutação de mtDNA que será discutida mais adiante, em geral não são transmitidas por mães clinicamente afetadas para seus filhos (os motivos desta exclusão não estão claros). Por outro lado, as mulheres portadoras de mutações de ponto de mtDNA heteroplásmico, ou de duplicações do mtDNA, em geral transmitem alguns mtDNAs mutantes para sua prole. Segundo, o número de moléculas de mtDNA dentro de cada ovócito é reduzido antes de ser subsequentemente ampliado para o enorme total visto nos ovócitos maduros. Esta restrição e subsequente ampliação de mtDNA durante a ovocitogênese é chamada de **"gargalo genético" mitocondrial**. Em consequência, a variabilidade na porcentagem de moléculas de mtDNA mutante vista na prole de uma mãe portadora de mutação em mtDNA surge, pelo menos em parte, pela amostragem de apenas um subgrupo de mtDNAs durante a ovocitogênese. Terceiro, a despeito da variabilidade no grau de heteroplasmia que surge deste "gargalo", as mães com uma alta proporção de moléculas mutantes de

mtDNA são mais propensas a ter prole clinicamente alterada que as mães com uma proporção menor.

Interação de Genomas Mitocondriais e Nucleares. Como tanto os genomas nuclear quanto mitocondrial contribuem com polipeptídeos para OXPHOS, não é surpreendente que os fenótipos associados a mutações nos genes nucleares em geral sejam indistinguíveis daqueles decorrentes de mutações no mtDNA. A evidência genética demonstrou, entretanto, que existe uma relação mais direta entre os genomas nuclear e mtDNA. A primeira indicação desta interação foi fornecida pela identificação da síndrome de **deleções no mtDNA transmitidas autossomicamente**, cujo fenótipo se assemelha à oftalmoplegia externa progressiva crônica (CPEO) (ver Quadro 12.13). Pode ser necessário mais de um gene autossômico para a integridade do mtDNA normal, pois tanto a forma autossômica dominante quanto a forma autossômica recessiva desta síndrome já foram reconhecidas. Uma segunda doença autossômica rara demonstrou que pelo menos um gene nuclear regula a abundância de moléculas de mtDNA. Este distúrbio, chamado de **síndrome de depleção de mtDNA**, é caracterizado por uma redução quantitativa no número de cópias de mtDNA em vários tecidos. O fenótipo clínico inclui miopatia, bem como outras características também encontradas nas doenças de mtDNA.

FENÓTIPO NOS DISTÚRBIOS MITOCONDRIAIS

As mutações mitocondriais em geral afetam os tecidos que precisam de uma fosforilação oxidativa íntata para atender às altas demandas de energia metabólica. Assim, as doenças mitocondriais com frequência envolvem o sistema neuromuscular e produzem encefalopatia, miopatia, ataxia, degeneração da retina e perda de funcionalidade dos músculos oculares externos. O espectro de doenças mitocondriais é muito amplo, entretanto, e, como ilustrado na Fig. 12.31, pode incluir dis-

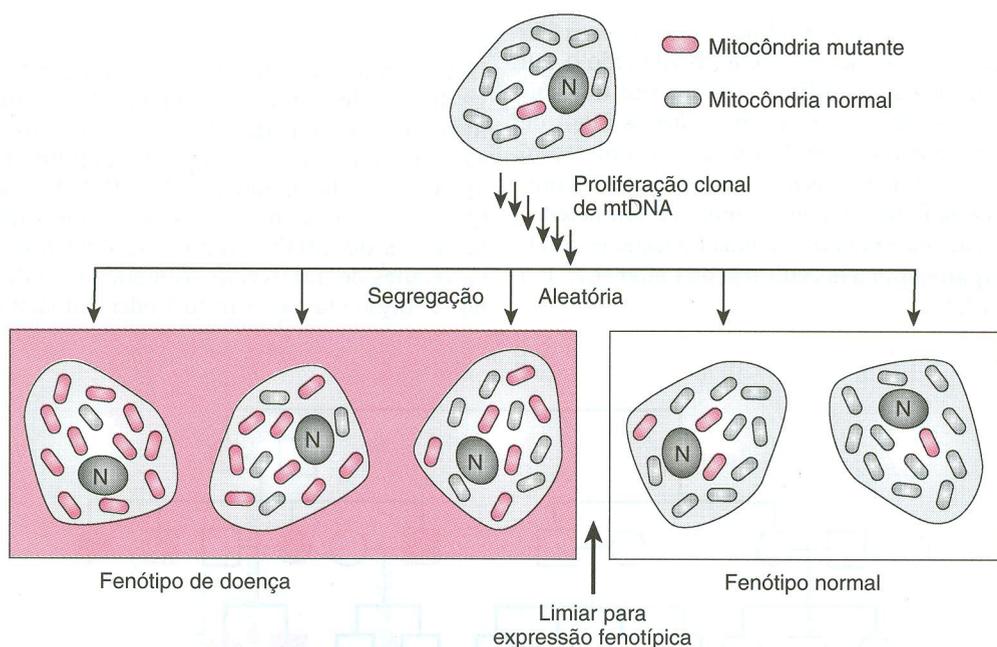


Fig. 12.33 Segregação replicativa de uma mutação mitocondrial heteroplásmica. A repartição aleatória de mitocôndrias mutantes e tipo selvagem por rodadas múltiplas de mitose produz uma coleção de células filhas com ampla variação na proporção de mitocôndrias mutantes e tipo selvagem levadas em cada célula. Resultam disfunções celulares e tissulares quando a fração de mitocôndrias portadoras da mutação excede um limiar.

função
célula
túrbio
O
tivam
nas m
exem
muta
soa e
ção s
de m
pesso
tura r
cula
muta
LAS
falor
derra
muta
tras l
cardi
diabe
subst
En
clôni
12.13
agora
fenóti
tocô
gra n
Quad
cos n
pacie

A
heter
nas d
semp
tais f
assoc
ral sã
come
mort
pode
inexp
dos h
vem
afeta
ciada
cia v
que
cool
ciada
de m

DO
A in
hosp
gas
ções
men

função hepática, insuficiência de medula óssea, deficiência de células das ilhotas e diabetes, surdez, bem como outros distúrbios.

O grau de distribuição de heteroplasmia contribui significativamente para a pleiotropia e a expressividade variável vistas nas mutações de mtDNA (ver Fig. 12.33 e Quadro 12.13). Por exemplo, em uma única família, uma população de mtDNA mutante pode estar associada a diabetes e surdez em uma pessoa e grave encefalopatia e convulsões em outra. Uma ilustração similar é dada pelo que parece ser a mais comum mutação de mtDNA (sua frequência na população finlandesa é de 1/7.000 pessoas), a mutação A3243G no gene de tRNA^{Leu} (a nomenclatura refere-se ao nucleotídeo normal na posição 3243 da molécula de mtDNA, seguido do nucleotídeo substituído). Esta mutação em geral está associada ao fenótipo chamado de MELAS (ver Fig. 12.30 e Quadro 12.13), um acrônimo para encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios tipo derrame (*stroke-like*). Em algumas famílias, entretanto, esta mutação causa predominantemente diabetes e surdez, em outras há CPEO (ver Quadro 12.13) e outras, ainda, apresentam cardiomiopatia. Em adição, entre 0,5% a 1,5% dos casos de diabetes melito da população em geral têm sido atribuídos à substituição A3243G.

Em algumas doenças de mtDNA, tais como a **epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuadas** (ver Quadro 12.13), a heteroplasmia é comum. A herança materna ocorre, mas agora há uma complexidade adicional ao padrão de herança e ao fenótipo porque cada criança herdará números variáveis de mitocôndrias com a mutação. Finalmente, a heteroplasmia é a regra na síndrome de Kearns-Sayre e na síndrome de Pearson (ver Quadro 12.13). Estes distúrbios ocorrem como casos esporádicos na família, e não há herança materna do distúrbio porque cada paciente representa uma mutação nova no DNA mitocondrial.

As Doenças no mtDNA São Multifatoriais. Embora a heteroplasmia seja a principal fonte de variabilidade fenotípica nas doenças de mtDNA, fatores adicionais também devem desempenhar um papel. Uma forte evidência para a existência de tais fatores é fornecida pelas famílias portadoras de mutações associadas à LHON, uma condição na qual as mutações em geral são homoplásmicas. A LHON expressa-se fenotipicamente como uma perda rápida e bilateral da visão central causada pela morte do nervo óptico em adultos jovens. As pessoas afetadas podem ser homens ou mulheres, mas há um aumento marcante e inexplicado na penetrância da doença em homens: de 80% a 90% dos homens portadores em heredogramas caucasianos desenvolvem perda visual, mas apenas de 8% a 32% das mulheres são afetadas. O fato de que as mutações LHON raramente são associadas a qualquer fenótipo fora do olho, bem como a penetrância variável influenciada pelo sexo, dão uma evidência direta de que a LHON é de origem multifatorial. Além disso, tanto o álcool quanto o tabaco são importantes fatores ecogenéticos associados ao aumento de probabilidade de cegueira nos portadores de mutações LHON.

DOENÇAS FARMACOGENÉTICAS

A incidência geral de reações adversas a drogas, pelo menos nos hospitais dos EUA, é de cerca de 6,7%. As reações fatais a drogas ocorrem com uma incidência de cerca de 0,3%. Estas reações não-antecipadas a medicamentos são muito, se não totalmente, determinadas por fatores genéticos. A **farmacogenética**

é a área especial da genética bioquímica que lida com a variabilidade na resposta a drogas que é decorrente de variação genética. Em seu sentido restrito, a farmacogenética pode ser restrita às variações genéticas que alteram a habilidade do corpo no que diz respeito a absorver, transportar, metabolizar ou excretar drogas ou seus metabólitos. Em termos mais amplos e mais úteis, a farmacogenética inclui qualquer variação geneticamente determinada em resposta a drogas. Este tipo de variação inclui, por exemplo, o efeito dos barbituratos em precipitar uma doença clínica em pessoas com porfiria intermitente aguda (ver mais adiante), bem como o efeito do uso de álcool por mulheres grávidas sobre a incidência da síndrome do álcool fetal. Cinco exemplos de importantes variações farmacogenéticas são descritos resumidamente nesta seção.

A origem dos polimorfismos de respostas a drogas e os mecanismos pelos quais eles são mantidos geram um problema interessante. Eles obviamente não se desenvolveram em resposta a drogas, pois antecedem as respectivas drogas. Lidar com as drogas, bem como responder a elas, requer muitas reações bioquímicas, e as enzimas envolvidas podem participar do metabolismo de substâncias comuns nos alimentos. Sugeriu-se que estes polimorfismos surgiram como resultado de pressões seletivas dietéticas diferentes em populações diferentes. Esta visão é apoiada pela distribuição geográfica de muitos destes alelos.

Reconhecendo que há uma variação normal em resposta a drogas, os farmacologistas definem a "potência" de uma droga pela dose que produz um determinado efeito em 50% da população. Para características genéticas, a variação contínua em geral é mais bem explicada com base na herança multifatorial ou por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, como discutido no Cap. 15. Mas a resposta às drogas também pode apresentar variação descontínua, com grandes distinções entre graus diferentes de resposta. O achado de uma distribuição populacional bimodal ou trimodal da atividade de uma enzima do metabolismo de uma droga pode indicar que a enzima é codificada por alelos em um único locus polimórfico.

Problemas Genéticos na Anestesia

HIPERTERMIA MALIGNA

A hipertermia maligna é uma condição autossômica dominante na qual pode haver uma resposta adversa intensa à administração de todos os anestésicos de inalação comumente usados (p. ex., halotano) e relaxantes musculares tais como o cloreto de succinilcolina, desenvolvimento de uma temperatura muito alta, parada de contração muscular e hipercatabolismo. A condição é uma causa importante, se não comum, de morte na anestesia, com uma incidência que é maior em crianças (1 em 12.000) que em adultos (1 em 100.000). Curiosamente, os homens com hipertermia maligna superam as mulheres, 2,5 para 1, uma diferença que provavelmente tem base hormonal.

A anomalia fisiológica fundamental na doença é um nível elevado de cálcio ionizado no sarcoplasma do músculo. Este aumento leva a uma rigidez muscular, à elevação da temperatura corpórea e a outras anomalias. A maioria dos casos de hipertermia maligna está associada a mutações em um gene chamado *RYR1*, codificando o canal de liberação de cálcio. O gene *RYR1* está mapeado no cromossomo 19. A análise de ligação indica que as mutações em *RYR1* são responsáveis por apenas cerca de 50% dos casos, e até o momento as mutações neste gene foram encontradas em 40% das famílias com hipertermia maligna. Vá-

rios outros loci para hipertermia foram identificados e em um caso encontrou-se uma mutação no gene *CACNLIA3*, que codifica a subunidade α -1 do receptor de diidropiridina.

A necessidade de precauções especiais quando uma pessoa em risco precisa de anestesia é óbvia. O sódio dantrolene é efetivo quanto a evitar ou reduzir a gravidade da resposta se ocorrer um ataque insuspeito, e anestésicos alternativos podem ser dados aos pacientes em risco.

COLINESTERASE SÉRICA E SENSIBILIDADE À SUCCINILCOLINA

A colinesterase sérica é uma enzima do plasma humano que tem a propriedade de hidrolisar os ésteres de colina, tais como a acetilcolina. A função normal da enzima é obscura, mas sua total ausência é compatível com a saúde normal. Portanto, ela não deve ter um papel fisiológico importante. Um relaxante muscular muito usado, a succinilcolina (que é usada como auxiliar à anestesia geral), é composto de duas moléculas de acetilcolina e normalmente é hidrolisado pela colinesterase, um processo que reduz a quantidade de succinilcolina que atinge os terminais das placas motoras. Esta hidrólise é considerada na dosagem dada a um paciente comum. Entretanto, pelo menos nas populações européias, cerca de 1 em 3.300 pessoas é homozigota para um alelo atípico de colinesterase. Sendo incapaz de degradar a succinilcolina em uma taxa normal, os homozigotos respondem anormalmente à sua administração com uma apnéia prolongada (que dura de 1 a várias horas) e requerem suporte respiratório artificial.

Genética. O gene alterado na sensibilidade à succinilcolina é o de butirilcolinesterase (*BCHE*), situado no cromossomo 3. Os principais determinantes da atividade de colinesterase no plasma são dois alelos co-dominantes do gene *BCHE*, conhecidos como alelos "usual" (*U*) e "atípico" (*A*). O alelo atípico é o resultado de uma mutação de sentido trocado (*Asp70Gli*). Outro alelo de substituição de sentido trocado, a variante *K*, também é comum, mas os homozigotos *K/K* têm um aumento de sensibilidade à succinilcolina. Os compostos genéticos dos alelos *A* e *K*, por outro lado, às vezes são sensíveis e às vezes não, mas os fatores responsáveis por esta variação não são claros. A deficiência de colinesterase em geral se deve à homozigose do alelo atípico. A enzima produzida pelos homozigotos é qualitativamente alterada e tem menor atividade que o tipo usual. Outras variantes raras de *BCHE* que conferem sensibilidade à succinilcolina também foram identificadas.

A identificação das substituições específicas que estão presentes nos alelos de colinesterase permite a genotipagem precisa dos pacientes, a determinação do significado clínico da variante *K* e a melhoria da análise de heredogramas e da consulta genética.

Outras Doenças Farmacogenéticas Importantes

O POLIMORFISMO DE ACETILAÇÃO

Este importante polimorfismo farmacogenético foi descoberto durante o tratamento da tuberculose com a droga isoniazida, quando uma alta incidência de neuropatia periférica foi observada. Após uma dose de teste, a taxa de desaparecimento da isoniazida do plasma apresentou uma distribuição bimodal na população, permitindo a identificação das pessoas como acetiladores rápidos ou lentos (inativadores da droga). Hoje está claro que os fenótipos de inativação lenta e rápida são primariamente de-

vidos a diferenças alélicas em um gene de *N*-acetiltransferase, *NAT2*, que está mapeado no cromossomo 8. Foram descritos três alelos principais de acetilação lenta, juntamente com um grande número de alelos *NAT2* raros. Os acetiladores lentos têm uma diminuição substancial na quantidade de *N*-acetiltransferase no fígado e são homozigotos para os alelos recessivos neste locus. Os inativadores rápidos são homozigotos ou heterozigotos normais. Um segundo gene de *N*-acetiltransferase, *NAT1*, também foi identificado no cromossomo 8. Um só polimorfismo de acetilação lenta foi identificado neste gene. As frequências dos alelos de acetilação lenta têm diferenças étnicas marcantes: por exemplo, uma minoria (de 5% a 20%) dos asiáticos tem o fenótipo de acetilação lenta, enquanto 50% dos afro-americanos e até 65% dos caucasianos são homozigotos para acetilação lenta. Em algumas populações mediterrâneas, a frequência de acetiladores lentos é maior que 90%.

Significado. Além de seu efeito na inativação de isoniazida, o fenótipo de acetilação afeta a disposição de uma ampla variedade de outras drogas e xenobióticos. Por exemplo, os acetiladores rápidos não só têm uma taxa de falha maior com a terapia semanal de isoniazida para tuberculose, mas também requerem doses maiores de hidralazina para controlar a hipertensão e de dapsona para tratar a hanseníase e outras infecções. Contrariamente, os acetiladores lentos correm um risco aumentado de desenvolver uma síndrome tipo *lupus* eritematoso sistêmico induzida por drogas quando recebem hidralazina, reações hematológicas adversas após tratamento com isoniazida e respostas adversas idiossincráticas induzidas por sulfonamida. Além disso, os acetiladores lentos expostos a arilaminas carcinogênicas (p. ex., benzidina) têm uma incidência aumentada de câncer de bexiga e, nas mulheres fumantes após a menopausa, câncer de mama.

PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA: ALTERAÇÕES RELACIONADAS A DROGAS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A **porfiria intermitente aguda** é uma doença autossômica dominante associada à disfunção neurológica intermitente. Os episódios clínicos são iniciados por um grande número de medicações, hormônios esteróides e inanição. Como descreveremos, a regulação alterada dos genes que controlam a síntese de hemo é responsável pela fisiopatologia.

O defeito primário na porfiria intermitente aguda é uma deficiência de porfobilinogênio (*PBG*) desaminase, uma enzima na via biossintética do hemo (Fig. 12.34). Todos os pacientes com porfiria intermitente aguda, seja sua doença clinicamente latente (e ela permanece latente durante a vida na grande maioria dos pacientes, cerca de 90%) ou expressa (cerca de 10%), têm uma redução de aproximadamente 50% na atividade enzimática de *PBG* desaminase. Esta redução é compatível com a herança autossômica dominante.

A expressão clínica da doença ocorre em resposta a eventos que diminuem a concentração de hemo na célula hepática. As drogas que não são seguras para os pacientes incluem, por exemplo, os barbituratos, alguns hormônios esteróides e várias outras substâncias químicas. A exposição a estes compostos aumenta a síntese de citocromos hepáticos *P450*, uma classe de proteínas contendo hemo. Como resultado, o nível celular de hemo cai, reduzindo a inibição *feedback* de hemo na síntese do ácido δ -aminolevulínico, a etapa limitadora de velocidade na via de síntese do hemo (Fig. 12.34). O aumento de expressão da sintase é obtido tanto por mecanismos transcricionais

Fig. 12
cerca de
línico (t
tese de
da, e o
porphy
York, p

quanto
sada p
nuição
secun
fato d
inade
mas s
condi
A pa
Tante
tral s
fato,
clíni
agud

DEFI

A de
enzi
duz
400
hon
nic
mai
bér
os
teri
çõe
ra
ca
fle
bi
co
ch
pr
af
ar

te
n
te

AIP clinicamente latente

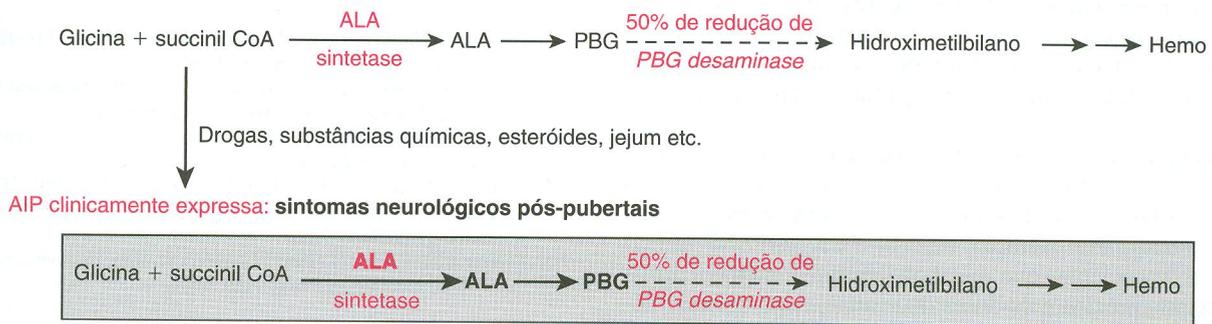


Fig. 12.34 A patogenia da porfiria intermitente aguda (AIP). Os pacientes com AIP que são clinicamente latentes ou afetados têm cerca de metade dos níveis dos controles de porfobilinogênio (PBG) desaminase. Quando a atividade hepática da δ -ácido aminolevulínico (ALA) sintase está aumentada nos portadores por exposição a agentes indutores (p. ex., drogas, substâncias químicas), a síntese de ALA e PBG é aumentada. A atividade residual de PBG desaminase (aproximadamente 50% da dos controles) é sobrecarregada, e o acúmulo de ALA e PBG causa a doença clínica. (Redesenhado de Kappas A., Sassa S., Galbraith R. A., Nordmann Y. [1989] *The porphyrias*. In Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 6.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1.305-1.365.)

quanto traducionais. Assim, a deficiência relativa de hemo causada pela redução de PBG desaminase e a conseqüente diminuição nos reservatórios de hemo é responsável por um aumento *secundário* na sintase em níveis maiores que a faixa normal. O fato de que metade da atividade normal de PBG desaminase é inadequada para lidar com a sobrecarga metabólica em algumas situações contribui tanto para a expressão dominante da condição quanto para a natureza episódica da doença clínica. A patogenia da doença do sistema nervoso é desconhecida. Tanto o sistema nervoso periférico quanto o autônomo e o central são afetados, e as manifestações clínicas são diversas. De fato, este distúrbio é um dos grandes mistérios na medicina clínica, com manifestações que variam desde dor abdominal aguda até psicose.

DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima ubíqua ligada ao X, é o defeito enzimático que produz doença mais comum dos humanos, e estima-se que afete 400 milhões de pessoas em todo o mundo; cerca de 10% dos homens afro-americanos são deficientes de G6PD e são clinicamente suscetíveis à hemólise induzida por drogas. Com mais de 400 variantes descritas, a deficiência de G6PD também parece ser um dos distúrbios genéticos mais heterogêneos já reconhecidos. Mais de 70 destas variantes foram caracterizadas no nível molecular. Todas, exceto duas, são mutações de ponto, sendo as exceções deleções da matriz de leitura de um pequeno número de códons. A alta frequência gênica de variantes de G6PD em algumas populações parece refletir o fato de que a deficiência de G6PD, como a hemoglobina falciforme e a talassemia, conferem alguma proteção contra a malária (ver Cap. 7). Esta enzimopatia inicialmente chamou a atenção quando se viu que a droga antimalarígena primaquina induzia anemia hemolítica em alguns homens afro-americanos, que subsequentemente se comprovou sofriram de deficiência de G6PD.

O mecanismo da hemólise induzida por drogas é razoavelmente claro. Um dos produtos da G6PD, a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), é a principal fonte de equivalentes redutores nas hemácias. A NADPH protege a célula contra o

dano oxidativo regenerando o glutatião reduzido de sua forma oxidada. Na deficiência de G6PD, as drogas oxidantes, tais como a primaquina, depletam a célula de glutatião reduzido, e o dano oxidativo conseqüente leva à hemólise. Os compostos agressores adicionais incluem os antibióticos sulfonamida, as sulfonas, tais como a dapsona (amplamente usada no tratamento da hanseníase e nas infecções por *Pneumocystis carinii*), a naftalina (antimofo) e algumas outras.

O favismo, uma grave anemia hemolítica que resulta da ingestão do feijão *Vicia faba* e que é conhecido há muito tempo em partes do mediterrâneo, deve-se à extrema deficiência de G6PD. O defeito enzimático torna as células vulneráveis aos oxidantes dos feijões de fava (Pitágoras, o matemático grego, alertou seus seguidores quanto ao perigo de comer estes feijões). Nas áreas em que as variantes da deficiência grave como o alelo mediterrâneo são prevalentes, elas são uma importante causa de icterícia neonatal e de anemia hemolítica não-esferocítica congênita.

Farmacogenômica

O Projeto do Genoma Humano levou ao reconhecimento de que a informação genômica pode ser aplicada de modo benéfico a problemas de farmacogenética em um novo campo de estudo chamado de **farmacogenômica**. Existem pelo menos dois aspectos deste excitante desenvolvimento. Primeiro, e de modo bem geral, é provável que a criação de novas drogas vá ser muito influenciada pelo conhecimento de todos os genes. Segundo, um perfil farmacogenético de cada indivíduo que é candidato a receber uma medicação pode ser desenvolvido, com dois benefícios possíveis. O primeiro benefício é que deverá ser possível prever, com um alto grau de precisão, as pessoas que provavelmente terão uma resposta adversa a uma medicação, mesmo sem o conhecimento específico do metabolismo da droga ou dos alelos específicos que modulam as respostas a ela. Assim, o desenvolvimento de um mapa de alta densidade de polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP) (ver Cap. 6) do genoma humano poderia ser usado para desenvolver um perfil abreviado de SNP — um padrão específico de marcadores SNP — de pacientes que responderam adversamente a uma droga. Em concordância, os pacientes com perfis comparáveis, que, por-

tanto, estão em risco aumentado de uma resposta adversa, poderiam evitar medicações potencialmente perigosas. Além disso, as drogas que são muito benéficas e não-tóxicas para algumas pessoas — mesmo que a minoria de uma população — poderiam ser administradas com segurança a pacientes sem o perfil de risco SNP.

Um segundo benefício pode vir do desenvolvimento de perfis SNP farmacogenéticos abreviados: seria possível prever a eficácia provável da medicação em uma pessoa antes da droga ser administrada. Por exemplo, o perfil abreviado SNP farmacogenético de pacientes que metabolizam rapidamente a droga — e, portanto, precisam de doses mais altas — poderia ser determinado (mais uma vez, mesmo sem o conhecimento específico dos eventos bioquímicos envolvidos). Os pacientes com perfis SNP similares seriam, portanto, monitorados para que se tivesse convicção de que a droga atingiria níveis terapêuticos.

Embora os programas de triagem para perfis SNP farmacogenéticos abreviados já sugeridos possam ser dispendiosos, os custos podem ser mais que compensadores pela redução de respostas adversas a drogas e um tratamento mais efetivo. Além disso, o custo de *chips* de perfil de SNP abreviados provavelmente diminuirá se grandes quantidades de *chips* idênticos forem produzidas. Independente da precisão de qualquer destas previsões específicas, o projeto do genoma terá um grande impacto na criação e na administração de drogas, talvez de maneiras ainda não imaginadas.

Farmacogenética na Medicina

Os exemplos anteriores demonstram a importância e o potencial da farmacogenética na medicina. Cada um representa um problema farmacogenético significativo no qual a terapia racional deve levar em conta as grandes diferenças individuais geneticamente determinadas na resposta. Em uma escala ampla, o papel do metabolismo de drogas em muitos processos fisiopatológicos, incluindo a mutagênese, a carcinogênese, a teratogênese, os danos citotóxicos e as doenças auto-imunes, é de grande importância. O tratamento de pacientes com reações tóxicas a drogas ou substâncias químicas deve incluir, quando possível, uma avaliação da condição farmacogenética do paciente e dos membros da família, bem como uma consulta genética apropriada sobre os riscos potenciais de algumas drogas. A aplicação dos conhecimentos do Projeto do Genoma Humano à farmacogenética deve levar a uma era de “medicina individualizada”, na qual medicações apropriadas e terapias são criadas para cada paciente, considerando não apenas a apresentação e o curso da doença, mas também a constituição genética específica do indivíduo.

CONCLUSÃO

À medida que a patologia bioquímica de um número crescente de doenças genéticas for gradualmente esclarecida, e os componentes genéticos de doenças comuns multifatoriais forem caracterizados, novos e imprevisíveis mecanismos fisiopatológicos serão reconhecidos. A compreensão da doença genética em nível molecular não só contribui para o conhecimento da biologia humana normal, mas também é o alicerce para tratamentos efetivos destes distúrbios. Os princípios aplicados no tratamento da doença genética serão apresentados no Cap. 13, com exemplos que incluem muitas das condições que foram descritas aqui e no Cap. 11.

Referências Gerais

- Cooper DN, Krawczak M (1993) Human Gene Mutation. Bios Scientific Publishers, Oxford, England.
- Harris H (1980) The Principles of Human Biochemical Genetics, 3rd ed. Elsevier North-Holland, Amsterdam.
- McKusick VA (1972) Heritable Disorders of Connective Tissue, 4th ed. CV Mosby, St. Louis.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) (2001) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Scriver CR, Childs B (1989) Garrod's Inborn Factors and Disease. Oxford University Press, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

- Byers PH (2001) Disorders of collagen biosynthesis and structure. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5241–5286.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, et al (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332:1475–1480.
- Chinnery PF, Turnbull DM (1999) Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 354:SI17–SI21.
- Cox DW (2001) α_1 -Antitrypsin deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5559–5586.
- Davis L, Britten JJ, Morgan M (1997) Cholinesterase—its significance in anaesthetic practice. *Anaesthesia* 52:244–260.
- Dubowitz V (1997) The muscular dystrophies—clarity or chaos? *N Engl J Med* 336:650–651.
- Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, et al (1998) Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta [see comments]. *N Engl J Med* 339:947–952.
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (2001) Familial hypercholesterolemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2863–2914.
- Hackam AS, Wellington CL, Hayden MR (1998) The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. *Clin Genet* 53:233–242.
- Johns DR (1995) Mitochondrial DNA and disease. *New Engl J Med* 333:638–644.
- Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, et al (1996) Risk of dementia among relatives of Alzheimer disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 46:641.
- Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N (1997) Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 13:450–454.
- Loke J, MacLennan DH (1998) Malignant hyperthermia and central core disease: Disorders of Ca^{2+} release channels. *Am J Med* 104:470–486.
- Martin JB (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *New Engl J Med* 340:1970–1980.
- Nance MA (1997) Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathol* 7:881–900. [This entire volume of the journal is devoted to CAG repeat diseases.]
- Nebert DW (1999) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: Why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet* 56:247–258.
- Nebert DW (1997) Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 60:265–271.
- Roses AD (2000) Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet* 355:1358–1361.
- Scriver CR, Kaufman S (2001) The hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1667–1724.

URI

Colla
http
Cyst
http
Hum
http
Pher
http

Pro

1.

2.

3.

- Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: Lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 15:267–272.
- Shoffner JM (1999) Oxidative phosphorylation disease diagnosis. *Ann NY Acad Sci* 893:42–60.
- St George-Hyslop PH, Farrer LA, Goedert M (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Diseases with cerebral deposition of fibrillar proteins. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5875–5902.
- Wallace DC, Lott MT, Brown MD, Kerstann K (2001) Mitochondria and neuro-ophthalmologic diseases. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2425–2512.
- Warren ST, Nelson DL (1994) Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 271:536–542.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic fibrosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5121–5188.
- Worton R (2000) Muscular dystrophies: Diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 270:755–756.
- Worton RG, Molnan MJ, Brais B, Karpati G (2001) The muscular dystrophies. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5493–5524.
- Zielinski J (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67:117–133.
- Zielinski J, Corey M, Rozmahel R, et al (1999) Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 22:128–129.

URLs for Mutation Database

Collagem mutation database

<http://www.le.ac.uk/genetics/collagem/>

Cystic fibrosis and CFTR gene mutation database

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Human mitochondrial genome disease database

<http://www.gem.emmory.edu/mitomap.html>

Phenylalanine hydroxylase mutation database

<http://www.mcgill.ca/pahdb>

Problemas

- Um alelo mutante no locus receptor de LDL (que leva à hipercolesterolemia familiar) codifica uma proteína alongada que tem cerca de 50.000 dáltons a mais que o receptor normal, com 120.000 dáltons. Indique pelo menos três mecanismos que possam contribuir para esta anomalia. Aproximadamente quantos nucleotídeos extras precisariam ser traduzidos para adicionar 50.000 dáltons à proteína?
- Ao discutir as mudanças de nucleotídeos encontradas na região codificante do gene CF, dissemos que algumas das mudanças (mudança de sentido) encontradas até agora são apenas mutações “hipotéticas” causadoras de doença. Que critérios se precisaria preencher antes de saber que uma mudança de nucleotídeo é patogênica e não um polimorfismo benigno?
- Johnny, com 2 anos de idade, não está se desenvolvendo. As investigações mostram que, embora ele tenha os achados clínicos de CF, o cloreto de seu suor é normal. O cloreto do suor é normal em menos de 2% dos pacientes com CF. Seu pediatra e seus genitores querem saber se a análise de DNA pode determinar se ele de fato tem CF.
 - A análise de DNA seria usada neste caso? Resuma as etapas envolvidas na obtenção de um diagnóstico de DNA para CF.
 - Se ele tiver CF, qual a probabilidade de que seja homocigoto para a mutação $\Delta F508$? (Suponha que 85% das mutações CF possam ser detectadas na época em que você está sendo consultado e que os genitores da criança descendam no noroeste da Europa, onde o alelo $\Delta F508$ tem uma frequência de 0,70).
 - Se ele não tiver a mutação $\Delta F508$, isto não comprova o diagnóstico? Explique.
- James é a única pessoa na família a ser afetada pela DMD. Ele tem um irmão não-afetado, Joe. A análise de DNA mostra que James tem uma deleção no gene *DMD* e que Joe recebeu o mesmo cromossomo X materno, mas sem a deleção. Que consulta genética você daria aos genitores quanto ao risco de recorrência de DMD em uma futura gestação?
- A *DMD* tem uma alta taxa de mutação, mas não mostra variação étnica na frequência. Use seus conhecimentos sobre o gene e a genética da DMD para sugerir por que este distúrbio é igualmente comum em todas as populações.
- Nos pacientes com osteogênese imperfeita, explique por que as mutações de mudança de sentido nas posições de glicina na hélice tripla do colágeno tipo I são confinadas a um número limitado de outros aminoácidos (Ala, Ser, Cis, Arg, Val, Asp).
- A eletroforese dos hemolisados de hemácias mostra que algumas mulheres têm duas bandas de G6PD, mas que os homens têm apenas uma banda. Explique esta observação e o possível significado patológico e genético de achar duas bandas em uma mulher afro-americana.
- Uma criança de 2 anos, filha de primos em primeiro grau, tem um inexplicado retardo de desenvolvimento. Um levantamento de vários parâmetros bioquímicos indica que a criança tem uma deficiência de quatro enzimas lisossômicas. Explique como uma única mutação autossômica recessiva pode causar a perda de função de quatro atividades enzimáticas. Por que é mais provável que a criança tenha uma condição autossômica recessiva, se tiver alguma condição genética?
- O efeito de um alelo dominante negativo ilustra um mecanismo geral pelo qual as mutações em uma proteína causam uma doença herdada predominantemente. Que outro mecanismo é comumente associado à dominância em genes que codificam as subunidades de proteínas multiméricas?
- Os efeitos clínicos das mutações em uma proteína de manutenção com frequência são limitados a um ou a alguns tecidos, em geral tecidos nos quais a proteína é abundante e serve a uma função especial. Identifique e discuta exemplos que ilustrem esta generalização e explique por que eles são adequados.
- A relação entre o local no qual uma proteína se expressa e o local da patologia de uma doença genética pode ser imprevisível. Além disso, o tecido com falta da proteína mutante pode até não ser afetado pela patologia. Cite exemplos deste último fenômeno e discuta-os.
- Os dois alelos de pseudodeficiência de hex A são Arg 247 Trp e Arg 249 Trp. Qual o motivo provável para que as substituições de mudança de sentido destes alelos estejam tão próximas na proteína?