

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA

**Associação do polimorfismo *Val66Met* no *BDNF* com a idade de início
da doença de Huntington.**

Tailise Conte Gheno

Porto Alegre, junho de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA

**Associação do polimorfismo *Val66Met* no *BDNF* com a idade de início
da doença de Huntington.**

Tailise Conte Gheno

Trabalho de conclusão da disciplina de estágio curricular em Farmácia

Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira

Orientadora

Porto Alegre, junho de 2008.

“Como um grupo, os cientistas são a sociedade mais conservadora que existe. A maioria dos cientistas não pesquisa o desconhecido. A maioria estuda aquilo que já se sabe e evita aquilo que não se sabe. É a maneira mais fácil de fazer uma carreira em ciência. Mas para ter impacto é preciso fazer coisas diferentes daqueles que vieram antes de você. É assim que se descobre coisas novas.”

Craig Venter

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira, que a dois anos me deu a oportunidade de vivenciar a pesquisa no Laboratório de Identificação Genética, do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. E com toda a paciência me orientou na realização deste trabalho de conclusão de curso.

Aos colegas de laboratório, sempre juntos tanto nas horas da aprendizagem como nas de descontração. Em especial à Mariana, que me ajudou quando necessário, sem nenhuma objeção, na realização deste trabalho.

Às Instituições que forneceram o apoio financeiro e cultural: UFRGS, CNPq e FAPERGS.

Aos meus pais, Denise e Tailor, que sempre colocaram os filhos em primeiro lugar. Lutando dia-a-dia para que conseguíssemos alcançar nossos objetivos. Sem a força e compreensão deles eu não teria chegado onde cheguei.

Aos meus irmãos, Liliane e Juliano, que são meus companheiros e apesar das desavenças que acontecem às vezes, somos muito unidos e apoiamos uns aos outros.

Ao Tiago, meu amor e companheiro há quase 6 anos. Além de exemplo de profissional farmacêutico é a pessoa mais maravilhosa que conheço. Sempre ao meu lado para o que der e vier.

Aos demais familiares e à família do Tiago, por todo o apoio e incentivo nesses anos.

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo científico a ser submetido à revista

Clinical Genetics, na forma de Artigo Original.

Associação do polimorfismo *Val66Met* no *BDNF* com a idade de início da doença de Huntington.

TC Gheno^{a,b}, MF Kiehl^{a,b}, LB Jardim^{b,c}, ML Saraiva-Pereira^{a,b,d}

^a Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisas – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^b Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^c Departamento de Medicina Interna – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^d Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço para correspondência:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: +55 51 2101-8011

Fax: +55 51 2101-8010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Resumo

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica dominante, causada por uma expansão instável de repetições CAG no gene *IT15*. A manifestação clínica da DH começa na vida adulta e a idade de início da doença está relacionada com o tamanho da expansão trinucleotídica, porém outros fatores parecem influenciar as primeiras manifestações dos sintomas. Entre eles, podemos citar o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), que tem uma importante função no desenvolvimento e na manutenção de neurônios adultos e atua como regulador da plasticidade sináptica no cérebro humano. Nesse trabalho, foi correlacionado a variação da idade de início da DH com o polimorfismo Val66Met do BDNF. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação da distribuição genotípica entre os dois grupos de estudo, nem entre suas frequências alélicas. O número de repetições CAG foi responsável por 72% da variação da idade de início e o genótipo *Val66Met* apresentou uma idade de início mais tardia quando comparado com *Val66Val*. Portanto, no nosso estudo, o polimorfismo Val66Met do BDNF parece estar associado com a variação da idade de início da DH.

Palavras Chave

Doença de Huntington, doenças neurodegenerativas, *Val66Met BDNF*, PCR em tempo real.

Introdução

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa com padrão de herança autossômica dominante, caracterizada por movimentos involuntários coreiformes e alterações cognitivas. O início dos sintomas ocorre por volta dos 40 anos de idade, progredindo até a morte em um período de aproximadamente 10 a 15 anos após o início da doença (1). A prevalência da DH é variável conforme a etnia. Nos caucasianos da América do Norte e da Europa é de 3-7:100.000, sendo 10% menor no Japão, China, Finlândia e África (1, 2).

O gene da doença de Huntington (*IT15*) foi localizado e identificado no braço curto do cromossomo 4 (4p16) (3). O gene *IT15* codifica uma proteína que é altamente expressa no cérebro, mais abundante no córtex cerebral e estriatum, denominada huntingtina. Esta proteína citoplasmática é essencial durante o desenvolvimento na gástrula e neurogênese e, em adultos, para a sobrevivência neuronal. A huntingtina normal é anti-apoptótica nos neurônios do sistema nervoso central (SNC) e também está envolvida no transporte vesicular nas rotas de secreção e endocitose (4). A DH está associada com uma expansão do trinucleotídeo CAG no exon 1 do gene *IT15*. A expansão trinucleotídica no gene *IT15* resulta em uma poliglutamina expandida na região N-terminal da proteína huntingtina (5).

A natureza exata dos eventos moleculares e celulares que ligam a mutação com os sintomas ainda não foi evidenciada. No entanto, evidências demonstram o papel da expansão num ganho de função, o qual é tóxico e responsável pelo processo patológico (5). Indivíduos normais apresentam entre 10 a 35 repetições e pacientes com DH apresentam entre 37 a 121 repetições CAG. A doença apresenta penetrância completa em indivíduos que apresentam 41 ou mais repetições CAG (3). A genotipagem de

famílias com DH confirmou que o número de repetições está inversamente correlacionado com a idade de início da doença. Além disso, quando o gene da DH é herdado do pai pode, ocasionalmente, apresentar um número maior de repetições devido a uma instabilidade específica das repetições CAG durante a espermatogênese de alguns homens (5, 6). O número de repetições é responsável por 70% da variação da idade de início dos sintomas, sendo que o percentual restante se deve a fatores familiares, o que indica a ocorrência da ação de genes modificadores (5, 6). Vários genes candidatos são investigados como modificadores da DH, baseado no papel de cada um deles na neurodegeneração, neurotransmissão e/ou no desenvolvimento do cérebro (7). Os possíveis candidatos são, entre outros, genes que codificam produtos que interagem com a huntingtina normal e mutante. Polimorfismos nesses genes, mesmo sem efeito nos indivíduos não afetados, podem modificar o curso da doença (8).

O fator neurotrófico derivado de cérebro (*BDNF- Brain-derived neurotrophic factor*) é membro da família das neurotrofinas, que também inclui o fator de crescimento dos nervos (*nerve growth factor - NGF*), a neurotrofina-3 (*NT-3*) e a neurotrofina-4 (*NT-4*) (9, 10). Durante o desenvolvimento, o *BDNF* mantém a sobrevivência e a diferenciação de uma população neuronal selecionada no sistema nervoso periférico e central, participa do crescimento e direcionamento axonal e na modulação do crescimento e da morfologia dendrítica. Várias evidências sugerem que a atividade neuronal regula a transcrição do *BDNF*, o transporte do mRNA do *BDNF* e da proteína para dentro dos dendritos e a secreção da proteína *BDNF*, a qual é importante na formação apropriada das conexões sinápticas, durante o desenvolvimento e na aprendizagem e memória em adultos (11).

O gene que codifica o *BDNF* está localizado no braço curto do cromossomo 11, no limite das regiões p13 e 14. Em humanos, o gene *BDNF* ultrapassa 70Kb e tem uma

estrutura genômica extremamente complexa. Até o momento, foram identificados 11 exons e 9 promotores funcionais que sofrem *splicing* alternativo, sendo expressos de forma tecido-específica (11).

O *BDNF* parece ter um papel específico na patologia da DH, pois os pacientes têm uma redução na expressão do *BDNF* nos núcleos putâmen e caudado. Além disso, a huntingtina normal eleva a transcrição do *BDNF* pela inibição do elemento silenciador restrito de neurônios e promove o transporte do *BDNF* (dentro das vesículas) pelos microtúbulos. Assim, a huntingtina mutante reduz a expressão do *BDNF* e sua liberação, a qual é essencial para ação do *BDNF* nos neurônios estriatais (8, 12, 13). Em camundongos transgênicos, já foi demonstrado que o *BDNF* tem um impacto na idade de início e na gravidade da disfunção motora, controlando a sobrevivência dos neurônios da projeção estriatal (14).

A variação da seqüência do *BDNF* pode levar a uma diferença na expressão do gene ou metabolismo da proteína, causando uma vulnerabilidade neuronal seletiva. Um polimorfismo localizado na região codificadora do *BDNF*, ocasiona a substituição do aminoácido valina por metionina no códon 66 (*Val66Met*) na proteína. O polimorfismo *Val66Met* é altamente conservado através das espécies e demonstrou ter influência na memória humana e na ativação do hipotálamo, por afetar o processamento intracelular e a secreção atividade-dependente do *BDNF* (15).

Todos os transcritos do *BDNF* são traduzidos no retículo endoplasmático em precursores pro*BDNF*, os quais são transportados por vesículas secretórias do complexo de Golgi aos dendritos, axônios e terminais neuronais. O transporte é controlado por um domínio do *BDNF* localizado na região próxima ao SNP *Val66Met*. Este polimorfismo não afeta a função da proteína *BDNF* madura, mas altera o transporte intracelular do pro*BDNF* e conseqüentemente a secreção do peptídeo maduro. (13).

A caracterização do polimorfismo do *Val66Met BDNF* realçou a importância dessa neurotrofina em diferentes desordens neuropsiquiátricas. Vários estudos clínicos associaram esse polimorfismo com alterações nas concentrações do BDNF no soro de pacientes com depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e anorexia (10, 16). Assim, o polimorfismo *Val66Met* pode ser um fator modificador genético na expressão de um número de condições cerebrais normais e anormais, portanto representa um bom candidato a gene modificador da idade de início da DH. Um estudo recente demonstrou que pacientes com DH que são heterozigotos para o polimorfismo *Val66Met* apresentam uma idade de início mais tardia quando comparada com os homozigotos para $BDNF_{Val}$ (17).

O objetivo deste trabalho foi correlacionar o polimorfismo *Val66Met* no gene do BDNF com a idade de início da DH e com o número de repetições CAG no gene *IT15* nos pacientes com DH.

Materiais e Métodos

Caracterização das amostras biológicas

Grupo de pacientes com DH: 47 pacientes não aparentados foram incluídos no presente estudo, todos provenientes da região sul do Brasil. O diagnóstico dos pacientes foi realizado pela determinação do número de repetições trinucleotídicas CAG no gene *IT15*. A idade de início dos sintomas de cada indivíduo foi obtida a partir da respectiva ficha clínica.

Grupo controle: 100 indivíduos não aparentados sem sinais clínicos da doença, também provenientes da região sul do Brasil. Essas amostras fazem parte de um banco de DNA de amostras anônimas.

Isolamento do DNA

O sangue periférico foi coletado dos pacientes com DH e dos indivíduos normais através de punção venosa em frasco contendo EDTA como anticoagulante. No grupo dos pacientes com DH, o DNA foi extraído a partir de 5mL de sangue periférico, utilizando o método de excesso de sais e proteinase K (18). No grupo dos indivíduos normais, o DNA foi isolado a partir de uma amostra de 100µL de sangue, utilizando o *kit GFXTM Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare)*, conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

O DNA extraído foi, então, quantificado pelo método fluorimétrico *Quant-iT*[®] (*Invitrogen*), utilizando o aparelho *Qubit* (*Invitrogen*), e todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 5ng/μL e armazenadas a - 18°C.

Análise molecular

A determinação do número de repetições CAG no gene *IT15* foi realizada através de PCR com *primers* fluorescentes, seguido de eletroforese capilar no equipamento *ABI 3130xl* (*Applied Biosystems*). A região adjacente as repetições CAG foi amplificada com o par de *primers* HuntF 5'-GACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGC-3' e HuntAR 5'-TGGCGGCTGTTGCTGCTGCTG-3'. O *primer* HuntAR foi marcado com 6-FAM (6-carboxifluoresceína) na sua extremidade 5' terminal.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μL contendo 10 ng de DNA genômico; 2.0 pmol de cada *primer* (HuntF/HuntAR); 400 μM *dNTPs* (*Amersham-Pharmacia*); 15 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl (*PCR Buffer II - Applied Biosystems*); 2.3 mM MgCl₂; 10% (v/v) dimetilsulfoxido (DMSO); e 2 unidades de *AmpliTaq Gold DNA polimerase* (*Applied Biosystems*).

A amplificação foi realizada em termociclador conforme descrito a seguir: desnaturação inicial e ativação da polimerase a 95°C por 10min, seguido por 5 ciclos a 94°C por 30seg e 72°C por 3min, 5 ciclos a 94°C por 30seg e 70°C por 3min, 5 ciclos a 94°C por 30seg, 68°C por 1min e 72°C por 2min e 20 ciclos a 94°C por 30seg, 60°C por 1min e 72°C por 3min e extensão final a 72°C por 20min.

Uma alíquota do produto do PCR (0.5 μL) foi misturada com 9.0μL formamida (*HiDye formamide, Applied Biosystems*) e 0.5μL *GeneScan500-LIZ* (*Applied Biosystems*). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5min e transferidas para banho

de gelo e mantidas por 5 min. A eletroforese foi realizada no *ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* usando um capilar de 36cmX50µm contendo *Performance Optimized Polymer-7 (POP-7, Applied Biosystems)*. As amostras foram injetadas durante 22seg a 3.0 kV e a eletroforese ocorreu a 15 kV por 40 minutos a 60°C. O tamanho dos *amplicons* foram calculados por comparação com o marcador de peso molecular *GeneScan500-LIZ* e os resultados foram interpretados com o *GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems)*.

A região polimórfica do gene *BDNF* foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do ensaio alelo específico *TaqMan® (Applied Biosystems)*, utilizando o equipamento *ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, para genotipagem do polimorfismo *Val66Met* do *BDNF* (SNP ID: rs6265).

A amplificação foi realizada em um volume final de 8µL, contendo 10ng de DNA genômico, 0,2µL de *SNP Genotyping Assay Mix® 40X* e 4µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix® 2X*. O programa para termociclagem incluiu um ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão.

A discriminação alélica foi realizada através da coleta da fluorescência após amplificação, a uma temperatura de 60°C durante 1 minuto, e os resultados foram analisados utilizando o *7500 System SDS v1.4 Software (Applied Biosystems)*.

Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas para o grupo de controle e para o grupo de pacientes com DH foram estimadas pelo método de contagem. A comparação das frequências encontradas nos dois grupos de estudo foi realizada pelo teste do Qui-

quadrado (χ^2) de Pearson, com o auxílio do programa WINPEPI (19). A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

As frequências genotípicas das duas populações foram testadas para o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste χ^2 de Pearson, com um nível de significância de 5%.

A associação da idade de início com o número de repetições CAG no alelo mutante foi estimada por regressão linear, com nível de significância de 5%. O melhor ajuste estimado pelo valor de R^2 foi obtido depois de uma transformação logarítmica da idade de início.

Para analisar a possível influência do polimorfismo *Val66Met* do BDNF na idade de início foi feita a média das idades para cada genótipo. Posteriormente, através do teste t de Student, essas médias foram comparadas, com um intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Genotipagem do polimorfismo *Val66Met* do gene *BDNF*

As frequências genóticas e alélicas do polimorfismo *Val66Met* do gene *BDNF* foram determinadas nos dois grupos e os dados obtidos estão resumidos na Tabela 1.

O grupo controle foi composto por 74 homozigotos para o alelo *Val66* (frequência genotípica = 0,740), 25 heterozigotos (0,250) e 1 homozigoto para o alelo *Met66* (0,010). O alelo contendo o nucleotídeo ancestral, codificante do resíduo *Val*, apresentou uma frequência de 0,865 e o alelo codificante do resíduo *Met* apresentou uma frequência de 0,135.

No grupo de pacientes foram identificados 33 indivíduos homozigotos para o alelo *Val66* (0,702), 11 indivíduos heterozigotos (0,234) e 3 indivíduos homozigotos (0,064) para o alelo *Met66*. O alelo *Val66* apresentou uma frequência de 0,819 e o alelo *Met66* apresentou uma frequência de 0,181.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação da distribuição genotípica entre os dois grupos de estudo ($\chi^2=3,501$; gl=2; $p=0,174$), nem entre suas frequências alélicas ($\chi^2=0,595$; gl=1; $p=0,440$).

As duas populações foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) e os valores χ^2 calculados para os dois grupos foram menores do que o valor tabelado para um nível de significância de 0,05. Portanto, as distribuições genóticas do grupo controle e dos pacientes com DH estão em equilíbrio de H-W.

Análise da regressão linear

Para os indivíduos com DH (n=47), a relação entre o número de repetições CAG no alelo mutante e a idade de início da doença foi determinada usando regressão linear. O melhor ajuste para os dados foi obtido depois de uma transformação logarítmica na variável dependente aplicando o modelo: $\ln(\text{idade}) = \alpha + \beta(\text{CAG})$, onde $\alpha = 5,757$ (EP= 0,204) e $\beta = -0,046$ (EP= 0,004) (Fig.1). Este modelo resultou em um valor preditivo de 72,5% ($R^2=0,725$, $p < 0,0001$).

Relação do polimorfismo com a idade de início

No grupo dos indivíduos com DH, a idade média de início foi 38,47 (desvio padrão = 13,59, intervalo = 6-72). Quando a amostra foi estratificada pelo genótipo do *Val66Met* (47 observações), os valores encontrados foram os seguintes: média (desvio padrão; intervalo; observações): *Val66Val*: 35,36 (12,09; 6-65; 33); *Val66Met*: 44,73 (14,11; 17-64; 11); *Met66Met*: 49,67 (21,13; 30-72; 3). As médias das idades foram comparadas pelo teste *t* de Student com intervalo de confiança de 95%. Quando os genótipos *Val66Val* e *Val66Met* foram comparados, a hipótese nula foi rejeitada em favor da hipótese alternativa, assim as médias dos dois genótipos são significativamente diferentes entre si. Por outro lado, quando comparamos o genótipo *Met66Met* com os outros dois genótipos, em ambos os casos a hipótese nula não foi rejeitada, considerando as médias não significativamente diferentes.

Discussão

Vários trabalhos foram realizados correlacionando o polimorfismo *Val66Met* no gene *BDNF* ao início das manifestações dos sintomas na DH. Entretanto, nenhum deles foi realizado com pacientes brasileiros (7, 8, 20, 21).

Alguns estudos demonstraram a influência do polimorfismo na funcionalidade do sistema nervoso central, a alteração no transporte intracelular e a secreção atividade-dependente do *BDNF* (15). Além disso, análise da proteína BDNF em um modelo murino de DH mostrou que o polimorfismo *Val66Met* causa uma redução na eficiência do transporte do BDNF vesicular ao longo dos microtúbulos (22). Baseado nisso, o polimorfismo *Val66Met* do *BDNF* mostrou-se um ótimo candidato como efeito modificador na variabilidade da idade de início em pacientes com DH.

Em nossa amostra, as frequências alélica e genotípica não apresentaram diferença entre o grupo de indivíduos normais e o grupo de pacientes com DH. As frequências alélicas e genotípicas em indivíduos normais e em pacientes com DH para o polimorfismo *Val66Met* previamente estabelecidas em 2005 em pacientes de origem espanhola também não demonstraram diferença estatisticamente significativa (17).

Nesse estudo, o número de repetições CAG foi responsável por 72% da variabilidade, valor muito semelhante ao encontrado em estudos realizados previamente (7, 17, 23, 24, 25).

Comparando o polimorfismo *Val66Met* do *BDNF* com a variação da idade de início no nosso estudo, observamos que pacientes com o genótipo *Val66Met* apresentaram um início da doença mais tardio quando comparados com pacientes com o genótipo *Val66Val*. Esse dado está de acordo com um estudo realizado previamente (17). Apesar do genótipo *Met66Met* apresentar uma idade de início mais tardia, a média

de idade de início em pacientes com esse genótipo não foi estatisticamente diferente dos demais. Mas, esse resultado deve ser considerado com cautela, visto que esse genótipo apresentou uma baixa frequência na nossa amostra. Esse dado também foi previamente observado (17). Outros estudos realizaram a mesma análise e não encontraram associação do polimorfismo com a idade de início da doença (7, 8, 24, 25).

Essa diferença entre os estudos pode ser devido à variação étnica entre as populações ou simplesmente pela diferença no tamanho da amostra entre os estudos. No presente trabalho e no trabalho de Alberch, em 2005, o tamanho das amostras foram menores que os outros quatro, assim é possível que não retratem o que acontece na população como um todo. Portanto, o aumento do número de amostras analisadas deverá produzir resultados mais representativos da nossa população.

No entanto, estudos recentes demonstraram que para ambos, BDNF_{Val66Val} e BDNF_{Val66Met}, a huntingtina mutante não prejudica o transporte do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, mas ela altera o transporte pós-Golgi do BDNF vesicular. Em especial, o transporte pós-Golgi do BDNF_{Val66Val} é bloqueado significativamente, enquanto que o transporte de BDNF_{Val66Met} não é afetado. Esse dado indica claramente que a huntingtina mutante afeta somente o transporte do BDNF_{Val66Val} sem causar a retenção do BDNF_{Val66Met} no complexo de Golgi (16). Além disso, uma diminuição do nível de BDNF foi associada a uma antecipação do início da DH e à um aumento da gravidade das alterações motoras (14).

Esses dados corroboram o achado desse estudo, visto que o BDNF é essencial para a sobrevivência dos neurônios estriatais (26). A diminuição desses níveis, devido à presença da huntingtina mutante e do genótipo *Val66Val*, causa morte precoce de neurônios e, conseqüentemente, os sintomas se manifestam na ausência da proteção do BDNF.

O presente trabalho, assim como outros dados publicados anteriormente, indicam que o BDNF tem um papel importante na patofisiologia da DH. O BDNF não é um indutor da DH e as alterações do *BDNF* não são responsáveis pelo início da doença, mas os dados obtidos nesse trabalho sugerem que o polimorfismo *Val66Met* do *BDNF* pode estar associado com a idade de início da DH na população regional. Esses dados indicam que a administração de BDNF pode ser um bom alvo para terapias de proteção do início da DH ou, até mesmo, para impedir ou diminuir a progressão da doença.

Agradecimentos

O presente trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

Referências

- (1) Hayden MR, Kremer B. Huntington Disease. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8^a ed. McGraw-Hill, New York, 2001:5677-5701
- (2) Margolis RL, Ross CA. Diagnosis of Huntington Disease. Clin Chem 2003;49 (10): 1726-1732.
- (3) Walker FO. Huntington's disease. Lancet 2007; 369: 218-228.
- (4) Zucatto C, Ciammola A, Rigamonti D et. al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. Science 2001;293:493-497.
- (5) Veitch NJ, Ennis M, McAbney JP et. al. Inherited CAG.CTG allele length is a major modifier of somatic mutation length variability in Huntington Disease. DNA Repair 2007; 6: 789-796.
- (6) Gussela JF, MacDonald ME. Huntington's disease: seeing the pathogenic process through a genetic lens. Trends Biochem Sciences. 2006; 31: 9: 533-540.
- (7) Di Maria E, Marasco A, Tartari M et. al. No evidence of association between BDNF gene variants and age-at-onset Huntington's disease. Neurobiol Dis 2006; 24: 274-279.
- (8) Metzger S, Bauer P, Tomiuk J et. al. Genetics analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. Hum Genet 2006; 120: 285-292.
- (9) Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. Neurobiol Aging 2005; 26: 115-123.
- (10) Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M et. al. Measurements of brain-derived neurotrophic factor: Methodological aspects and demographical data. Brain Res Bull 2007;73: 143-149.

- (11) Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T et. al. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 2007; 90: 397-406.
- (12) Ferrer I, Goutan E, Marin C et. al. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* 2000; 866: 257-261.
- (13) Zucatto C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007; 81: 294- 330.
- (14) Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF et. al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 2004; 24(35): 7727-7739.
- (15) Egan MF, Kojima M, Callicott JH et. al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112: 257-269.
- (16) Del Toro D, Canals JM, Ginés S et. al. Mutant huntingtin impairs the post-golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not is val66met polymorphism. *Neurobiol Dis* 2006; 26(49): 12748-12757.
- (17) Alberch J, López M, Badenas C et. al. Association between BDNF val66met polymorphism and age at onset in Huntington disease. *Neurology* 2005; 65(6): 964-965.
- (18) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- (19) Abranson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows) computer programs for epidemiologists, versão 1.62. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* [Programa de Computador], 2005.

- (20) Mai M, Akkad AD, Wieczorek S et. al. No association between polymorphisms in the BDNF gene and age at onset in Huntington disease. *BMC Med Genet* 2006; 7: 79.
- (21) Kishikawa S, Li J, Gillis T et. al. Brain-derived neurotrophic factor does not influence age at neurologic onset of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 280-285.
- (22) Gauthier LR, Charrin BC, Borrel PM et. al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 2004; 118: 127-138.
- (23) Stine OC, Pleasant N, Franz ML et. al. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1547-1549.
- (24) Wexler NS, Lorimer J, Porter J et. Al. Venezuelan Kindreds reveal that the genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3498-3503.
- (25) Djoussé L, Knowlton B, Hayden M et. al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age of onset of Huntington's disease. *Am J Med Genet* 2003; 119: 279-282.
- (26) Zuccato C, Liber D, Ramos C et. al. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res* 2005; 52: 133-139.

Legendas

Figura 1. Relação entre a idade de início e o número de repetições CAG nos alelos mutantes, para os genótipos do polimorfismo *Val66Met* do BDNF. A linha indica a regressão linear em toda a amostra (n=47), depois da transformação logarítmica da idade de início ($R^2=0,725$).

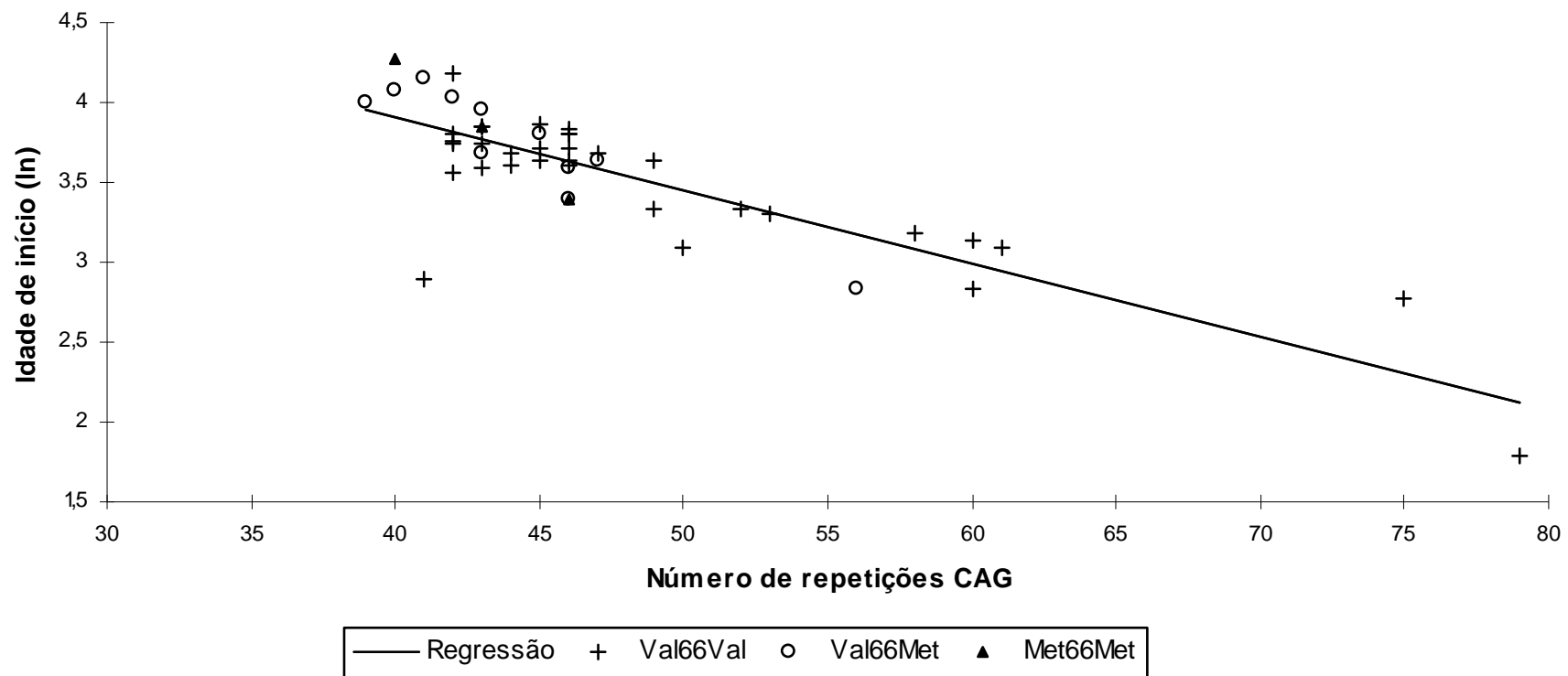
Tabela 1. Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo *Val66Met* do gene *BDNF* no grupo controle e no grupo de indivíduos com DH. As frequências relativas de cada grupo estão entre parênteses.

Grupo	n	Genótipos			Valor <i>p</i>	n	Alelos		Valor <i>p</i>
		Val/Val	Val/Met	Met/Met			Val66	Met66	
Controle	100	74 (0,740)	25 (0,250)	1 (0,010)	0,174 ^a	200	173 (0,865)	27 (0,135)	0,440 ^b
Pacientes com DH	47	33 (0,702)	11 (0,234)	3 (0,064)		94	77 (0,819)	17 (0,181)	

^a $\chi^2 = 3.501$; gl=2

^b $\chi^2 = 0.595$; gl=1

Figura 1.



ANEXO

Normas para submissão do manuscrito da revista científica “*Clinical Genetics*”.

Clinical Genetics

An International Journal of Genetics and Molecular Medicine

Edited by:

Michael R. Hayden

Print ISSN: 0009-9163

Online ISSN: 1399-0004

Frequency: Monthly

Current Volume: 71 / 2007

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2006: 51/131 (Genetics & Heredity)

Impact Factor: 3.140

Top Author Guidelines

Manuscript Central Submission

Clinical Genetics only accepts manuscripts submitted via Manuscript Central. The use of this system speeds the time to decision, improves accuracy, enables immediate distribution, and allows authors to track their own manuscripts. To access this system for submission and review, go directly to <http://clinicalgenetics.manuscriptcentral.com>. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. If you need assistance, please contact our support staff by phone at 1-434-817-204 x 167 or via e-mail at Support@Scholarone.com. If your manuscript has been submitted elsewhere, please inform us of this and include all prior reviews. This will help to shorten the review time.

Aim and Scope

This journal will fill the niche of linking the lab to the medical clinic. It emphasizes research related to novel advances in medical genetics and the translation of these advances for the practising geneticist. The journal focuses on understanding how changes in specific genes may result in an altered phenotype, and how knowledge of these changes may result in new approaches to therapy. Specific clinical descriptions that add to the present body of knowledge are also considered. In addition, the social, ethical, and psychological aspects of human genetics will be covered.

Editorial Policy

Clinical Genetics aims to become a leading journal in the field by keeping the reader up-to-date on the latest developments in current literature, providing on-line access and publishing research of the highest quality.

Rapid Response Time

The Editorial Board has been expanded to include several new members (see cover page), all of whom are dedicated to a rapid response to authors and the rapid publication of manuscripts. Accepted manuscripts are normally published within 12 weeks after critical review and acceptance.

Original Articles

Original articles feature novel findings and developments. Manuscripts can be up to 3,000 words in length and can include up to seven figures. Contributions intended for publication as an Original Article should be so labelled.

Short Reports

Short Reports are generally 1,250 to 2,000 words in length and can include up to three figures. Special efforts are made to ensure the rapid publication of Short Reports. Contributions intended for publication as a Short Report should be so labelled.

Letters to the Editor

Letters focus on new findings or respond to prior articles. Letters should not exceed 600 words, and can include one table and one figure. Contributions intended for publication as a letter should be so labelled.

Correspondence

This section consists of readers' correspondence regarding any article published in *Clinical Genetics*. The authors of the article in question will usually be invited to respond to the readers' letter. Correspondence should not exceed 300 words.

Other Submissions

Special features of the journal include Mini Reviews, HotSpots, Images in Genetics and Developmental Biology.

Mini Reviews

This section highlights current developments in relevant areas of medical genetics. Authors can provide reviews of topics of particular interest. Manuscripts vary in length (anywhere from 1,250 to 5,000 words) and can include tables and colour figures. Mini Reviews are invited, but please check with the Editor-in-Chief prior to submitting.

HotSpots

This section surveys important developments in current literature. The section is usually comprised of reviews of at least three published manuscripts. HotSpots are approximately 2,250 words in length (750 words per review). Manuscripts are invited, but you may check with the Editor-in-Chief if you are interested in submitting to this new section.

Images in Genetics

Section Editor: Albert E. Chudley (e-mail: chudley@cc.umanitoba.ca).

This section is devoted to interesting images in genetics, such as unpublished phenotypes, artistic representations of genetic material as they appear in drawing or paintings, and so on. Check with the Section Editor if you have an idea for submission.

Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics

Section Editor: Roderick R. McInnes (e-mail: mcinnes@sickkids.on.ca) and Jacques Michaud (e-mail: jmichaud@justine.umontreal.ca).

This section appears every two months, and features new developments in developmental biology and their relevance for clinical genetics. Manuscripts to this section are invited. However, you may check with the Section Editors if you are interested in submitting.

Announcements

Announcements are published free of charge. Announcements must be received 8 weeks before the month of the issue in which publication is desired. Announcements may be submitted by e-mail to the Editorial office at clingen@interchg.ubc.ca for approval.

Cover Letter

Include a letter from the author who will be responsible for correspondence regarding the manuscript as well as for communications among authors regarding revisions and approval of proofs.

The letter should indicate:

- The category of manuscript being submitted (e.g. Original Article, Short Report, Letter).
- Information on related prior or concurrent submissions to other publications.
- A list of at least three referees. The list should not name current or prior collaborators.
- The direct mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author.

Title Page

The first page of the manuscript should contain, on separate lines, the title of the article and the authors' names and institutions. If the title is longer than forty letters and spaces, a short title, not exceeding that limit, will be required for use in the running head. The first page should also include the full postal address, e-mail address, and telephone and fax numbers of the author to whom communications and proofs should be sent. Please be aware that fax number and e-mail address are crucial to our rapid response process.

Sections

Papers must be clearly divided into the following sections: Abstract (not exceeding 200 words); Key Words; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; and Figures/Tables.

Key Words

Four to nine key words for indexing should be given by the author(s) together with the abstract. They should be placed in alphabetical order and, when possible, adjusted to the Medical Subject Headings of *Index Medicus*.

References

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure in the text. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted should be cited in the text as (submitted). The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles of journals should be abbreviated in accordance with the style used in *Index Medicus*/MEDLINE.

Examples:

1. Neufeld EF. Lysosomal storage diseases. *Ann Rev Biochem* 1991; 60: 257-280.
2. Crawley AC, Brown AC, Smith AB et al. Enzyme replacement therapy in a feline model of Maroteaux Lamy syndrome. *J Clin Invest* 1996; 97 (8): 1864-1873.
3. Watts WE, Gibbs DA. *Lysosomal Storage Diseases: Biochemical and Clinical Aspects*. London: Taylor and Francis, 1986.
4. Estivill X, Morral N. Evolution of cystic fibrosis alleles. In: Dodge J, Brock JDH, Widdicomb JH, eds. *Cystic Fibrosis: Current Topics*, Vol. 3. Chichester: Wiley, 1996: 141-164.

Legends

Legends should be typed consecutively on a separate page or pages at the end of the paper.

Figures

All illustrations, graphs, drawings, or photographs are referred to as figures (abbreviate as Fig./Figs.). They should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should be identified with a figure number on the back. Any lines, numbers or lettering that are to appear in the illustrations should be large enough for the necessary reduction. In general, photographs should be 1½ time the size of the final block and must be submitted as mounted glossy enlargements showing good detail and adequate contrast. It is the policy of Clinical Genetics for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from the Internet. The web address for the form is: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact Sunita Wiebe at: clingen@interchg.ubc.ca and she will be able to e-mail or FAX a form to you. Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Isabel Neo
Wiley-Blackwell
Blackwell Publishing Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road
#05-01 Parkview Square
Singapore 188778
Fax : (65) 6511 8288
E-mail : isabel.neo@sg.blackwellpublishing.com

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

Tables

The tables should be typed on sheets separate from the text. Tables must, as far as possible, be self-explanatory. They should be numbered consecutively with Arabic numerals and due regard should be paid to the proportions of the printed page. The approximate location in the text should be indicated by a circled marginal note.

Abbreviations and Symbols

Only standardized terms which have been generally accepted should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details, see *Units, Symbols, and Abbreviations. A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. (available from The Royal Society of Medicine Press, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, England). Do not use Roman numerals in the text. In decimal fractions, a full stop, and not a comma, must be used. The minus sign is shown as -.

Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. Only minor revisions are allowed without extra cost.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Offprints

Offprints can be supplied if ordered on the offprint order form which will accompany the proofs.

The Printed Version

Articles should not exceed twenty pages in print. In the journal, "received" date indicates the date of receipt of the first version; "accepted" indicates date of acceptance of the final version.

Copyright Information

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not

being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to licence exclusive copyright to Blackwell Munksgaard Publishers if and when the manuscript is accepted for publication. When the manuscript has been accepted for publication the corresponding author will receive either an [Exclusive Licence Form](#) from the Editorial office to be completed and returned on behalf of all co-authors. Although papers are subject to editing, the journal does not hold itself responsible for statements made by the contributor. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassette or in electronic databases and the like or reproduced photographically without the prior written permission of Blackwell Munksgaard.

As an alternative to the Exclusive Licence Form, authors may choose to complete an [Online Open Exclusive Licence Form](#). Online Open is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscripts to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Blackwell Synergy website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of **£1300** (equivalent to **\$2600**) to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be marked as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Blackwell Synergy service. All OnlineOpen articles will also be flagged up as such with any third parties Blackwell supply content to.

OnlineEarly

Clinical Genetics is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service. *OnlineEarly* articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Author services

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Paper

The publisher's policy is to use permanent paper from mills that operate a sustainable forestry policy, and which have been manufactured from pulp which is processed using acid-free and elementary chlorine-free practices. Furthermore, the publisher ensures that the text paper and cover board used has met acceptable environmental accreditation standards.

Disclaimer

The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.