



LUIZA GONZAGA PIOVESANA

**“CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS
DYT1 E DYT6 EM PACIENTES COM DISTONIA NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA”**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIZA GONZAGA PIOVESANA

**“CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS
DYT1 E DYT6 EM PACIENTES COM DISTONIA NA POPULAÇÃO
BRASILEIRA”**

Orientadora: Dra. Anelyssa Cysne Frota D’Abreu

Coorientadora: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de *Mestra em Ciências*.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DEFENDIDA PELA ALUNA LUIZA GONZAGA PIOVESANA E
ORIENTADA PELA DRA. ANELYSSA CYSNE FROTA D’ABREU
Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P659c Piovesana, Luiza Gonzaga, 1983 -
Caracterização clínica e determinação dos genótipos
DYT1 e DYT6 em pacientes com distonia na população
brasileira / Luiza Gonzaga Piovesana. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador : Anelyssa Cysne Frota D'Abreu.
Coorientador : Iscia Teresinha Lopes-Cendes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Distonia muscular deformante. 2. Análise de
sequência de DNA. 3. Brasil - População. 4. Distonia
muscular deformante tipo 1. 5. Distonia de torção 6. I.
D'Abreu, Anelyssa Cysne Frota. II. Lopes-Cendes, Iscia
Teresinha, 1964-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título..

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clinical characteristics and DYT1 and DYT6 genotyping of brazilian patients with dystonia

Palavras-chave em inglês: Dystonia musculorum deformans
DNA sequence analysis

Brazil, Population

Dystonia musculorum deformans type 1

Dystonia 6, torsion

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Anelyssa Cysne Frota D'Abreu [Orientador]

Claudia Vianna Maurer Morelli

Carlos Roberto de Melo Rieder

Data de defesa: 03-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUIZA GONZAGA PIOVESANA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANELYSSA CYSNE FROTA D'ABREU

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ANELYSSA CYSNE FROTA D'ABREU



2. PROF(A). DR(A). CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI



3. PROF(A). DR(A). CARLOS ROBERTO DE MELLO RIEDER



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 03 de julho de 2014

SUMÁRIO

I-	Resumo.....	viii
II-	Abstract.....	x
III-	Lista de Tabelas.....	xi
IV-	Lista de Figuras.....	xii
V-	Lista de Abreviações.....	xiii
VI-	Introdução.....	14
VII-	Justificativa.....	24
VIII-	Objetivos.....	25
IX-	Materiais e Métodos.....	26
X-	Resultados.....	34
XI-	Discussão.....	41
XII-	Conclusões.....	49
XIII-	Referências Bibliográficas.....	50
XIV-	Anexos.....	57
1.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	57
2.	Protocolo Clínico.....	62
3.	Artigo Submetido.....	68

RESUMO

As distonias caracterizam-se por movimentos involuntários e torsionais, que se manifestam de diferentes formas e podem afetar quaisquer músculos voluntários. Diversas mutações genéticas foram associadas às distonias primárias, destacando-se a DYT1, DYT5 e DYT6. O gene *DYT1/TOR1A* foi o primeiro identificado, ao apresentar uma deleção GAG que produz uma proteína mutante que altera conexões núcleo-cito-esqueléticas e o processamento proteico. O fenótipo típico inicia-se dos três aos 26 anos, tem penetrância de 30%, sendo 60% com acometimento generalizado ou multifocal. O gene *DYT6/THAP1* possui diversos polimorfismos descritos e acredita-se que seja o segundo em prevalência entre as distonias hereditárias. Possui penetrância ainda menor e fenótipo de início precoce, envolvimento crânio-cervical e de fala. A frequência, etiologia e as alterações genéticas das distonias não são conhecidas na população brasileira, que por suas características específicas, não podem ter os resultados de outras populações simplesmente transpostos para a nossa. Nosso objetivo, portanto, foi caracterizar genética e clinicamente uma amostra de pacientes brasileiros com distonia. Os indivíduos foram recrutados no Ambulatório de Distúrbios do Movimento e de Distonia. Os pacientes foram avaliados por um questionário padronizado, seguido por pesquisa das mutações DYT1 e DYT6. A avaliação clínica demonstrou que a nossa amostra apresenta padrão semelhante ao internacional, com pacientes de início jovem tendendo a apresentar quadros generalizados e com história familiar positiva e pacientes adultos mantendo quadros focais ou segmentares e esporádicos. A pesquisa de mutações identificou 1 mutação *missense* já descrita na literatura, envolvida na penetrância da DYT1 em indivíduos com a mutação causadora clássica da doença e que pode conferir risco quando encontrada isoladamente. Também encontramos uma deleção de 6 pares de base no fim do exon 1 do gene *THAP1* que em avaliações preliminares altera o sítio de *splicing* e acaba por abortar a tradução da proteína por meio de um stop códon precoce. Concluímos que nossos pacientes tem apresentação clínica semelhante a literatura mundial, porém com características genotípicas diferentes, pois não encontramos em nenhum indivíduo as mutações classicamente associadas as

doenças. A diferenciação das distonias em subtipos e o entendimento das vias moleculares comuns devem fazer parte de investigações futuras.

ABSTRACT

Dystonia is characterized by involuntary and torsional movements, which manifest themselves in various forms and can affect any voluntary muscle. Several genetic mutations have been associated with isolated hereditary dystonia, most notably the DYT1 and DYT6. The DYT1 is caused by a GAG deletion at the *TOR1A* gene, which produces a protein that alters intracellular membranes connections and protein processing. The typical phenotype starts from three to 26 years of age, it has penetrance of 30 % and 60% of the subjects will progress to a generalized or multifocal involvement. The *DYT6/THAP1* gene has several polymorphisms described, and it is believed to be the second in prevalence among the hereditary dystonias. DYT6 has an even lower penetrance. It is characteristically an early-onset, dystonia with craniocervical and speech involvement. The frequency, etiology and genetic alterations of dystonia are not known in the Brazilian population, which due to its specific characteristics may not share of the same genetic background. Our aim was to evaluate genetically and clinically a sample of Brazilian patients with dystonia. Subjects were recruited from the Outpatient Movement Disorders and Dystonia Clinics. Patients were assessed by a standardized questionnaire, followed by molecular testing for DYT1 and DYT6. Our cohort showed similar clinical characteristics with the literature, where young patients with generalized dystonia and positive family history were commonly grouped together, while focal and segmental cases that appear in adulthood tended to stabilize. Sequencing of the DYT1 gene found a known *missense* mutation that contributes to low penetrance in individual with the typical DYT1 mutation but might be a risk factor when found in isolation. Sequencing of the DYT6 gene showed a novel 6bp deletion at the end of exon 1, causing alternate *splicing* and a premature stop codon in preliminary analysis. Subdividing phenotypes and understanding common molecular pathways through new genetic data is in the future of dystonia research.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição corporal e prevalência.....	17
Tabela 2 - Características das distonias monogênicas.....	20 e 21
Tabela 3 – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento.....	30
Tabela 4 – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento.....	30
Tabela 5 – Características clínicas e genotípicas.....	35
Tabela 6 – Características dos casos com o SNP rs1801968.....	37
Tabela 7 – Idade de início.....	38
Tabela 8 – História familiar.....	38
Tabela 9 – Distribuição.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do gene TOR1A em ordem reversa com os SNPs encontrados.....	36
Figura 2 – Esquema do gene THAP1 em ordem direta com os SNPs encontrados.....	36
Figura 3 - Cromatograma (em heterozigose).....	39
Figura 4 – Cromatograma e alinhamento, após clonagem em plasmídeo.....	39
Figura 5 - Frequência alélica dos SNP 1801968, rs114150156 e rs2296793 de diferentes populações controle e dos sujeitos (gene <i>TOR1A</i>).....	43
Figura 6 - Frequência alélica dos demais SNPs encontrados em diferentes populações controle e dos sujeitos (gene <i>TOR1A</i>).....	34
Figura 7 - Domínios do gene <i>THAP1</i>	45
Figura 8 – Frequência alélica dos SNPs encontrados no gene <i>THAP1</i> nos sujeitos comparados a diferentes populações controle.....	47

LISTA DE ABREVIações

A: adenosina

AD: Autossômica dominante

ATP: adenosina trifosfato

AR: Autossômica recessiva

C: citosina

DNA: ácido desoxirribonucleico

D: aspartato

G: guanina

H: histidina

MAF: minor allele frequency

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensageiro

PCR: polimerase chain reaction

RNA: ácido ribonucleico

SNC: Sistema nervosa central

SNP: single nucleotide polymorphism

T: timina

THAP1: thanatos-associated protein domain, que contém a proteína associada a apoptose 1

TOR1A: torsin family 1, member A

UTR: untranslated region

X-R: herança ligada ao X

INTRODUÇÃO

As distonias são um distúrbio hipercinético caracterizado por contrações musculares sustentadas ou intermitentes que causam movimentos e/ou posturas anormais, frequentemente repetitivas. Movimentos distônicos são tipicamente estereotipados, torsionais e podem ser acompanhados de tremor. Distonia é habitualmente iniciada ou agravada por ações voluntárias e associada a “overflow” (ativação dos movimentos distônicos pela ação de partes remotas) (Albanese et al, 2013). Outros atributos típicos das distonias são “sensory tricks” ou “gestes antagonistes” (truque sensitivo tátil/proprioceptivo ou motor que reduz a distonia, p. ex. tocar o queixo para melhorar distonia cervical). Sua direção é constante, pois os grupos musculares envolvidos são sempre os mesmos em dado paciente (Geyer & Bressman, 2006). A classificação se baseia em 2 eixos: características clínicas e etiologia. A partir da avaliação clínica, as distonias são descritas de acordo com quatro características básicas: idade de início, distribuição corporal, padrão temporal e fatores associados. (Albanese et al, 2013).

I. Idade de início

- Primeira infância (do nascimento a 2 anos)
- Segunda infância (de 3 a 12 anos)
- Adolescência (13 a 20 anos)
- Adulto jovem (21 a 40 anos)
- Adulto tardio (maior de 41 anos)

II. Distribuição corporal

- Focal: região corporal única (ex: blefarospasmo)
- Segmentar: 2 ou mais regiões contíguas (ex: cervical e craniana).
- Multifocal: regiões não contíguas (ex: membro inferior e região craniana).

- Hemidistonia: presente somente em hemicorpo.
- Generalizada: tronco e pelo menos 2 outras regiões, diferencia-se formas com e sem envolvimento de membros inferiores.

III. Padrão temporal

- Curso da doença
 - Estática
 - Progressiva
- Variabilidade
 - Persistente
 - Ação específica
 - Diurna
 - Paroxística

IV. Fatores associados

- Distonia isolada ou combinada com outro distúrbio do movimento
- Ocorrência de outras manifestações neurológicas ou sistêmicas

O segundo eixo refere-se a etiologia e é uma área em constante expansão. Duas características complementares auxiliam nessa classificação: alterações anatômicas identificáveis e padrão de herança familiar.

I. Patologia do sistema nervoso

- Evidência de degeneração
- Evidência de lesão estrutural
- Sem evidência de degeneração ou lesão estrutural

II. Herdadas ou adquiridas

- Herdadas
 - Autossômica dominante
 - Autossômica recessiva
 - Recessiva ligada ao X
 - Mitocondrial
- Adquiridas
 - Lesão cerebral perinatal
 - Infecção
 - Droga
 - Tóxica
 - Vascular
 - Neoplásica
 - Trauma cerebral
 - Psicogênica
- Idiopática
 - Esporádica
 - Familiar

A prevalência estimada das distonias primárias foi avaliada em estudos com metodologias de identificação de casos muito diferentes (Defazio et al, 2004). Uma meta-análise recente agrupou os estudos com sujeitos oriundos de serviços de saúde de diferentes países e encontrou uma prevalência geral de 16,4/100.000 para as distonias primárias (Steeves et al, 2012). A tabela 1 mostra as frequências estimadas dos diferentes subtipos.

Tabela 1 – Distribuição corporal e prevalência

LOCALIZAÇÃO	PREVALÊNCIA (casos/100.000 indivíduos)
Cervical	4,98 (95%IC 3,58-6,94)
Blefaroespasma	4,24 (95% IC 2,92-6,18)
Distonia em membro	1,24 (95% IC 0,35-4,36)
Câimbra do escrивão	1,65 (95% IC 0,89-3,04)
Oromandibular	0,52 (95% IC 0,15-1,77)
Laríngea	1,54 (95% IC 0,65-3,61)
Generalizada	0,44 (95% IC 0,26-0,74)

IC = intervalo de confiança

Durante muitos anos, apenas um gene causador de distonia primária autossômica dominante era conhecido: o *TOR1A* (Torsin Family 1, member A), causador da DYT1. Em quase todos os casos há a deleção de um GAG no exon 5, removendo um resíduo de ácido glutâmico (Ozelius et al, 1997). Outras alterações patogênicas incluem uma mutação *missense* c.863G>A que causa a substituição de uma arginina altamente conservada por uma glutamina (p.Arg288Gln) (Zirn et al, 2008) e uma deleção de 18 pares de base no exon 5 (966_983del) (Leung et al, 2001). A distonia DYT1 costuma apresentar início precoce, em membros inferiores, tendência a generalizar e a poupar músculos crânio-cervicais (Valente & Albanese, 2010). A variação fenotípica é muito grande, com aproximadamente 30% de penetrância, podendo existir mesmo casos atípicos com início tardio e/ou focal, entretanto mesmo os portadores assintomáticos mostram metabolismo cerebral anormal e disfunção nos circuitos cerebelo-talamo-corticais (Tanabe et al, 2009). O gene *TOR1A* codifica a proteína torsinA, expressa em diversos tecidos, e localizada no retículo endoplasmático e no envelope nuclear. Ela é membro de uma superfamília de ATPases com diversas funções desde estabilização do citoesqueleto a degradação e tráfego de proteínas (Valente e Albanese 2010). Acredita-se que deleção patogênica do códon altera

a oligomerização e estrutura terciária da proteína. Em modelos celulares, as proteínas mutantes se acumulam no envelope nuclear, onde provocam alterações nos poros da membrana e inclusões, além de provável ancoragem deficiente do núcleo no citoesqueleto (Tanabe et al, 2009). Outra função das ATPases é o processamento proteico, entre eles o receptor D2 (Bragg et al, 2011).

Em 2009, outro gene foi identificado como o segundo gene causador de distonia primária autossômica dominante: o *THAP1* (thanatos-associated protein domain, que contém a proteína associada a apoptose 1), especula-se que algumas das mutações encontradas provoquem diminuição da função da proteína no núcleo, levando a desregulação da transcrição e gerando o quadro da distonia DYT6 (Tanabe et al, 2009). As mutações deletérias foram primeiro identificadas em quatro famílias Amish-Menonitas e uma alemã (Fuchs et al, 2008). Estudos subsequentes mostraram mutações no THAP1 em 36% das famílias DYT1-negativas, contudo esta alta taxa não foi confirmada por outros, que reportaram prevalência de 1-2,5% em coortes de distonias primárias. Novas mutações nesse gene foram descobertas rapidamente ao redor do mundo, mantendo o fenótipo típico de início precoce, com envolvimento crânio-cervical frequente e em particular com envolvimento da fala. Porém o fenótipo também é muito variável, com penetrância estimada em 40% (Klein et al, 2014). Mutações de *THAP1* foram encontradas em casos esporádicos de distonia segmentar de início tardio, sugerindo que o gene também tenha um papel importante na patogênese desse grupo de distonias. (Valente & Albanese, 2010). A proteína THAP1 contém 3 partes, o domínio THAP no N-terminal é um zinc-finger atípico, de ligação ao DNA. A porção média é uma região rica em prolina e a C-terminal contém um sinal de localização nuclear. Graças a sua interação com fatores de apoptose, acredita-se que a THAP1 seja um fator de transcrição supressor (Bragg et al, 2011).

Entre os estudos brasileiros destaca-se um *screening* em 21 pacientes com distonia primária dos genes *TOR1A* e *THAP1* com identificação de uma deleção GAG *de novo* no primeiro e uma nova mutação c.1a>G no segundo. Segundo os pesquisadores, esses genes são responsáveis por 10% das distonias primárias da sua coorte, em concordância com heterogeneidades genética mostrada em outras regiões (De Carvalho Aguiar et al, 2010). Recentemente o gene *THAP1* também foi alvo de um

estudo brasileiro com 74 sujeitos onde foram encontrados 3 pacientes com uma nova mutação *nosense* c.289 A>G. Um dos sujeitos acabou se caracterizando com o heterozigoto composto com a mutação *missense* c.506 A>G (Carvalho et al, 2014). Apesar da variabilidade fenotípica, os pacientes apresentavam distonia com início precoce em membros superiores e evolução para áreas contíguas.

Os *loci* relacionados as distonias descobertos nas ultimas 2 décadas são agrupados sob a denominação DYT seguido por um número em ordem crescente. Atingindo atualmente o DYT25, esse grupo heterogêneo agrupa formas isoladas, combinadas (plus), dominantes, recessivas e paroxísticas. A tabela 2 traz as características baseadas nessa classificação mais abrangente (Petrucchi e Valente, 2013), porém com detalhes baseados no GeneReviews (Klein et al, 2014), onde uma nova classificação é oferecida. Esta usa a nomenclatura DYT seguida de número apenas para *loci* e seguida de genes comprovadamente patogênicos para as doenças. Entretanto, é aceitável usar DYT tanto como nome de doença e/ou locus gênico.

Tabela 2 – Características das distonias monogênicas

Doença	Gene	Locus	Herança	Clínica	Observações
DISTONIA TORCIONAL PRIMARIA PURA					
DYT1	<i>TOR1A</i>	9q34	AD	Precoce, generalizada, início em membros	Confirmado
DYT2			AR	Precoce, generalizada, com craniocervical	Casos agrupados só por padrão de herança
DYT4	<i>TUBB4a</i>	19p13.12-13	AD	Disfonia sussurrante	Descoberto por 2 grupos na mesma família
DYT6	<i>THAP1</i>	8p11.21	AD	Generalizada com início cervical e mmss	Confirmado
DYT7		18p	AD	Cervical de início adulto	Nunca replicado desde descoberta em 1996
DYT13		1p36.32-p36.13	AD	Cervical e mmss	Nunca replicado desde descoberta em 2001
DYT17		20p11.2-q13.12	AR	Segmentar ou generalizada, disfonia marcante	Não replicado desde 2008
DYT21		2q14.3-q21.3	AD	Adulto, generalizada ou multifocal, início com blefaroespasma	Não confirmado
DYT23	<i>CIZ1</i>	9q34	AD	Cervical, adulto	Não confirmado
DYT24	<i>ANO3</i>	11p14.2	AD	Craniocervical, laríngea e mmss	Não confirmado
DYT25	<i>GNAL</i>	18p11	AD	Cervical, adulto	Confirmado

AD = autossômico dominante, AR = autossômico recessivo, X-R = ligada ao X

Tabela 2 - continuação

Doença	Gene	Locus	Herança	Clínica	Observações
DISTONIA PLUS					
DYT5a	<i>GCH1</i>	14q22.2	AD	Distonia dopa responsiva	Confirmado
DYT5b	<i>TH</i>	11p15.5	AR	Distonia dopa responsiva	Confirmado
DYT11	<i>SGCE</i>	7q21.3	AD	Distonia-mioclonia	Confirmado
DYT12	<i>ATP1A3</i>	19q13.2	AD	Distonia-parkinsonismo, agudo	Confirmado
DYT15		18p11	AD	Distonia-mioclonia	Nunca replicado desde descoberta em 2002
DYT16	<i>PRKRA</i>	2q31.2	AR	Distonia-parkinsonismo, precoce	Sem variantes patogênicas bialélicas desde descoberta em 2008
SINDROMES PAROXÍSTICAS					
DYT8	<i>PNKD</i>	2q35	AD	Discinesia paroxística não cinesiogênica	Confirmado
DYT9/ DYT18	<i>SLC2A1</i>	1p34.2	AD	Ataxia, espasticidade, induzida por exercício	Confirmado
DYT10	<i>PRRT2</i>	16p11.2	AD	Discinesia paroxística cinesiogênica	Confirmado
DYT19		16q13-q22.1	AD	Discinesia paroxística cinesiogênica 2	Locus e clínica próximos ao DYT10
DYT20		2q31	AD	Discinesia paroxística não cinesiogênica 2	Locus e clínica próximos ao DYT8
SINDROMES HEREDODEGENERATIVAS					
DYT3	<i>TAF1</i>	Xq13.1	X-R	Distonia-parkinsonismo	Patogenicidade não confirmada

AD = autossômico dominante, AR = autossômico recessivo, X-R = ligada ao X

A descoberta de genes relacionados a distonia permitiu aos pesquisadores aprofundarem o conhecimento em novos mecanismos celulares envolvidos no prejuízo das funções motoras, mas que podem gerar novas opções terapêuticas. Investigadores agora começam a formar pontes entre diferentes níveis da organização cerebral, associando as descobertas moleculares às disfunções de circuitos motores evidenciados em estudos de neuroimagem (Tanabe et al, 2009).

Quanto a epidemiologia das principais distonias focais primárias, o blefarospasmo, que manifesta-se com um fechamento forçado das pálpebras (Hallet et al, 2008), possui como principal fator de risco a idade avançada (O’Riordan et al, 2004). Estudos caso-controle evidenciam outros fatores de risco como doença ocular prévia, especificamente a blefarite e ceratoconjuntivite (Defazio et al, 1998). O blefarospasmo tem ainda uma maior chance de disseminar-se para outras áreas quando comparado a outras distonias focais (Weiss et al, 2006). Trinta e um por cento dos pacientes apresentam disseminação da distonia além da região craniana. Em estudos orientais, o blefaroespasmo ultrapassa a distonia cervical como a apresentação clínica mais prevalente (Steeves et al, 2012)

Em estudos europeus, a distonia cervical apresenta prevalência de 5.7-6.1:100.000, com razão entre os sexos de 1.4-1.9 mulheres para cada homem (Stacy, 2008). A forma rotacional, classicamente denominada torcicolo espasmódico, é o componente mais frequente nas diversas combinações encontradas na distonia cervical, seguido pelo laterocolo, retrocolo e anterocolo. Em estudos caso-controle, 12% dos pacientes com distonia cervical tinham história de trauma cervical ou de tronco (Defazio et al, 1998). Um estudo brasileiro (Camargo et al, 2014) analisou uma série de 88 pacientes com distonia cervical, incluído casos focais, segmentares e generalizados. Concordante com a literatura, casos focais e segmentares tiveram início mais tardio, e casos com história familiar positiva tiveram início mais precoce e, interessantemente, chance de progressão em todo o curso da doença, enquanto casos esporádicos tendem a progredir nos primeiros 10 anos.

A distonia focal de mão apresenta-se como uma contração excessiva dos músculos necessários para a execução do movimento, com ativação subsequente de músculos próximos, que

levam então as posturas anormais e aos movimentos torsionais (Torres-Russoto & Perlmutter, 2008). Em alguns casos, as manifestações podem se restringir somente a atividades específicas, precisas e repetitivas, como a câimbra do escrivão e a distonia do músico, cuja prevalência em músicos alemães chega a 0,5%. Aproximadamente 16% dos pacientes apresentam progressão para músculos proximais, contralaterais ou generalizam dentro de um período de 8 anos (Defazio et al, 2007). Distonias focais tarefa específicas colaboram com um cenário ideal para estudos com ressonância funcional. Anormalidades referentes a uma desinibição de circuitos motores foram encontradas bilateralmente em áreas corticais primárias e secundárias, bem como núcleos da base (Defazio et al, 2007).

As distonias laríngeas são outro grupo que pode se apresentar isoladamente ou em conjunto com outras localizações, especialmente distonia cervical e blefaroespasma. Sua presença ou ausência ajuda a caracterizar os quadros mais típicos de diversas distonia monogênicas, por exemplo a DYT1 raramente tem envolvimento laríngeo, enquanto isto é comum na DYT6 e um fator *sine qua non* na DYT4. Existem subtipos importantes para um diagnóstico correto: disfonia espasmódica em adução ou em abdução, estridor respiratório distônico, respiração incoordenada, tosse distônica (Payne et al, 2014). A prevalência em mulheres é mais alta, história familiar é positiva em 16% de pacientes e resposta a toxina botulínica costuma ser excelente.

Apesar do espectro clínico muito variável, mesmo entre pacientes com o mesmo genótipo, algumas características clínicas e evolutivas chave se agrupam e podem ser definidas como síndromes distônicas, comuns a diferentes populações. As duas principais são a distonia generalizada de início precoce, que geralmente acomete primeiramente membros e a distonia focal ou segmentar isolada do adulto, que normalmente se inicia e se mantém craniocervical sem progressão para generalização (Gasser et al, 2003; Albanese et al, 2013).

JUSTIFICATIVA

Os poucos estudos epidemiológicos ou genéticos realizados em nossa população apresentam um número pequeno de pacientes incluídos, e dessa forma não se conhece a frequência, etiologia, ou as alterações genéticas presentes no nosso meio. Dada suas características específicas, estudos genéticos realizados em outros países, não podem ser simplesmente transpostos para nossa população. Somente após uma caracterização inicial será possível avançarmos no diagnóstico molecular dos pacientes com distonia na população brasileira.

Tratar as distonias primárias sem acesso ao seu perfil genético é muito limitante para os pacientes, que não têm acesso a informação sobre evolução e hereditariedade de sua doença, ou seja, sem aconselhamento genético.

Para os médicos e pesquisadores envolvidos, a detecção de mutações e avaliação clínica completa são o ponto de partida para qualquer estudo na área. O presente estudo está na base de muitos outros projetos, pois contém avaliações sistemáticas associadas a uma triagem genética mais extensa, de qualidade, que incluiu a maior amostra nacional até o momento da revisão bibliográfica.

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Caracterizar do ponto de vista clínico e genético, através de avaliação sistemática, as distonias primárias em pacientes brasileiros.

Objetivos específicos:

1. Caracterização clínica de pacientes com distonias primárias em uma amostra da população brasileira.
2. Pesquisar a presença da mutação responsável pela DYT1 e DYT6 nos pacientes com distonias primárias seguidos em nosso ambulatório.

MATERIAIS E MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA E APROVAÇÕES

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (FCM) como adendo ao projeto de pesquisa parecer nº161/2010.

Os voluntários da pesquisa foram identificados pelo pesquisador e colaboradores no Ambulatório de Distúrbios do Movimento e Distonia do HC-UNICAMP. Após identificação, os pacientes eram encaminhados ao pesquisador durante o próprio ambulatório para receber esclarecimentos sobre a pesquisa e ser oferecida a participação. Na ocorrência de concordância, era apresentado o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE - anexo 1), para assinatura.

Não houve participação de grupos vulneráveis no estudo.

Os procedimentos envolvidos na pesquisa foram revisão da história e exame neurológico de acordo com o protocolo clínico (anexo2) e coleta de sangue periférico. Os pacientes foram claramente informados sobre riscos e desconfortos da pesquisa, bem como da possibilidade de saírem da mesma quando quiserem, sem prejuízos ou danos. Pacientes menores de idade puderam participar desde que o consentimento fosse obtido dos pais ou responsáveis na presença de uma testemunha. Quando necessário, os pacientes eram encaminhados para aconselhamento genético.

O risco consistia de possibilidade de pequeno hematoma nos locais de punção venosa.

O benefício consistia em ajudar a compreender melhor o perfil genético e apresentação clínica das distonias em nosso país. No caso de mutação positiva os participantes se beneficiariam em conhecer seu diagnóstico específico com aconselhamento genético apropriado.

O termo de consentimento livre e esclarecido inclui critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato.

Este é um estudo transversal, realizado no Laboratório de Genética Molecular da FCM e no Hospital das Clínicas da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

SUJEITOS

Os indivíduos foram recrutados, consecutivamente, no Ambulatório de Distúrbios do Movimento e no Ambulatório de Distonias do Hospital das Clínicas da UNICAMP, que atende, de forma geral, o interior do estado de São Paulo. A participação foi voluntária e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) antes da realização de qualquer aspecto relacionado a pesquisa.

Crítérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de distonia primária, com exame neurológico normal, exceto presença de distonia e tremor, ressonância magnética sem alterações significativas e capacidade de consentimento para participação no estudo. Indivíduos menores de idade foram incluídos desde que pais e/ou responsáveis legais assinassem termo de consentimento na presença de uma testemunha.

Crítérios de exclusão

- História de alcoolismo importante, doença cerebrovascular prévia ou doença neurológica ou neurodegenerativa associada.
- Presença de alterações estruturais na ressonância magnética.
- Uso de medicações que sabidamente poderiam levar a distonia, em especial antipsicóticos típicos e atípicos.
- Co-existência de outra doença afetando o SNC;
- Não consentimento para participação no estudo.

PROCEDIMENTOS

Avaliação clínica

A primeira fase de participação foi a caracterização clínica destes pacientes. Todos os pacientes foram avaliados através de um questionário padronizado (Anexo 2), no qual constam informações sobre sexo, idade, idade de início dos sintomas, evolução dos sintomas, fatores associados a distonia, história de tratamento e tratamento atual, uso de toxina botulínica, história familiar com heredograma, história profissional, exposição ambiental, antecedentes pessoais (tabagismo, ingestão de café e refrigerante), história de exposição a drogas, comorbidades clínicas e medicações em uso. O consumo de cafeína diário foi calculado a partir da média encontrada em cafés e refrigerantes ingeridos pelos pacientes (Camargo e Toledo, 1998; Domenico, 2010). As informações foram adquiridas através de entrevista com o sujeito, seus familiares e consulta ao prontuário.

Em todos os pacientes realizou-se um exame neurológico detalhado, visando a classificação da distonia segundo os critérios de localização e idade de início. Quando possível neste momento, a classificação etiológica foi estabelecida, ou após análise de imagem e exames complementares pertinentes. A avaliação clínica foi complementada com a aplicação da escala TWSTRS em pacientes com distonia cervical (*Toronto Western Torticollis Rating Scale*) e *Marsden-Fahn Scale* para todos os participantes.

Pesquisa das Mutações

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir das amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes, utilizando o protocolo de extração com fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA está armazenado no Laboratório de Genética Molecular em um biofreezer -80.

Desenho de *primers*

Para a amplificação e sequenciamento dos exons de interesse dos genes estudados, utilizamos *primers* que flanqueiam as regiões codificantes e as transições intron-exon dos seguintes genes: *TOR1A* exons 1, 2, 3+4 e 5 e gene *THAP1* exons 1, 2, 3, 3A, 3B e 3C. Todos os exons dos dois genes em questão possuem *primers* já descritos na literatura (Calakos, 2010). Apenas *primers* para o exon1 do gene *TOR1A* foram redesenhados para obter produtos de amplificação por PCR com qualidade satisfatória para sequenciamento. Esse par de *primers* foi desenhado com o programa *Gene Runner*[®], respeitando determinadas regras como: tamanho entre 14 e 30 nucleotídeos; ausência de complementariedade entre os *primers*, pois a dimerização influi na eficiência de anelamento do *primer* com o DNA molde; mesma porcentagem de conteúdo de bases G e C nos dois *primers*; e tamanho do fragmento a ser amplificado de até 700 pares de bases.

Amplificação por PCR

As reações de PCR são realizadas para um volume final de 25µl, contendo 10 pmoles de cada *primer* específico, 2,5 nmoles de cada nucleotídeo (dGTP, dCTP, dTTP e dATP), 1,0U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 50 nmoles de MgCl₂, 75 nmoles de tampão e 50ng de DNA. Os produtos de amplificação são então visualizados em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen). As condições para a realização do PCR são: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de *primers* e 1 minuto a 72°C; e, depois dos ciclos, extensão final a 72°C por 10 minutos. Para determinar a temperatura de anelamento ideal de cada par de *primer*, foram realizados PCRs em gradientes de temperatura. A sequência dos *primers* e as temperaturas de anelamento podem ser visualizadas na tabela 3 para o gene *TOR1A* e na tabela 4 para o gene *THAP1*.

Tabela 3 – Sequência nucleotídica dos *primers* e temperatura de anelamento

TOR1A	Forward	Reverse	Temp (°C)
Exon 1	GGAAGCGTGGGTCTGGC	CGATGGCACTAGGGCTGAA	58.5
Exon 2	TTTCTTATGGGCTGTAAATGTGG	GGGTTTGGGGTCTCTTTGTT	60
Exon 3+4	AGAAGGAGCTGATTGATGGC	CCTAATCCTGCACCCTAAGTGT	60
Exon 5	GTCTATAGGGCAGGTGGGTG	CAGTCCTTCCACACTTCCAC	61

As sequências destacadas em rosa representam as regiões codificantes

Tabela 4 – Sequência nucleotídica dos *primers* e temperatura de anelamento

THAP1	Forward	Reverse	Temp (°C)
Exon 1	AAACACCTGGCCTCAGCCAATA	TTTCTCGCGCTCCTGGAACA	62.2
Exon 2	TCCTAAGCTGGAAAGTTGGGTGC	TGCCTGGAACCTGTAGTT	61
Exon 3	GCCTGGTCAGTCCACAGATTCTT	TATCCTCCTCTAGCCTGTAAAGGAGT	60
Exon 3a	AGGCAAGAACGGCAGCTTGAAA	ACCCTAGCTGAAGGACATCC	59
Exon 3b	AGTATGGGTCAGATCATGGGACA	TGACTGAGTTGGGACAAGGCT	62
Exon 3c	ACTGGGACCTGATCTATGATACGCT	GCCAGTGGATAGCACTG	61.2

As sequências destacadas em rosa representam as regiões codificantes

Detecção de mutações: Sequenciamento dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação foram purificados com a utilização do *kit* Exosap (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, sequenciados em ambos os sentidos (senso e antisenso) em um sequenciador automático ABI 3130 xl (Applied Biosystems). A reação submetida ao sequenciamento consiste de solução *pré-mix* (quantidade recomendada pelo fabricante – Applied Biosystems), cinco pmoles de *primer* e 200ng do produto de amplificação. As condições para a realização do sequenciamento são: 35 ciclos de 95°C por 20s, 50°C por 15s, 60°C por 1 min. A purificação da reação de sequenciamento foi realizada com etanol e acetato de amônio

7,5mM, como sugerido pelo fabricante. A análise dos cromatogramas foi realizada no programa Chromas Lite (Technelysium). O alinhamento das sequencias foi realizada com o programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Clonagem em vetor bacteriano

Quando foram identificados cromatogramas sugerindo deleções ou inserções em heterozigose (alteração do quadro de leitura do sequenciamento), os fragmentos amplificados por PCR foram clonados em um vetor para que o sequenciamento dos alelos fosse realizado separadamente. Esta estratégia tornou possível a identificação precisa das alterações nas sequencias de DNA com suspeita de conter pequenas inserções ou deleções.

A clonagem foi realizada obedecendo ao seguinte protocolo:

1) Ligação dos fragmentos de DNA

Para a ligação dos fragmentos em pGEM-T Easy preparou-se uma solução composta de cerca de 100ng do vetor, o inserto a ser ligado (3x a quantidade do vetor), 5µL do tampão 2X da ligase (Promega) e 1µL da T4 DNA ligase (Promega, 3U/µL). Esta solução foi mantida a 16 °C por 12-16 horas e em seguida foi estocada a -20°C .

2) Transformação bacteriana

Células competentes da linhagem Escherichia coli DH5α que estavam armazenadas a -80 °C foram transferidas para gelo. Adicionou-se a essas cerca de 10µL da reação de ligação. A reação permaneceu em gelo por 30 minutos, em seguida foi transferida para temperatura de 42 °C pelo período de um minuto e 30 segundos e novamente transferida para o gelo por um minuto. Em seguida adicionou-se de 400 a 800µL de meio LB às células e a cultura foi submetida à agitação de 200rpm a 37 °C por uma hora. Cerca de 200µL da cultura foram plaqueadas em placas de Petri com LB-ágar contendo o antibiótico apropriado (ampicilina 50ug/ml). As placas foram incubadas a 37 °C pelo período de 12-18 horas.

3) Foi utilizada a mini-preparação caseira, que consiste na adição de 300µl de solução I (Tris-HCl 50mM, pH 8.0; EDTA 10mM, pH 8.0 e 6µl de RNase 1mg/mL), seguido da adição de 300µl de solução II (NaOH 200mM, SDS 1%), agitação por inversão suave do tubo cinco vezes, incubação a temperatura ambiente por cinco minutos, seguida de adição de 300µl de solução III (acetato de potássio 3M, pH 5.5), agitação por inversão, centrifugação a temperatura de 14°C (14000rpm) durante 10 minutos e transferência de 700-800µl do sobrenadante para novo tubo. A etapa de precipitação teve início com a adição de 400µl de isopropanol seguida de inversão e centrifugação a 14000rpm por 10 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante, nova precipitação com 500µl de álcool etílico 70%, inversão do tubo e centrifugação durante cinco minutos a 14000rpm e descarte do sobrenadante. A eluição foi realizada com 30µl de água deionizada.

Análise dos Dados

1- *Software* para busca in silico de regiões de microRNA

O *software* DNA Intelligent Analysis – *microT v3.0* (diana.cslab.ece.ntua.gr) foi utilizado para busca in silico de regiões de ancoragem para microRNA. Essa busca foi realizada para mutações novas presentes em regiões 5' UTR (untranslated region), para possíveis identificações de alterações em regiões alvo de microRNA.

2- *Software* para busca in silico de regiões de *splicing* alternativo

O *software* NNSplice (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) foi utilizado para verificar se alterações não descritas nos bancos de dados, ou com frequência baixa na população, poderiam alterar ou criar regiões de *splicing* alternativo.

3- *Software* para busca in silico de codons de parada prematuros

O *software* Expasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) foi utilizado para verificar se alterações que alteram a matriz de leitura, resultam na inserção de um códon de parada prematuro.

4- Triagem das alterações com potencial patogênico em grupo controle

As alterações identificadas foram investigadas em indivíduos controles. O grupo controle foi submetido ao sequenciamento por eletroforese capilar em um ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Foram testados 154 indivíduos para o gene *TOR1A* e 164 para o gene *THAP1* como controles para cada alteração potencialmente patogênica identificada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o programa STATA 13.1 para análise dos dados. Dados demográficos estão descritos de acordo com listagem de frequência de todas variáveis e exame de sua distribuição, assim como de suas medidas de tendência central (média e de dispersão (desvio-padrão).

Comparação entre grupos de acordo com os resultados genéticos foi realizada por t-test para variáveis contínuas ou Pearson chi-square (ou Teste de Fisher quando necessário) para variáveis categóricas. Nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

As análises estatísticas para os testes genéticos foram descritas acima.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Dentre os 78 pacientes avaliados clinicamente (30 homens e 48 mulheres), observamos que casos com apresentação mais jovens tendem a evoluir para generalização. Isso é demonstrado pela correlação significativa entre idade de início menor ou igual a 20 anos e presença de progressão nos segmentos afetados ($p=0,002$) e de generalização na distribuição final ($p<0,001$). Não houve diferença estatística em relação a progressão ou idade de início da distonia e presença de história familiar quando dividida entre negativa, positiva (presença de distonia) e possível (outro distúrbio do movimento).

A análise estatística dos dados quanto a distribuição e idade de início mostrou o aparecimento de blefaroespasma em idade mais avançada e início em membros em mais jovens (respectivamente $57,4 \pm 10,9$; $28,4 \pm 22$; $p<0,001$). Não houve diferença de apresentação inicial entre os sexos, apesar de estudos anteriores reportando maior prevalência de distonia cervical em mulheres (O’Riordan et al, 2004). A tabela 5 divide os sujeitos hierarquicamente baseado em idade de início, distribuição corporal, antecedente familiar e gênero, com o total de pacientes a cada subdivisão. A coluna final mostra quantos pacientes de cada subgrupo tiveram resultados positivo para pesquisa de mutações potencialmente patogênicas.

Tabela 5 – Características clínicas e genótípicas

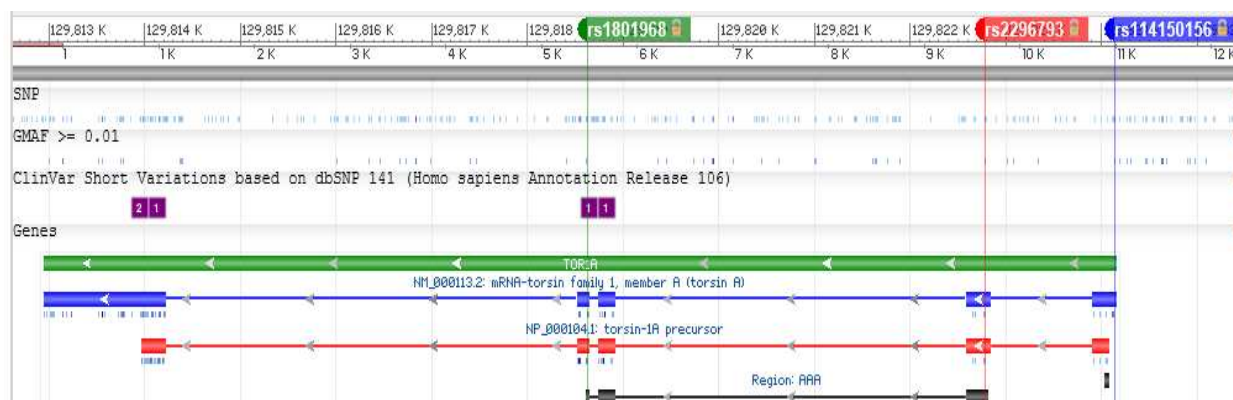
Idade de início	Distribuição	História familiar	Sexo	Genótipo
<20a = 21	Multifocal = 1	Neg = 1	Fem = 1	-
	Generalizada = 10	Neg = 5	Masc = 4	rs1801968 = 1
			Fem = 1	-
		Pos = 5	Masc = 3	-
			Fem = 2	rs1801968 = 1
>20a = 67	Focal = 31	Desc = 3	Fem = 3	-
		Neg = 21	Masc = 11	rs1801968 = 2
			Fem = 10	rs1801968 = 2
		Pos = 7	Masc = 1	rs1801968 = 1
			Fem = 6	rs1801968 = 1
	Segmentar = 32	Neg = 23	Masc = 7	rs1801968 = 3
			Fem = 16	rs1801968 = 1
		Pos = 9	Masc = 1	rs1801968 = 1
			Fem = 8	rs1801968 = 1
	Generalizada = 4	Neg = 3	Masc = 2	-
			Fem = 1	-
		Pos = 1	Masc = 1	g.5308_5317del 1

a: anos, Neg: história familiar negativa, Pos: história familiar positiva ou possível, Desc: desconhecida, Masc: masculino, Fem: feminino

Testes moleculares

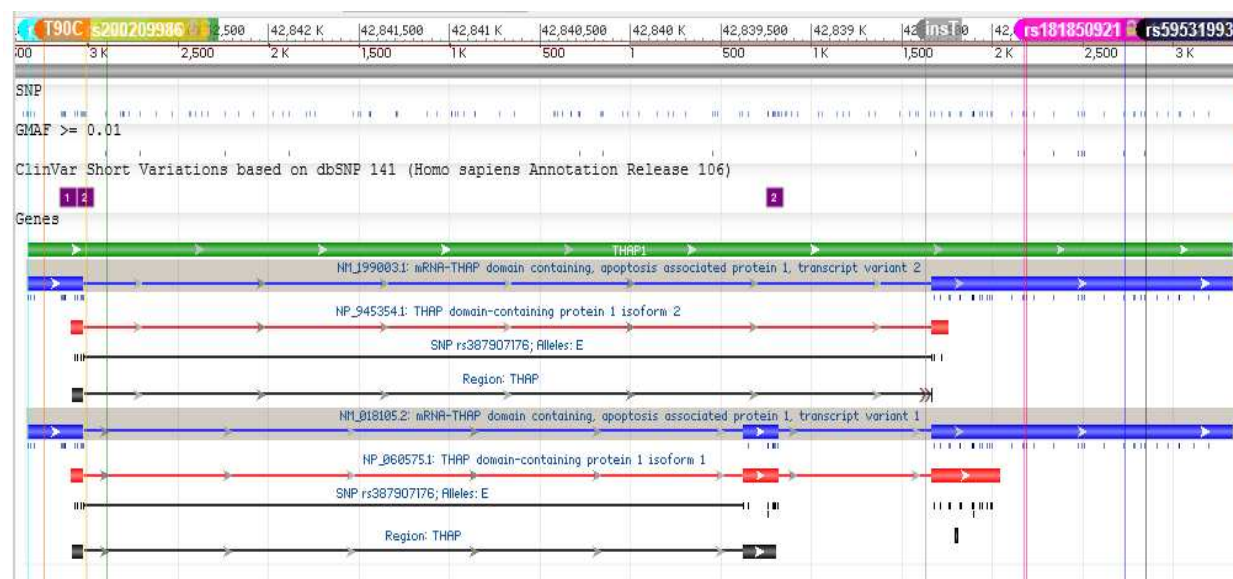
O sequenciamento da região codificante dos dois genes foi realizado em 68 pacientes. A pesquisa de mutações indicou 12 alterações de nucleotídeos de base única, do inglês *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). As figuras abaixo mostram um desenho esquemático dos exons e introns dos genes estudado, além de isoformas, precursores, mRNA e locais de alterações com significado patogênico. O gene *TOR1A*, com 5 exons, apresentou três SNPs (figura 1) e o gene *THAP1*, com 3 exons, apresentou 9 SNPs (figura 2) que estão marcados nas suas respectivas localizações.

Figura 1 – Esquema do gene TOR1A em ordem reversa com os SNPs encontrados



GMAF: global minor allele frequency, ClinVar short variations: mutações com impacto clínico, em azul: RNAm, em vermelho: precursor proteico, em preto: região AAA

Figura 2 – Esquema do gene THAP1 em ordem direta com os SNPs encontrados



rs184497763 T90C rs200209986 rs71521601 TMP_ESP_8_42693514_42693513ins rs181850921 rs191034081 rs11557527 rs59531993

GMAF: global minor allele frequency, ClinVar short variations: mutações com impacto clínico, em azul: RNAm, em vermelho: precursor proteico, em preto: região THAP (para 2 isoformas)

Do total, 10 eram do tipo mutações silenciosas, nas quais não há alteração do aminoácido na respectiva posição (ou em região intrônica), 1 do tipo *missense* no gene *TOR1A* (rs1801968 C>G, D216H, em 14 indivíduos) e 1 em região 5'UTR no gene *THAP1* (T90C). Todas as mutações silenciosas estavam já presentes em bancos de dados de SNPs (ensemble genome browser, exome

server) descritos na população normal e, portanto, não foram subsequentemente avaliados, pois podem ser considerados polimorfismos gerais presentes na população.

A mutação em 5'UTR foi testada em algoritmos de predição de sítio de ligação de miRNA e não foi encontrado significado patológico (site).

A mutação *missense* encontrada (rs1801968 C>G / D216H) estava presente em bancos de dados de SNPs (ensemble genome browser) e tem significado patológico duvidoso. Foi encontrada em 14 pacientes, todos negativos para a 904_906delGAG da DYT1, cujas características clínicas estão resumidas na tabela 6.

Tabela 6 – Características dos casos com o SNP rs1801968

Nº	IDADE DE INÍCIO	HISTÓRIA FAMILIAR	DISTRIBUIÇÃO	LOCALIZAÇÃO INICIAL
7	7	Negativa	Generalizada	mmii e oromandibular
8	9	Positiva-irmã materna semelhante	Generalizada	Mmii
13	24	Positiva-tia e tia-avó maternas	Focal	cervical
18	29	Negativa	Focal	pálpebra
21	33	Possível-avó paterna com parkinson,	Focal	Msd
29	40	Negativa	Segmentar	pálpebra
39	45	Negativa	Segmentar	cervical
42	48	Possível-filho com tiques	Segmentar	pálpebra
44	49	Negativa	Segmentar	pálpebra
46	50	Negativa	Focal	cervical
60	59	Negativa	Focal	cervical
62	60	Negativa	Focal	cervical
72	67	Negativa	Segmentar	Vocal
74	68	Positiva-irmã	Segmentar	pálpebra

mmii: membros inferiores, msd: membro superior direito

As observações dignas de nota são que entre os pacientes com história familiar positiva, a paciente 14 tem irmã com quadro semelhante e status negativo para essa alteração e os 2 pacientes com distribuição generalizada tiveram início em membros inferiores, sendo que a paciente 8 tem o que

chamamos de fenótipo clássico da DYT1. Após análise estatística não houve diferença significativa quanto a sexo, história familiar (Fisher t test=0,628), idade de início (p=0,7992), localização, distribuição (Fisher's exact p=1) e progressão, conforme as tabelas 7 a 9 a seguir:

Tabela 7 – Idade de início

rs1801968	Media da idade	Erro padrão	Desvio padrão	95%IC
Negativo	43,52	2,74	19,73	38,03 - 49,01
Positivo	42	5,22	19,54	30,72 - 53,28
Combinado	43,2	2,41	19,55	38,39 – 48,0

t=0,2577, p = 0,7992, IC = intervalo de confiança

Tabela 8 – História familiar

rs1801968	negativa	possível	positiva	Total	Fisher t test = 0,628
Negativo	39	7	6	52	
Positivo	9	2	3	14	
Total	48	9	9	66	

Tabela 9 – Distribuição

rs1801968	focal	segmentar	multifocal	generalizada	Total	Chi2=0,53 Fisher's exact p=1
Negativo	19	22	1	10	52	
Positivo	6	6	0	2	14	
Total	25	28	1	12	66	

No entanto, uma nova deleção no fim do exon 1 do gene *THAP1* (figura 3 e 4) foi analisada em algoritmos de predição de sítio de *splicing*, o resultado é que em todas as isoformas forma-se um mRNA aberrante (www.fruitfly.org) decorrente da perda do sítio de *splicing* com formação de um stop códon precoce. O DNA foi submetido a clonagem em plasmídeo e PCR, sendo encontrada uma deleção de 10 pares de base g.5308_5317del (ng_011837.1)

Figura 3 – Cromatograma (em heterozigose)

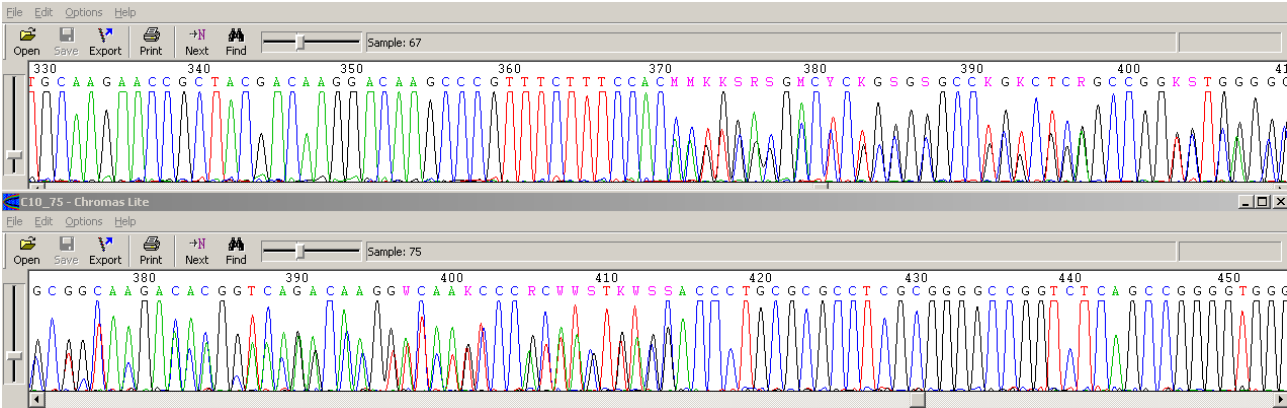
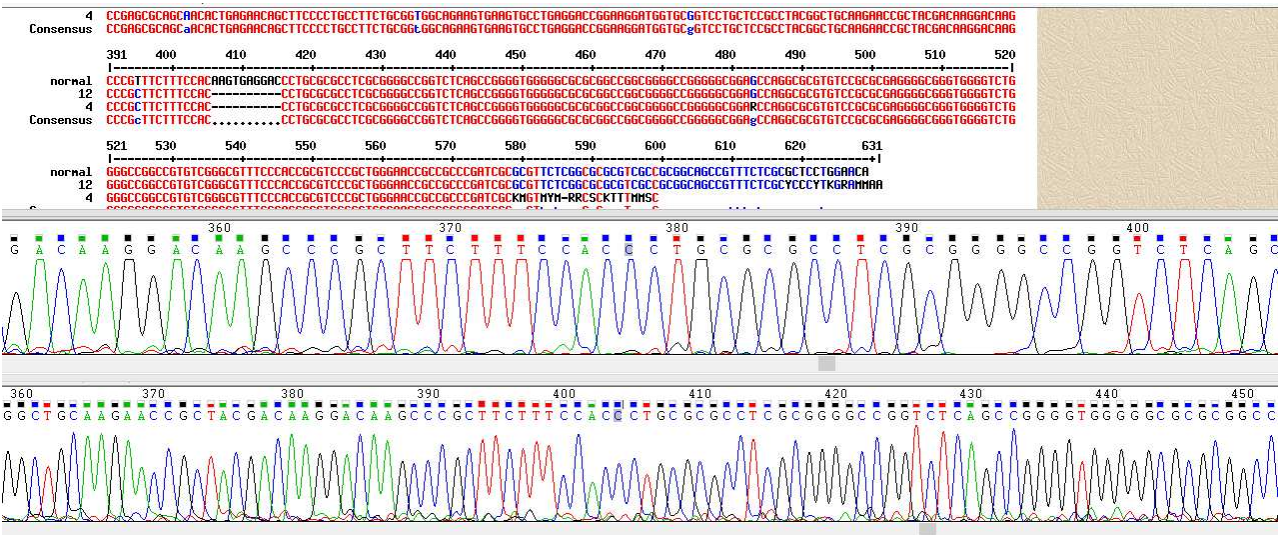


Figura 4 – Cromatograma e alinhamento, após clonagem em plasmídeo



A mutação g.5308_5317del é inédita. O indivíduo 15, representado anteriormente na tabela 3, é um homem caucasiano com ascendência italiana e indígena, com 46 anos de idade na época da avaliação. A distonia começou aos 25 anos em região cervical e membro superior direito, progredindo em 3 anos para membro inferior esquerdo. Subjetivamente houve progressão recente da intensidade de sintomas em membros inferiores. Digno de nota é o desenvolvimento de catarata diagnosticada aos 45 anos e antecedente de fratura de mandíbula aos 15 anos. Na irmandade há uma irmã com epilepsia e outra mais nova não avaliada diretamente com descrição de distonia cervical de início aos

sete anos de idade. O exame físico é caracterizado por laterocolo com membro superior direito em postura de flexão e membro inferior esquerdo em extensão com inversão de pé, porém com marcha preservada. Há também uma lentificação discreta de sacadas e reflexos osteotendíneos vivos. O tratamento sintomático com levodopa, biperideno, diazepam, clonazepam, olanzapina, carbamazepina e amitriptilina tentado ao longo dos anos não ofereceu alívio e atualmente há uma resposta satisfatória com aplicação de toxina botulínica especialmente em membro inferior esquerdo e pescoço.

O grupo controle do gene *TOR1A* encontrou, entre 154 indivíduos normais, a presença em 26 do SNP rs1801968 C>G / D216H. Ao verificar a presença de SNPs nos controles (com 164 indivíduos normais da população) do gene *THAP1A*, encontramos em um indivíduo a mesma mutação 5'UTR e em nenhum deles a nova deleção.

Vale ressaltar que a deleção típica encontrada em pacientes com DYT1 não foi encontrada nesse estudo.

Consideramos importante do ponto de vista epidemiológico comentar a respeito de dois pacientes que foram excluídos posteriormente do grupo analisado. O primeiro paciente AN, masculino de 23 anos, com distonia de abertura mandibular e disartria desde os 16 anos de idade, no exame físico também foi evidenciado inversão do pé direito durante a marcha e nistagmo horizontal. A história familiar incluía relatos de dificuldade de fala e indivíduos acamados com perda de auto cuidado. Em segundo, JBL, masculino de 51 anos com início de vertigem, dispneia, fraqueza geral e dificuldade de manter os olhos abertos após acidente automobilístico há 10 anos. No exame físico os principais achados eram um blefaroespasma, incoordenação da respiração com contrações involuntárias diafragmáticas e dedos em martelo. Os antecedentes familiares eram fracos, apenas após insistência na anamnese houve confirmação de uma tia com vertigem. Ambos os pacientes posteriormente apresentaram ataxia de marcha e foram testados para ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), com resultado positivo. Porém, é importante ressaltar que distonia generalizada isolada foi a apresentação inicial.

DISCUSSÃO

Nossos resultados epidemiológicos são compatíveis com o encontrado em vários estudos ao redor do mundo: início precoce, história familiar positiva e distribuição generalizada se agrupam nos fenótipos (Ozelius e Bressman, 2011). Porém as distonias cervicais e de início tardio formam o grupo mais prevalente (Camargo et al, 2014). O sequenciamento das regiões codificantes dos genes *TOR1A* e *THAP1* revelaram SNPs já presentes em outras populações, em frequências discutidas adiante, e uma nova deleção patogênica na DYT6.

É importante notar que há uma falta de estudos epidemiológicos sobre distonia, não apenas no Brasil, mas em outros centros. A principal dificuldade está na divergência entre o desenho dos estudos, na definição de distonia e viés de seleção (Defazio et al, 2004; Steeves et al, 2012). Em um país de grandes dimensões como o nosso, onde familiares estão distantes de centro de atendimento especializado, esse problema é ainda mais importante. Redes de atenção a essas famílias seria a melhor forma de consolidar o tratamento e pesquisa na área.

Outro ponto frágil é a obtenção de uma história familiar correta. Dada a variação da gravidade, apresentação e idade em diferentes membros, a avaliação de antecedente familiar positiva ou negativa deve ser feita preferencialmente com exame direto dos parentes sob risco (Elia et al, 2010). Em nossa coorte tentamos minimizar essa diferença entrevistando e examinando familiares que viessem espontaneamente como acompanhantes nas consultas e pedindo que fossem checadas informações duvidosas.

A heterogeneidade clínica se aprofunda ao avaliarmos outras questões secundárias, relacionadas a fatores de risco ambientais, resposta ao tratamento medicamentoso ou com toxina botulínica e evolução. Por ser uma amostra heterogênea e não muito extensa, não encontramos fatores de risco significativos, mas é possível encontrar relatos de traumatismo crânio-encefálico, traumas periféricos na região acometida, lesões da porção anterior do globo ocular e relatos de

sobrecarga emocional intensa próximo ao início do quadro, como relatado por outros grupos (Defazio et al, 2011; Altenmuller e Jabusch, 2009; Martino et al, 2007).

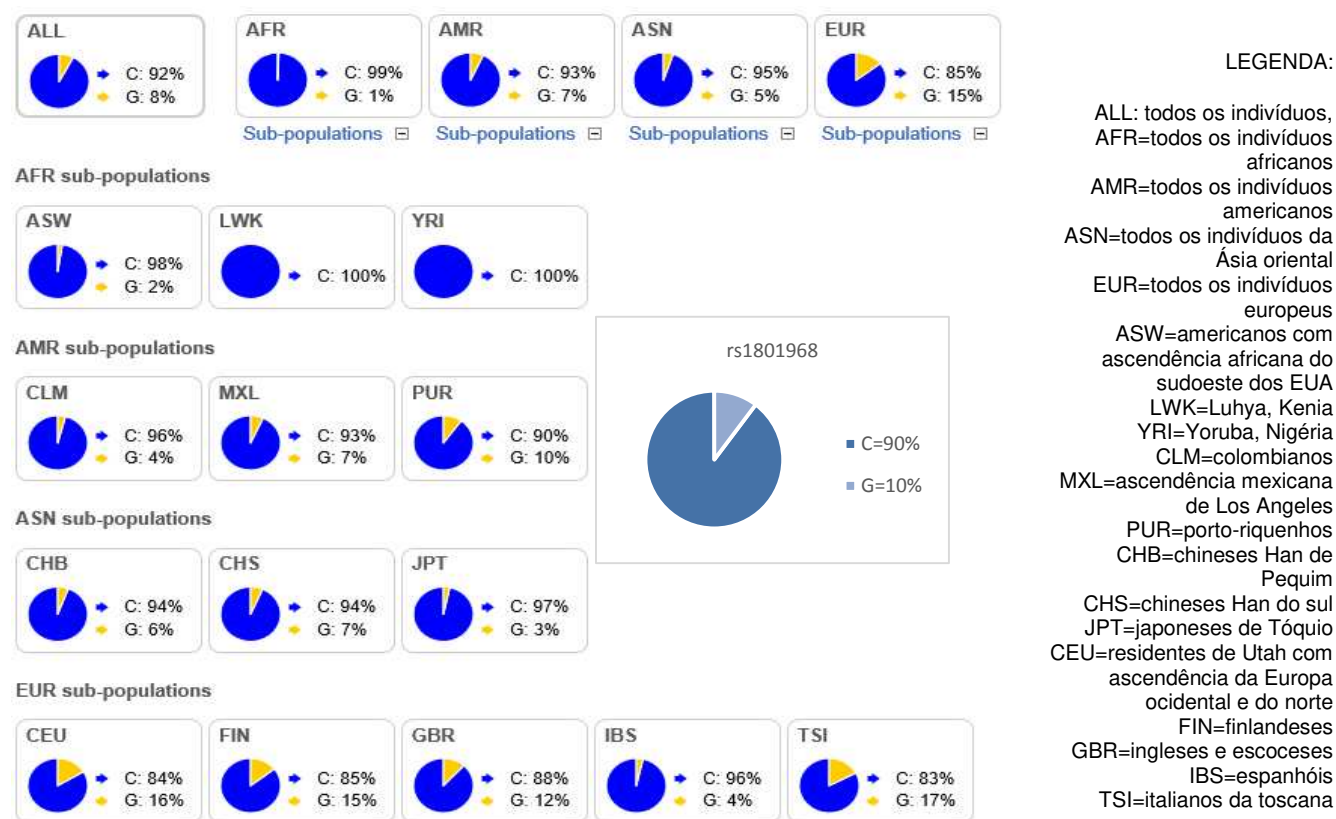
A busca de gatilhos ambientais e moduladores de expressão fenotípica são um ponto de convergência de diferentes linhas de pesquisa, onde se procura o que há em comum entre diferentes apresentações das distonias. Esse substrato é caracterizado por inibição deficiente do SNC e as anormalidades do processamento sensoriomotor, levando em conjunto a plasticidade anormal (Tanabe et al, 2009). Também podemos chamar esse conjunto de características presentes em diferentes apresentações clínicas e mesmo em portadores assintomáticos de endofenótipos. Os dados vem principalmente de estudos de imagem, mas a caracterização genética e bioquímica, especialmente agora com a descoberta de genes relacionados a transmissão de distonias de início adulto (DYT7, DYT23, DYT25), é essencial na separação do que é substrato do cérebro distônico e os gatilhos que levam ao aparecimento da doença.

Quanto aos resultados dos testes moleculares, temos achados relevantes em relação a duas mutações.

No gene *TOR1A*, a deleção típica encontrada em pacientes com DYT1 não foi encontrada nesse estudo. Por sua vez, o SNP rs1801968 foi alvo de diferentes estudos com resultados conflitantes. Parece conferir proteção quando encontrado em *trans* com a delGAG em portadores assintomáticos (Risch et al, 2007, Kamm et al, 2008) e como fator de risco para distonia focal de início adulto quando encontrado isoladamente em uma população do norte da Alemanha (Bruggemann et al, 2009), o que não foi confirmado em uma coorte holandesa (Groen et al, 2013). Estudos *in vitro* mostram que a variante H216 induz a formação de inclusões semelhantes as encontradas com células que expressam a torsinA deltaE (sem o resíduo de ácido glutâmico), enquanto que num ambiente com a torsinA mutante, a formação de inclusões é inibida (Bruggemann et al, 2009). Nossos pacientes positivos para esse SNP têm apresentações clínicas variadas, incluindo tanto quadros generalizados precoces como tardios focais. O fato de encontrar uma irmã com fenótipo semelhante e genótipo discordante levanta outras questões sobre o papel dessa variante como fator de risco e não como

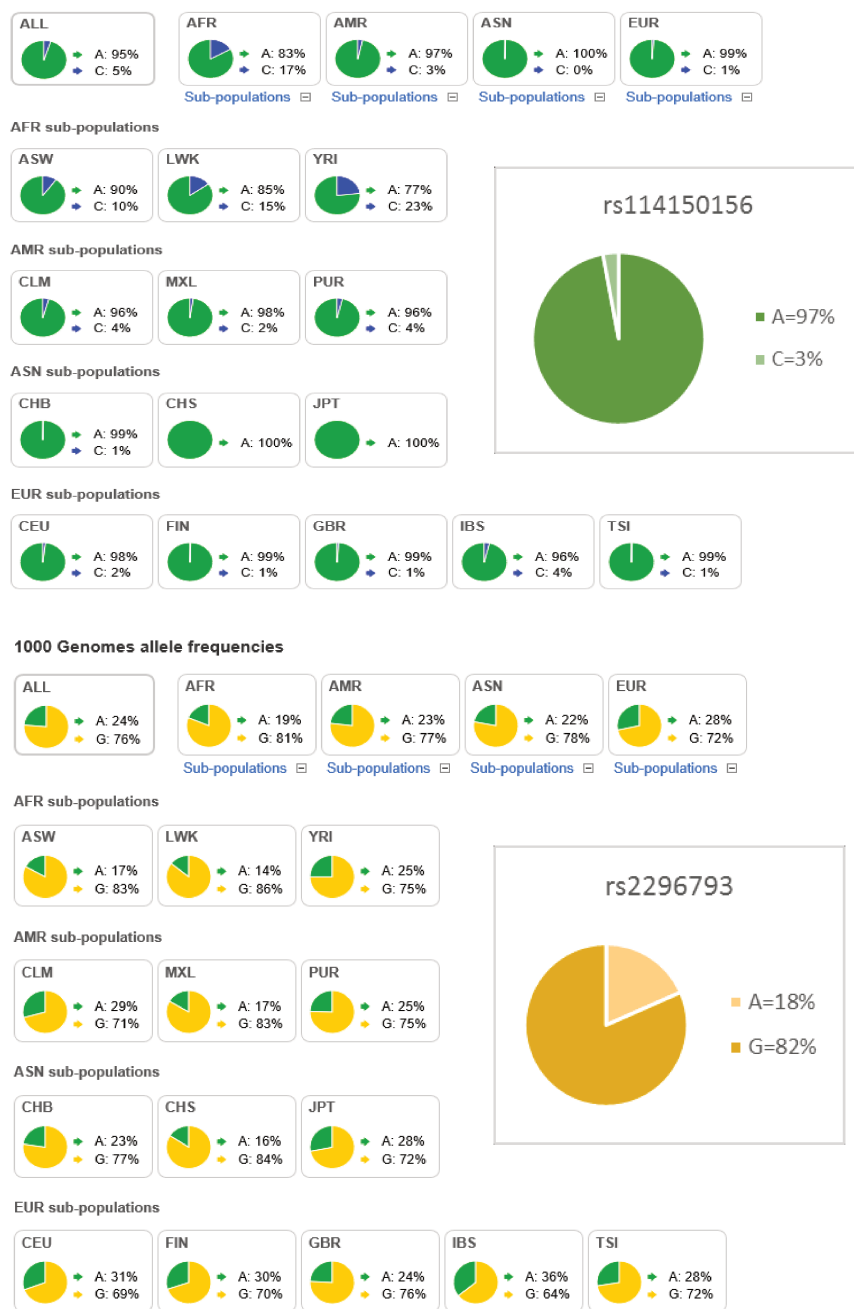
herança monogênica. As diretrizes atuais não recomendam o teste de DYT1 para pacientes sem história familiar de início precoce ou início precoce no próprio probando (Albanese et al, 2011), porém a presença de alterações modificadores de penetrância e risco é importante no ambiente acadêmico. A figura 5 mostra a frequência alélica em diferentes populações controle em comparação com a nossa coorte (*The 100 Genomes Project Consortium*). Como o MAF (*minor allele frequency*), que expressa o segundo alelo mais frequente, varia de 0 a 17% a possibilidade da diferença entre os estudos ser oriunda justamente de origem étnica diversa deve ser sempre levada em consideração.

Figura 5 - Frequência alélica dos SNP 1801968, rs114150156 e rs2296793 de diferentes populações controle e dos sujeitos (gene *TOR1A*)



Os outros 2 SNPs encontrados na investigação genotípica da DYT1 apresentaram as seguintes frequências comparativas, ilustradas na figura 6.

Figura 6 – Frequência alélica dos demais SNPs encontrados em diferentes populações controle e dos sujeitos (gene *TOR1A*)

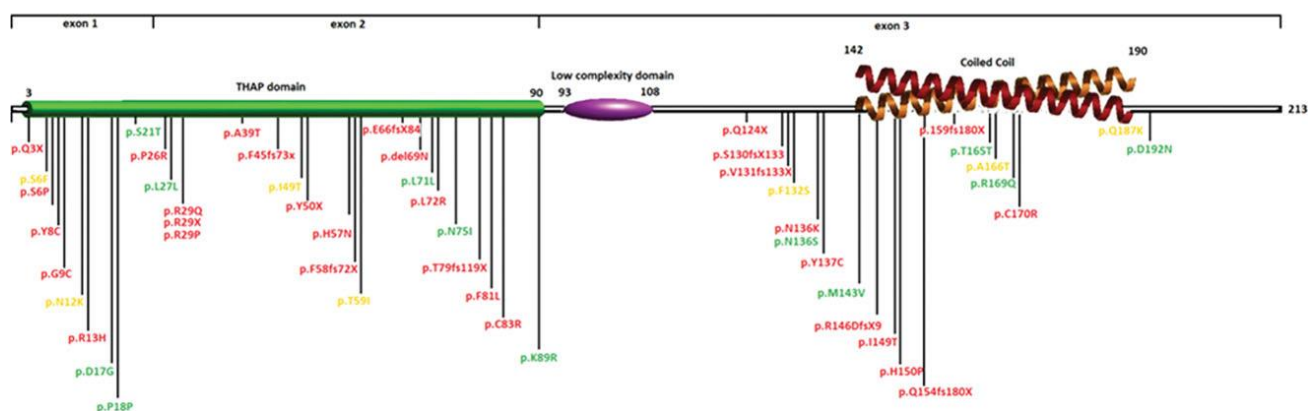


ALL: todos os indivíduos, AFR=todos os indivíduos africanos, AMR=todos os indivíduos americanos, ASN=todos os indivíduos da Ásia oriental, EUR=todos os indivíduos europeus, ASW=americanos com ascendência africana do sudoeste dos EUA, LWK=Luhya, Kenia, YRI=Yoruba, Nigéria, CLM=colombianos, MXL=ascendência mexicana de Los Angeles, PUR=porto-riquenhos, CHB=chineses Han de Pequim, CHS=chineses Han do sul, JPT=japoneses de Tóquio, CEU=residentes de Utah com ascendência da Europa ocidental e do norte, FIN=finlandeses, GBR=ingleses e escoceses, IBS=espanhóis, TSI=italianos da toscana

A ausência da 904_906delGAG corrobora um aspecto, que é o da grande variação da prevalência de DYT1 em diferentes etnias, desde 1/16.000 em judeus Askhenazi a 1/200.000 em não-judeus (Müller e Kupke, 1990). Outras coortes de distonia primária encontraram a deleção em 2,7% dos pacientes chineses, 15,9% em iranianos e 20,8% em poloneses (Cheng et al, 2011; Akbari et al, 2012; Gajos et al, 2007). Entre os nossos pacientes, não buscamos selecionar o tipo de distonia e incluímos todas as isoladas idiopáticas. As atuais recomendações para a realização de teste molecular para a DYT1 são: pacientes com menos de 30 anos ou, se probando de início tardio, com familiar de início precoce (Albanese et al, 2010). Este critério selecionaria 20 de nossos sujeitos, o mesmo que a outra coorte brasileira de 21 pacientes que isolou a deleção em 1 paciente e seu irmão (De Carvalho Aguiar et al, 2010).

A DYT6 tem apresentação clínica mais variada, porém envolvimento cervical e oromandibular tende a ser mais frequente nesses indivíduos. Diversas mutações *nosense*, *missense* e *frameshift* foram encontradas nos 3 exons, porém concentradas no domínio THAP, altamente conservada e localizada na porção amino-terminal. Esta porção está representada em verde na figura 7, juntamente com a região central rica em prolina e a C-terminal em hélice onde está o sinal de localização nuclear (Xiomerisiou et al, 2012). Pelo menos 31 mutações patogênicas já foram identificadas (Bragg et al, 2011)

Figura 7 - Domínios do gene THAP1



THAP domain: domínio thap, low complexity domain: domínio de baixa complexidade, coiled coil: hélice

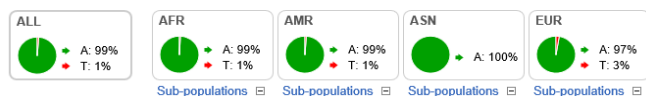
O domínio THAP é o responsável pela ligação ao DNA, mas a perda de função encontrada nas proteínas mutantes parece estar associada a uma perda de estabilidade do produto final e não a uma perda da capacidade de ligação (Campagne et al, 2012)

Apesar da DYT6 ser considerada de fenótipo misto, nosso paciente apresentou fenótipo característico, de início adulto jovem, rostral, com generalização e envolvimento vocal. A história familiar com variação fenotípica está presente, como encontrado em outro estudo brasileiro (Camargo et al, 2014), que também identificou mutações inéditas em sua amostra. A Federação Europeia de Sociedades Neurológicas recomenda que seja feito o diagnóstico molecular em pacientes com início precoce ou recorrência familiar (ou após exclusão de DYT1), predomínio craniocervical, com especial atenção a presença de disфонia. Nosso grupo apresenta 31 pacientes nessas condições, porém encontramos apenas 1 mutação patogênica (1,47%). Um estudo sérvio encontrou frequência de 1,8% de DYT6 em sua coorte de 281 pacientes (Dobričić et al, 2013) e o mesmo estudo chinês mencionado anteriormente encontrou 2,7% de DYT6 em seus sujeitos (Cheng et al, 2011).

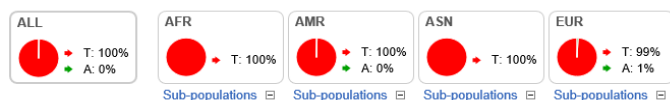
O gene *THAP1* se mostrou em estudos posteriores um modulador da expressão de *TOR1A*. Ele é um fator de transcrição que reprime a expressão, enquanto proteínas mutantes diminuem a repressão. O gene *THAP1* foi encontrado em maior quantidade no cérebro em formação de ratos (Gavarini et al, 2011). Um conceito interessante sobre a relação de mutações aparentemente benignas com subtipos específicos de distonia (Lohmann et al, 2012) ainda está em formação, pois algumas mutações, mesmo inócuas, são encontradas em maior frequência nos sujeitos sintomáticos. Porém coortes pequenas para cada alteração impedem que essa hipótese seja estudada mais profundamente (Lohmann et al, 2012, Xiomerisiou et al, 2012). A frequência alélica dos SNPs encontrados na caracterização genotípica da DYT6 está ilustrada a seguir, sendo que as três variações encontradas em apenas 1 alelo estão no início e apresentam 0,8% aproximadamente de frequência do segundo alelo mais prevalente (1/136). As demais frequências representadas nas figuras são oriundas da Projeto 1000 genome, constituída por populações controle de etnias diferentes.

Figura 8 – Frequência alélica dos SNPs encontrados no gene *THAP1* nos sujeitos comparados a diferentes populações controle

rs181850921

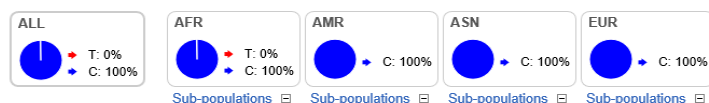


rs184497763

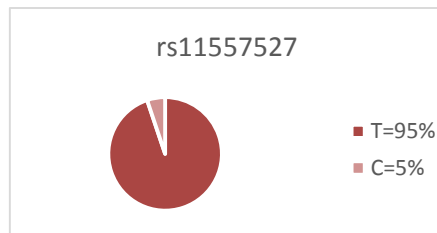
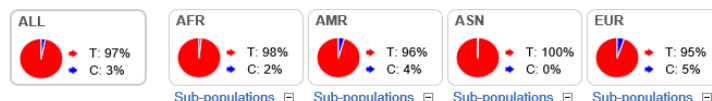


rs191034081

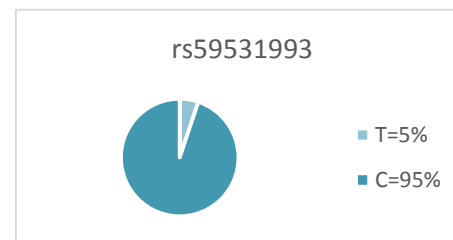
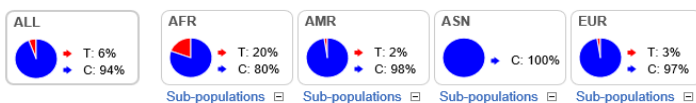
1000 Genomes allele frequencies



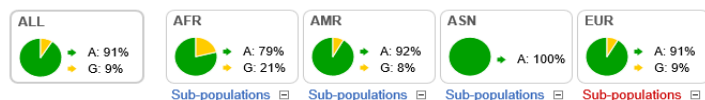
rs11557527



rs59531993



rs71521601



ALL: todos os indivíduos, AFR=todos os indivíduos africanos, AMR=todos os indivíduos americanos, A=todos os indivíduos da Ásia oriental, EUR=todos os indivíduos europeus

Quanto ao achado de dois pacientes com SCA3, consideramos relevante que, devido ao perfil étnico brasileiro, apresentações atípicas de doenças mais prevalentes em nosso meio também sejam alvo de investigação acadêmica lembradas entre os diagnósticos diferenciados de nossos pacientes (D'Abreu et al, 2010). O achado de graus variáveis de síndrome extrapiramidal distônico-rígida é parte dos quadros sugestivos de SCA3 independente do subtipo clínico. AN e JBL não se encaixam em nenhum dos subtipos clássicos, apesar de terem uma expansão de 78 e 72 CAG respectivamente, o que na literatura especializada sabe-se ser comum. Porém queremos ressaltar que a distonia pode ser um achado presente em diferentes idades e combinações de sintomas, mesmo em pacientes com progressão lenta e não apenas no fenótipo tipo I, que acomete aproximadamente 13% dos indivíduos, e é caracterizado por início precoce, espasticidade, rigidez e bradicinesia (Paulson, 2011), onde vemos os casos de síndromes distônicas mais proeminentes.

CONCLUSÕES

A avaliação clínica demonstrou que, apesar de diferenças étnicas, algumas características na apresentação das distonias são universais.

Os resultados dos testes moleculares para as mutações nos genes *TOR1A* e *THAP1* demonstraram que em nossa coorte a mutação clássica para a distonia DYT1 está abaixo da média internacional. O polimorfismo D216H foi encontrada numa população que inclui irmãs com genótipo discordante e fenótipo semelhante e em 2 pacientes com fenótipo DYT1 clássicos.

A nova mutação encontrada, g.5308_5317del no fim do exon 1, aumenta o número de mutações encontradas na DYT6, porém com um mecanismo de perda de função pela inibição da transcrição.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Akbari MT, Zand Z, Shahidi GA, Hamid M. Clinical features, DYT1 mutation screening and genotype-phenotype correlation in patients with dystonia from Iran. *Med Princ Pract.* 2012;21(5):462-6.

Albanese A. Dystonia: clinical approach. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13 Suppl 3:S356-61.

Albanese A, Barnes MP, Bhatia KP, Fernandez-Alvarez E, et al. A systematic review on the diagnosis and treatment of primary (idiopathic) dystonia and dystonia plus syndromes: report of an EFNS/MDS-ES Task Force. *Eur J Neurol.* 2006;13:433-44.

Albanese A, Asmus F, Bhatia KP, Elia AE, Elibol B, Filippini G, Gasser T, Krauss JK, Nardocci N, Newton A e Valls-Sole J. EFNS guidelines on diagnosis and treatment of primary dystonias. *Eur J Neurol.* 2010;18:5–18.

Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 2013 Jun 15;28(7):863-73.

Altenmüller E, Jabusch HC. Focal hand dystonia in musicians: phenomenology, etiology, and psychological trigger factors. *J Hand Ther.* 2009 Apr-Jun;22(2):144-54 .

Bragg CD, Armata IA, Nery FC, Breakefield XO, Sharma N. Molecular pathways in dystonia. *Neurobiol Dis.* 2011 May; 42(2):136–147.

Bruggemann N, Kock N, Lohmann K, König IR, Rakovic A, Hagenah J, Schmidt A, Ziegler A, Jabusch HC, Siebner H, Altenmüller E, Münchau A, Klein C. The D216H variant in the *DYT1* gene: A Susceptibility factor for dystonia in familial cases? *Neurology* 2009;72:1441-1443

Calakos N, Patel VD, Gottron M, et al. Functional evidence implicating a novel *TOR1A* mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia. *J Med Genet* 2010; 47: 646-650.

Camargo CHF, Camargos ST, Raskin S, Cardoso FEC, Teive HF. DYT6 in Brazil: Genetic Assessment and Clinical Characteristics of Patients. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2014 Apr 15;4:226.

Camargo CHF, Camargos ST, Becker N, Munhoz RP, Raskin S, Cardoso FEC, Teive HAG. Cervical dystonia: about familial and sporadic cases in 88 patients. *Distonia cervical: considerações sobre casos esporádicos e familiares em 88 pacientes. Arq Neuropsiquiatr*. 2014 Mar-Apr 13.

Camargo MCR e Toledo MCF. Teor de cafeína em cafés brasileiros. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 1998;18, 421-424.

Campagne S, Muller I, Milon A, Gervais V. Towards the classification of DYT6 dystonia mutants in the DNA-binding domain of THAP1. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 19 9927–9940.

Cheng FB, Wan XH, Feng JC, Wang L, Yang YM, Cui LY. Clinical and genetic evaluation of DYT1 and DYT6 primary dystonia in China. *Eur J Neurol*. 2011 Mar;18(3):497-503.

D'Abreu A, França MC Jr, Paulson HL, Lopes-Cendes I. Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010 Jan;16(1):2-7.

De Carvalho Aguiar P, Fuchs T, Borges V, Lamar KM, Silva SM, Ferraz HB, Ozelius L. Screening of Brazilian families with primary dystonia reveals a novel THAP1 mutation and a de novo TOR1A GAG deletion. *Mov Disord.* 2010;25:2854-7.

Defazio G, Berardelli A, Abbrunese G, Lepore V, Coviello V, Acquistapace D, Capus L, Carella F, De Bernardinis MT, Galardi G, Girlanda P, Maurri S, Albanese A, Bertolasi L, Liguori R, Rossi A, Santoro L, Tognoni G, Livrea P. Possible risk factors for primary adult onset dystonia: a case control investigation by the Italian Movement Disorder Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64:25-32.

Defazio G, Abbrunese G, Livrea P, Berardelli A. Epidemiology of primary dystonia. *Lancet Neurol.* 2004;3:673-8.

Defazio G, Berardelli A, Hallett M. Do primary adult-onset focal dystonias share aetiological factors? *Brain.* 2007;130(Pt 5):1183-93.

Defazio G, Abbrunese G, Aniello MS, Bloise M, Crisci C, Eleopra R, Fabbrini G, Girlanda P, Liguori R, Macerollo A, Marinelli L, Martino D, Morgante F, Santoro L, Tinazzi M, Berardelli A. Environmental risk factors and clinical phenotype in familial and sporadic primary blepharospasm. *Neurology.* 2011 Aug 16;77(7):631-7

Dobričić VS, Kresojević ND, Svetel MV, Janković MZ, Petrović IN, Tomić AD, Novaković IV, Kostić VS. Mutation screening of the DYT6/THAP1 gene in Serbian patients with primary dystonia. *J Neurol.* 2013 Apr;260(4):1037-42

Domenico G. Verificação de quantidade de cafeína em refrigerantes de cola e bebidas energéticas. Chapecó - SC, 2010.

Elia AE, Lalli S, Albanese A. Differential diagnosis of dystonia. Eur J Neurol. 2010 Oct; 166:834-840

Gajos A, Piaskowski S, Sławek J, Ochudło S, Opala G, Łobińska A, Honczarenko K, Budrewicz S, Koszewicz M, Pełszyńska B, Liberski PP, Bogucki A. Phenotype of the DYT1 mutation in the TOR1A gene in a Polish population of patients with dystonia. A preliminary report. Neurol Neurochir Pol. 2007 Nov-Dec;41(6):487-94.

Gasser T, Bressman S, Durr A, Higgins J, Klockgether T, Myers RH. Molecular Diagnosis of Inherited Movement Disorders: Movement Disorders Society Task Force on Molecular Diagnosis. Mov Disord. 2003;18:3-18.

Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard J, Ozelius LJ. A Direct Interaction between Causative Genes of DYT1 and DYT6 Primary Dystonia. Ann Neurol. 2010 Oct;68(4):549-53 .

Geyer HL, Bressman SB. The diagnosis of dystonia. Lancet Neurol. 2006;5:780-90.

Hallett M, Evinger C, Jankovic J, Stacy M; BEBRF International Workshop. Update on blepharospasm: report from the BEBRF International Workshop. Neurology. 2008;71:1275-82.

Groen JL, Ritz K, Tanck MW, Warrenburg BP, van Hilten JJ, Aramideh M, Baas F, e Tijssen MAJ. Is TOR1A a Risk Factor in Adult-Onset Primary Torsion Dystonia? Mov Dis, 2013: 28; 6, 827-31.

Kamm C, Fischer H, Garavaglia B, Kullmann S, Sharma M, Schrader C, Grundmann K, Klein C, Borggrafe I, Lobsien E, Kupsch A, Nardocci N, Gasser T. Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology* 2008;70:2261-2262.

Klein C, Marras C, Münchau A. Dystonia Overview in GeneReviews 2003 (Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors) [Updated 2014].

Leung JC, Klein C, Friedman J, Vieregge P, Jacobs H, Doheny D, Kamm C, DeLeon D, Pramstaller PP, Penney JB, Eisengart M, Jankovic J, Gasser T, Bressman SB, Corey DP, Kramer P, Brin MF, Ozelius LJ, Breakefield XO. Novel mutation in the *TOR1A (DYT1)* gene in atypical, early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* 2001; 3: 133-143.

Lohmann K, Uflacker N, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, Schneider SA, Osmanovic A, Svetel M, Ferbert A, Zittel S, Kuhn AA, Schmidt A, Altenmüller E, Münchau A, Kamm C, Wittstock M, Kupsch A, Moro E, Volkmann J, Kostic V, Kaiser FJ, Klein C, Bruggemann N. Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *European Journal of Human Genetics* 2012; 20: 171–175

Martino D, Defazio G, Abbruzzese G, Girlanda P, Tinazzi M, Fabbrini G, Aniello MS, Avanzino L, Colosimo C, Majorana G, Trompetto C, Berardelli A. Head trauma in primary cranial dystonias: a multicentre case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Mar;78(3):260-3.

Müller U, Kupke KG. The genetics of primary torsion dystonia. *Hum Genet* 1990;84:107-15.

O’Riordan S, Raymond D, Lynch T, et al. Age at onset as a factor in determining the phenotype of primary torsion dystonia. *Neurology*. 2004;63:1423–1426.

Ozelius LJ, Bressman SB. Genetic and clinical features of primary torsion dystonia. *Neurobiol dis.* 2011 May; 42: 127-35

Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakfield XO. The early onset torsion dystonia gene (*DYT1*) encodes an ATP-binding protein. *Nature genetics.* 1997;17: 40-48.

Paulson H. Spinocerebellar ataxia type 3. *GeneReviews* 2011; www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/

Petrucci S, Valente EM. Genetic issues in the diagnostics of dystonias. *Front Neurol.* 2013 Apr 10;4:34.

Risch NJ, Bressman SB, Senthil G, Ozelius LJ. Intragenic *Cis* and *Trans* Modification of Genetic Susceptibility in *DYT1* Torsion Dystonia. *Hum Genet* 2007; 80: 1188-1193.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989;p.E3-E4.

Stacy M. Epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of cervical dystonia. *Neurol Clin.* 2008;26 Suppl 1:23-42.

Tanabe LM, Kim CE, Alagem N, Dauer WT. Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nat Rev Neurol.* 2009;5:598-609.

The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491, 56–65.

Torres-Russotto D, Perlmuter JS. Focal dystonias of the hand and upper extremity. J Hand Surg Am. 2008 Nov;33:1657-8.

Valente EM, Albanese A. Advances in the genetics of primary torsion dystonia. F1000 Biol Rep. 2010;2:41.

Weiss EM, Hershey T, Karimi M, et al. Relative risk of spread of symptoms among the focal onset primary dystonias. Mov Disord. 2006;21:1175–1181.

Xiromerisiou G, Houlden H, Scarneas N, Stamelou M, Kara E, Hardy J, Lees AJ, Korlipara P, Limousin P, Paudel R, Hadjigeorgiou GM, Bhatia KP. THAP1 Mutations And Dystonia Phenotypes: Genotype Phenotype Correlations. Mov disorders. 2012 Sep 1;27:1290-4

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo Clínico, Genético e de Neuroimagem das Distonias na População Brasileira

Investigador principal: Dra Anelyssa Cysne Frota D'Abreu

Colaboradores: Dra Iscia Lopes-Cendes

Dr Fernando Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com distonia. O objetivo geral do estudo é o de avaliar as causas genéticas e as alterações que ocorrem no cérebro dos pacientes que apresentam esta doença. A identificação de alterações genéticas na nossa população e a avaliação das imagens pode levar a um melhor conhecimento sobre as distonias e pode no futuro levar a uma melhora no tratamento. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores. Podendo assim ser utilizadas para outros fins de pesquisa sobre as distonias, desde que este novo projeto tenha aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-Unicamp. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

Os objetivos principais deste estudo são:

- Identificar a presença de mutações genéticas em pacientes com distonia

- Identificar alterações na ressonância magnética que possam ajudar a entender melhor as causas da distonia.

Este estudo envolve a realização de:

- Avaliação clínica, com revisão da história clínica, e exame neurológico detalhado
 - Coleta de sangue periférico para pesquisa das mutações
- Realização de ressonância magnética: é uma técnica capaz de produzir imagens de alta qualidade e resolução (nitidez) anatômica, assim como informações sobre os tecidos. Essas imagens também poderão produzir informações que serão úteis para melhor definição do diagnóstico e tratamento. O objetivo principal desse estudo é determinar a importância dessas informações.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico, além dos exames de sangue e ressonância magnética. Hospitalização não será necessária.

A coleta de sangue é a mesma que é realizada para exames de rotina, e será feita em uma veia periférica no antebraço. O meu sangue será armazenado por no máximo 5 anos, após a sua coleta. Eu () autorizo () não autorizo a utilização do meu sangue para novas pesquisas, desde que/mesmo que estas tenham sido aprovadas pelo Comitê de Ética do HC-Unicamp. O procedimento de ressonância magnética é semelhante a uma tomografia. Eu fui informado que eu serei colocado em uma maca e serei movido lentamente para dentro do aparelho de ressonância magnética. Um alto falante dentro do aparelho de ressonância magnética possibilita a minha constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico pode me ver e ouvir, e eu posso ser removido(a) se for preciso; por exemplo, se durante o exame eu me sentir mal ou com ansiedade por permanecer em local fechado. O procedimento pode durar entre 45 a 60 minutos. Durante a primeira parte do exame eu irei ouvir ruídos, tipo marteladas, por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do meu cérebro. O restante do exame será relativamente

silencioso.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com distonias, possibilitando um melhor diagnóstico e futuramente um tratamento mais adequado. Os resultados de meus exames ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

Não há riscos envolvidos com a coleta de sangue periférico. Pode haver certo desconforto no momento da coleta, assim como formação de um pequeno hematoma. O único desconforto relacionado a ressonância magnética é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para me deixar mais confortável. Uma das principais vantagens da ressonância magnética é que esta não utiliza raios X ou outro tipo de radiação ionizante, ao contrário de outros tipos de exame radiológicos. As imagens são obtidas graças a um campo magnético (ímã), um transmissor e receptor de ondas de rádio e um computador que é utilizado para obter as informações bioquímicas e imagens da anatomia interna. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente. É **muito importante** informar aos médicos(as) e técnicos(as) caso eu tenha um **marca-passo cardíaco, um clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico em meu corpo**, que tenha sido implantado durante uma cirurgia ou alojado em meu corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes devido ao forte campo magnético que funciona como um ímã muito forte. Eu também devo remover todos os objetos metálicos que estiverem comigo (relógio, canetas, brincos, colares, anéis, etc), pois estes também podem movimentar ou aquecer dentro do campo magnético.

SIGILO

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão

parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL

Eu entendo que posso pedir informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra Anelyssa D'Abreu (19) 3521-7754/ 35219217, estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (19) 3521-8936. Eu receberei uma cópia deste documento para ser arquivado e consultado em caso de dúvidas.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

ACEITAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu confirmo que o(a) Dr(a)._____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens que venham desse projeto de pesquisa. Eu concordo com a realização da coleta de sangue e da ressonância magnética. Eu afirmo que li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

Nome da testemunha

data

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

ANEXO 2

Nome:

Data:

HC:

Idade:

Data de Nascimento:

Procedência:

Profissão:

Escolaridade:

i. Revisão da História:

a. Início dos sintomas:

b. Localização inicial:

c. Progressão da distonia:

d. Sintomas neurológicos associados:

ii. Fatores possivelmente associados à distonia:

Data

Anoxia

Trauma (SNC)

Trauma (periférico)

Neuropatia (mesma localização da distonia)

AVC

Infecção

Distúrbio Metabólico (Especificar_____)

Exposição à neurolépticos (Especificar_____)

Alterações de neuroimagem

Distúrbios mitocondriais

Tumor

Anestesia Geral

Outros antecedentes:

iii. Antecedentes pessoais:

() tabagismo () alcoolismo () outros:

Profissão:

Exposição a agrotóxicos/ pesticidas: () sim () não. Se sim, especificar:

Exposição a metais pesados: () sim () não. Se sim, especificar:

Realizou trabalhos de soldagem? () sim () não. Se sim, especificar:

Consumo médio diário de café:

Consumo médio diário de refrigerantes:

Especificar tipo de bebida:

iv. História de tratamento:

Medicações orais:

Artane

Triexifenidil

Levodopa

Benzodiazepínico (Especificar_____)

Neuroléptico atípico (Especificar_____)

Injeções de Toxina Botulínica: Sim () Não(). Se sim,especificar:

• Início do tratamento: Última aplicação:

Outros:

v. Tratamento Atual:

Cirurgia: () DBS () Palidotomia

Medicações Orais:

Medicações orais:

Artane

Triexifenidil

Levodopa

Benzodiazepínico (Especificar_____)

Neuroléptico atípico (Especificar_____)

Injeções de Toxina Botulínica: Sim () Não(). Se sim,especificar:

• Início do tratamento: Última aplicação:

Outros:

vi. História familiar:

Etnia:

História Familiar de Distúrbio do Movimento:

() HF + 

() HF –

() HF possível

() Desconhecida

() distonia

() parkinsonismo

() mioclônus

() ataxia

Heredograma:

vii. Exame Físico

a. Outros achados neurológicos:

- ☐ Síndrome piramidal
- ☐ Alterações na sensibilidade
- ☐ Achados cerebelares
- ☐ Paralisia supranuclear
- ☐ Alteração cognitiva
- ☐ Alteração psiquiátrica

b. Distonia:

- ☐ Definitiva
- ☐ Provável
- ☐ Possível
- ☐ Sem distonia
- ☐ Outro distúrbio do movimento

c. Fatores associados:

- ☐ Flutuações diurnas
- ☐ Responsiva ao álcool
- ☐ Responsiva a levodopa
- ☐ Início súbito
- ☐ História de remissão
- ☐ Músico
- ☐ Distonia+outro achado neurológico
- ☐ Mioclônus
- ☐ Tremor
- ☐ Parkinsonismo

d. Distribuição:

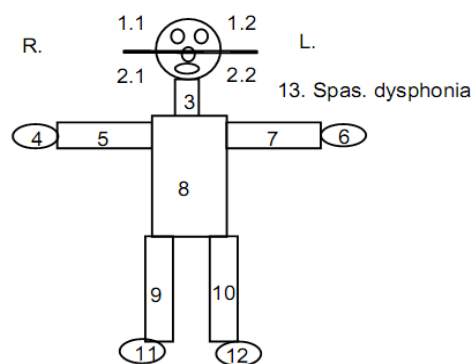
- ☐ Generalizada
- ☐ Hemidistonia
- ☐ Multifocal
- ☐ Segmentar
- ☐ Focal
- ☐ Outro

e. Classificação:

Primária

Primária Plus:

- ☐ Distonia dopa-responsiva
- ☐ Distonia-mioclonia
- ☐ Distonia –parkinsonismo
- ☐ Distonia paroxística
- ☐ Parkinsonismo



Região	Fatores desencadeante	Gravidade	peso	Score
Olhos	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Leve. Piscamento ocasional. 2. Leve. Piscamentos freqüentes, sem espasmos prolongados de fechamento ocular. 3. Moderado. Fechamento ocular prolongado, mas olhos abertos a maior parte do tempo.	0.5	
Boca	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Leve. Movimentos de língua e mandíbulas ocasionais. 2. Leve. Movimento presente menos de 50% do tempo. 3. Movimentos ou contrações distônicas moderadas presentes a maior parte do tempo. 4. Movimentos ou contrações distônicas severas presentes a maior parte do tempo.	0.5	
Fala e deglutição	1. Ocasional, uma ou ambas 2. Uma destas freqüente 3. Uma desta freqüente e outra ocasional 4. Ambas freqüentes	0. Normal 1. Leve, fala fácil de entender ou engasgos ocasionais. 2. Alguma dificuldade para entender fala ou engasgos freqüentes 3. Dificuldade importante para entender fala ou inabilidade de engolir comidas sólidas 4. Anartria, ou dificuldade grave para engolir comidas pastosas e líquidas.	1	
Pescoço	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Leve. Repuxo ocasional. 2. Torcicolo óbvio, porém leve. 3. Repuxo moderado. 4. Repuxo severo.	0.5	
Braço D	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Distonia leve. Clinicamente insignificante. 2. Leve, distonia óbvia porém não incapacitante. 3. Moderada, consegue segurar, alguma função manual. 4. Grave. Sem função manual.	1	
Braço E	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Distonia leve. Clinicamente insignificante. 2. Leve, distonia óbvia porém não incapacitante. 3. Moderada, consegue segurar, alguma função manual. 4. Grave. Sem função manual.	1	
Perna D	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Distonia leve. Clinicamente insignificante. 2. Distonia leve. Anda sem assistência em boa velocidade. 3. Distonia moderada. Requer assistência ou marcha gravemente afetada. 4. Grave. Não consegue ficar em pé, ou andar na perna afetada.	1	
Perna E	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia 1. Distonia leve. Clinicamente insignificante. 2. Distonia leve. Anda sem assistência em boa velocidade. 3. Distonia moderada. Requer assistência ou marcha gravemente afetada. 4. Grave. Não consegue ficar em pé, ou andar na perna afetada.	1	
Tronco	0. Sem distonia 1. Distonia somente com ação específica 2. Distonia com diversas ações 3. Distonia de ação de parte remota do corpo ou intermitente no repouso 4. Distonia presente no repouso	0. Sem distonia presente. 1. Inclinação lateral leve. Clinicamente insignificante. 2. Inclinação clara, mas não interfere com marcha e posição supina. 3. Inclinação moderada. Interfere na marcha e manutenção da posição supina. 4. Inclinação grave. Paciente não consegue andar ou manter-se em pé.	1	

ANEXO 3

Artigo submetido

Unusual presentation of a *not so* rare disease: searching for the molecular diagnosis of patients with generalized dystonia

Piovesana LG ¹,MD; Torres FR², Ph.D.; Azevedo PC¹,MD; Nunes MB¹, MD; Amaral TP², B.Sc, Rosa MMV², B.Sc, França Jr M¹,MD, PhD; Lopes-Cedes I², MD, PhD; D'Abreu A¹, MD, PhD

1: University of Campinas, Department of Neurology

2: University of Campinas, Department of Medical Genetics.

Word count: 649

Number of references: 3

Number of figures: 0

Number of tables: 1

Keywords: dystonia; DTY 1; DYT 6; SCA3

None of the authors have conflicts of interest directly related to the development of the manuscript.

This work was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation), grant number 2010/11085-9.

*Corresponding Author:

Anelyssa D'Abreu, MD, PhD

Neuroimaging Laboratory

School of Medical Sciences – University of Campinas

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Campinas, SP, Brazil - 13083-887

Phone: +55 19 3521 8242, Fax: +55 19 3521 8242

E-mail: anelyssa@gmail.com

Unusual presentation of a *not so* rare disease: searching for the molecular diagnosis of patients with generalized dystonia

Dystonia is a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions causing abnormal, often repetitive, movements, postures, or both¹. For the last three years, in order to better understand the clinical and genetic profile of dystonia syndromes in Brazil, we have systematically evaluated patients with dystonia, performing a review of the clinical presentation, brain MRI and molecular studies (DYT 1 and DYT 6). So far we have enrolled 112 subjects, all recruited in a single clinical center. Patients were followed prospectively and examined by the same group of neurologists. Clinical classification of 96 patients, excluding 16 patients with acquired (secondary dystonia), is presented in table 1. Here we report two unrelated patients with similar clinical presentation and an unexpected molecular diagnosis.

The first is AN, a 23 year-old male with difficulty in speech since 16 years of age, with a tendency to keep mouth open and slow articulation of words, symptoms were much milder at rest. There also was a subjective feeling of loss of coordination and rare falls. Family history was positive for a sister, father and uncle with progressive dysfunction of speech and gait beginning in early adulthood. Physical examination on February 2010 showed dystonia of jaw opening, cervical tremor, mild postural instability with good tandem walk, a careful gait, slight inversion of right foot, mild intention tremor, horizontal nystagmus, upper gaze palsy, no appendicular dysmetria and brisk tendon reflexes in lower limbs. Investigation of secondary causes showed a TSH: 12.79 UI and normal MRI, CSF and EMG. DYT6 and DYT1 mutations were negative Fourteen months into follow up, we observed mild ataxia, which led to the positive testing for SCA3.

The second patient is JBL, a 51 year-old male from the north of the country with an uneventful medical history until 2002, when he suffered a car accident with a hip fracture and a left inner ear trauma. He then developed hearing loss, vertigo, general weakness combined with shortness of breath and, 3 years prior to our first consult in November 2010, a difficulty in keeping eyes open. Family history was, at first, unremarkable. Physical examination showed blepharospasm, pursing of lips, platysmal contractions, sagittal deviation of neck with mild anterocollis, strained voice with irregular breathing rhythm because of involuntary respiratory muscles contractions, feet inversion during gait, more evident on the right side. The patient main complaint was the feeling of tightness around the chest and eye closure in the sunlight. He was offered botulinum toxin injections with partial response to low doses in orbicularis and no response on cervical muscles, with dysphagia at higher dosage. DYT6 and DYT1 sequencing showed no alterations. On the following visits we noticed axial ataxia. Upon further questioning he mentioned his aunts had vertigo and poor balance. Molecular testing confirmed the SCA3 mutation.

Generalized dystonia has an evolving pattern and multiple etiologies. Despite the clinical presentation resembling hereditary dystonia, these 2 patients illustrate the need for reevaluation at each medical visit and stress the importance of exploring the family history. Neurodegenerative diseases were usually neglected in the past in Brazil, especially in remote areas. Presently, we are witnessing the first generation of patients taking interest in treating themselves and understanding their diagnosis². Therefore, a clear family history is rare and it is usually very difficult to personally exam relatives due to poor family contact or long distances.

To this date only 1 Brazilian patient had a confirmed mutation in the TOR1A gene and 11 patients had new THAP1 gene mutations identified³. In our cohort, no patient had the GAG-del characteristic of

DYT1 and we are currently analyzing the impact of 3 new mutations found in the THAP1 gene.

Conversely, the SCAs have a worldwide prevalence of 0.3-2.0/100000, while SCA3 is responsible for 69-92% of those in Brazil². SCA3 clearly is an important differential diagnosis in patients with hereditary dystonia in Brazil and possibly in other areas with comparative disease prevalence.

References

- 1- Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord*. 2013 Jun 15;28(7):863-73.
- 2- D'Abreu A, França MC Jr, Paulson HL, Lopes-Cendes I. Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010 Jan;16(1):2-7.
- 3- De Carvalho Aguiar P, Fuchs T, Borges V, Lamar KM, Silva SM, Ferraz HB, Ozeliuss L. Screening of Brazilian families with primary dystonia reveals a novel THAP1 mutation and a de novo TOR1A GAG deletion. *Mov Disord*. 2010 Dec 15;25(16):2854-7.

Table 1: Clinical Classification of Dystonia¹.

Distribution	Clinical Characteristic	Age of onset	number of patients
Focal (33)	Combined	Childhood	1
		Early Adulthood	13
	Isolated	Late Adulthood	19
Segmental (35)	Combined	Adolescence	1
		Early Adulthood	1
	Isolated	Early Adulthood	4
		Late Adulthood	29
Multifocal (2)	Combined	Late Adulthood	1
	Isolated	Childhood	1
Generalized (26)	Combined	Childhood	6
		Adolescence	4
		Late Adulthood	1
	Isolated	Infancy	2
		Childhood	8
		Adolescence	1
		Early Adulthood	2
		Late Adulthood	2