

COMPARAÇÃO ENTRE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E CAPILAR AUTOMATIZADA NA DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS REPETIÇÕES CAG NO GENE *HTT*

Iane dos Santos da Silva*
Luciana de Andrade Agostinho**
Carmen Lúcia Antão Paiva***

RESUMO: A Doença de Huntington é uma doença genética rara, neurodegenerativa, progressiva e fatal. Possui herança autossômica dominante e é ocasionada pelo número de repetições CAG anormais no éxon 1 do gene *HTT*, localizado em 4p16.3. O teste molecular é de grande importância para confirmação do diagnóstico clínico da DH. A testagem molecular envolve amplificação da região de interesse pela técnica de PCR e posterior análise dos fragmentos gerados (amplicons). Este trabalho visa comparar duas técnicas de análise dos amplicons: a eletroforese em gel de agarose (2,5%) e a capilar automatizada na determinação do número de unidades de repetições CAG do gene *HTT*. Os resultados da eletroforese em gel de agarose mostram existir uma correlação negativa entre idade de início e repetições CAG ($r = -0,63$; $p < 0,05$). Entretanto, os resultados da eletroforese capilar mostram uma mais forte correlação negativa entre idade de início da DH e o número de repetições CAG ($r = -0,89$; $p < 0,0001$). A variação de repetições CAG entre as técnicas está entre -23 e $+48$ repetições CAG. Dos 26 indivíduos investigados, 20 tiveram o mesmo diagnóstico independente da técnica utilizada e 6 teriam diagnóstico diferente dependendo da técnica utilizada. A sensibilidade da eletroforese em gel de agarose em relação à eletroforese capilar foi de 83%. A especificidade foi de 62,5%. Tais resultados indicam que a eletroforese em gel de agarose superestima o número de repetições CAG do gene *HTT*, sendo um teste de baixa precisão para o diagnóstico da DH.

Palavras-Chave: Doença de Huntington; Repetições CAG; Eletroforese em Gel de Agarose; Eletroforese Capilar.

COMPARISON BETWEEN AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS AND AUTOMATED CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE DETECTION OF CAG REPLICATIONS IN GENE *HTT*

ABSTRACT: Huntington's disease is a rare genetic, neurodegenerative, progressive and fatal illness, with dominant autosomic inheritance. It is caused by the number of abnormal CAG replications in exon 1 of the gene *HTT* in 4p16.3. The molecular test is highly important to confirm HD's clinic diagnosis. Molecular testing involves the amplification of the region by PCR technique and later analysis of the fragments generated (amplicons). Current research compares two techniques for the analysis of amplicons: agarose gel electrophoresis (2.5%) and automated capillary electrophoresis in the determination of the number of CAG repetition units of the gene *HTT*. Results of agarose gel electrophoresis show that a negative co-relationship exists between the initial age and CAG replications ($r = -0.63$; $p < 0.05$). However, results of capillary electrophoresis show a stronger negative co-relationship between HD initial age and the number of CAG replications ($r = -0.89$; $p < 0.0001$). Variation in CAG repetitions between techniques lie between -23 and $+48$ CAG repetitions. Twenty out of the 26 individuals investigated had the same diagnosis regardless of the technique employed and six had a different diagnosis according to the technique employed. Sensitiveness of agarose gel electrophoresis was 83% when compared to capillary electrophoresis and specificity reached 62.5%. Results show that agarose gel electrophoresis overestimates the number of CAG replications of the gene *HTT*, as a low precision test for HD diagnosis.

KEYWORDS: Huntington's Disease; CAG Repetitions; Agarose Gel Electrophoresis; Capillary Electrophoresis.

* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO; email de correspondência: iane12@hotmail.com

** Biomédica; Mestre e Doutoranda em Neurologia na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

*** Doutora (Ph.D.) em Genética pela Faculty of Science da University of Liverpool e Pós-Doutora em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; Docente associada IV da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

INTRODUÇÃO

A Doença de Huntington (DH) (OMIM 143100) é uma desordem neurodegenerativa rara, progressiva, caracterizada por distúrbios motores, perdas cognitivas e distúrbios comportamentais. Na Europa a prevalência é de 5–10 casos para 100.000 pessoas. Na China e Japão, a prevalência estimada é de 0,1–0,5 para 100.000. No Brasil não existe prevalência estimada da doença (WARBY et al., 2011). Na maior parte dos casos, os sintomas surgem entre 40–50 anos e progridem durante 10–20 anos até a morte (WALLING; BALDASSARE; WESTFALL, 1998).

A DH resulta de repetições expandidas de trinucleotídeos CAG no gene *HTT* (OMIM 613004), que levam a uma expansão anormal de poliglutamina na região amino terminal da proteína Huntintina. (HÁ; FUNG, 2012). Tal mutação ocorre no éxon1 do gene que codifica a proteína denominada Huntintina (POTTER; SPECTOR; PRIOR, 2004). Alelos com menos de 26 repetições são considerados normais, repetições entre 26–35 caracterizam alelos normais mutáveis. Alelos com 36–39 repetições são considerados alelos de penetrância reduzida e repetições acima de 39 indicam alelo com penetrância completa (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993; MARGOLIS; ROSS, 2003; MYERS, 2004).

O teste molecular é de grande importância para confirmação ou não do diagnóstico clínico da DH. A testagem molecular envolve amplificação da região de interesse pela técnica de PCR e posterior análise dos fragmentos gerados (amplicons). Tal análise pode ser realizada por três diferentes técnicas: eletroforese em gel de agarose, em gel poli(acrilamida) ou eletroforese capilar automatizada (MENKSEN; KAHL, 2005; GOULART et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da eletroforese em gel de agarose (2,5%) com os da eletroforese capilar automatizada, na determinação do número de repetições CAG do gene *HTT*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 INDIVÍDUOS TESTADOS

Nesse estudo foram analisadas amostras de 26 indivíduos suspeitos de DH. Tais indivíduos foram provenientes de atendimentos no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário Gaffrée Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) e de famílias cadastradas na Associação Brasil Huntington, residentes no Estado do Rio de Janeiro e na cidade de Ervália, MG. Os indivíduos que fizeram parte do estudo assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” concordando com os termos da pesquisa. Além disso, foi preenchido um formulário com informações do indivíduo, histórico da família e os sintomas clínicos apresentados. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (03/2009) e pelo comitê da FAMINAS (100331/0003).

Os indivíduos foram selecionados segundo os critérios: quadro clínico semelhante à DH e/ou histórico familiar da doença. Aqueles sem histórico familiar que possuem o quadro característico não foram excluídos, e os indivíduos com histórico familiar e sem o quadro clínico puderam participar quando expressaram tal desejo.

2.2 COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados de 1–3 mL de sangue periférico em tubos com EDTA. A extração de DNA foi realizada com o *Kit Illustra Blood Genomic Prep Spin* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

2.3 ANÁLISE DA REGIÃO CAG

Para amplificação da região CAG pela técnica de PCR foram utilizadas condições e *primers* já descritos em estudo anterior (AGOSTINHO et al., 2012). Os *primers* utilizados foram HD1: 6 FAM 5'–TGGC–GACCCTGGAAAAGCTGAT–3'; HD3: 5'–GCGGTGGC–GGCTGTTGCTGCT–3'. As reações de PCR continham

uma média de 20ng de DNA, 10 mols de cada primer, 6,25ml de GoTaq Green Master Mix Promega (1,5mM MgCl₂ e 200 μM dNTP) e água completando um volume final de 12,5 μL. Em cada reação um tubo sem DNA foi utilizado como controle. Os ciclos de temperatura utilizados foram: 01 estágio de 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59,1°C por 1 min e 72°C por 2 min; e um estágio final de 72°C por 50 min. Os tamanhos dos alelos foram determinados a partir de eletroforese capilar utilizando o analisador genético ABI 3500 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) e a partir da eletroforese em gel de agarose (2,5%). Para análise dos dados gerados pela eletroforese capilar utilizou-se o *software GeneMapper SW V4.1* (Life Technologies, Foster City, CA, USA). A análise da eletroforese em gel de agarose foi realizada pelo *software Lab Image 1D* (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Germany).

2.4 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A eletroforese capilar foi considerada como padrão ouro para o cálculo da sensibilidade e especificidade.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calcularam-se média e desvio padrão. A correlação entre idade de início e número de repetições CAG foi realizada calculando-se o *r* de Pearson. Foram utilizados os programas Excel (Microsoft Office) e Graphpad Prism 6.

3 RESULTADOS

3.1 INDIVÍDUOS TESTADOS

Dos vinte e seis indivíduos testados, dezenove eram homens e sete eram mulheres. Nove indivíduos possuíam suspeita de transmissão de origem materna e treze de origem paterna. Três indivíduos relataram não possuir histórico clínico semelhante na família.

Um indivíduo não soube relatar a possível suspeita de transmissão ou histórico da doença na família.

A idade de início, determinada como a idade em que o indivíduo apresentou um dos possíveis sintomas iniciais (emagrecimento, episódios de sociofobia e/ou coréia) foi relatada por dezenove indivíduos suspeitos (tabela 1). Sete indivíduos relataram não apresentar (e foi observado durante as consultas que não apresentavam) qualquer sintoma clínico da doença (idade de início considerada 0 (zero)). A idade de início relatada variou entre 22 a 60 anos com média de 44,6± 9,5 anos.

Tabela 1. Indivíduos suspeitos e idade de início dos sintomas da DH

Indivíduo	Idade de início (anos)
1	50
2	0
3	50
4	22
5	48
6	32
7	50
8	0
9	60
10	40
11	60
12	35
13	0
14	0
15	0
16	0
17	35
18	50
19	39
20	0
21	41
22	55
23	52
24	40
25	48
26	41

3.2 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os alelos normais variaram de 15 a 33 repetições CAG e 5 (14.7%) dos alelos normais, possuíam 21 repetições CAG, sendo este número de repetições o mais frequente. Os expandidos variaram de 37 a 68 repetições CAG e 4 (22%) dos alelos expandidos possuíam 50 repetições CAG, sendo este número o mais frequente.

Dos 52 alelos investigados, 29 (56%) alelos eram normais, 5 (9%) normais mutáveis, 1 (2%) de penetrância reduzida e 17 (33%) de penetrância completa.

Foram detectados 18 indivíduos com alelo expandido (≥ 36 repetições CAG). (gráfico 1). A média de repetições CAG dos alelos normais foi de 22 ± 5 . Enquanto que dos alelos expandidos foi de 51 ± 8 repetições CAG.

Dos indivíduos portadores de alelos expandidos, 13 (72%) eram do sexo masculino e 5 (28%) do sexo feminino. Oito (44%) possuíam suspeita de transmissão de origem materna e oito (44%) de origem paterna; um (6%) indivíduo relatou desconhecer a origem da transmissão da doença e um (6%) indivíduo relatou não possuir histórico da doença na família.

Dos 18 indivíduos confirmados pela técnica de eletroforese em gel de agarose, 13 haviam relatado no início do estudo a idade de início da doença. A análise estatística mostrou uma correlação negativa entre idade de início da doença e número de repetições CAG (r de Pearson = $-0,63$; $p < 0,05$) (gráfico 2).

Gráfico 1. Repetições CAG por alelo de cada indivíduo detectadas pelo método de eletroforese em gel de agarose. Setas indicam os indivíduos portadores de alelo expandido.

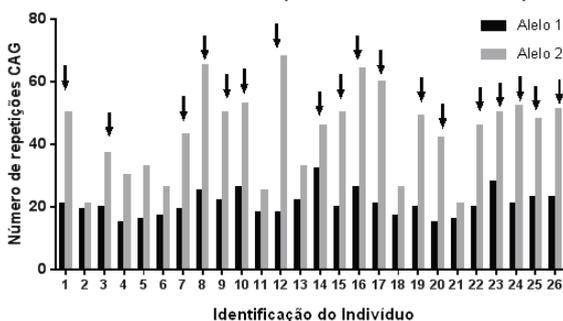
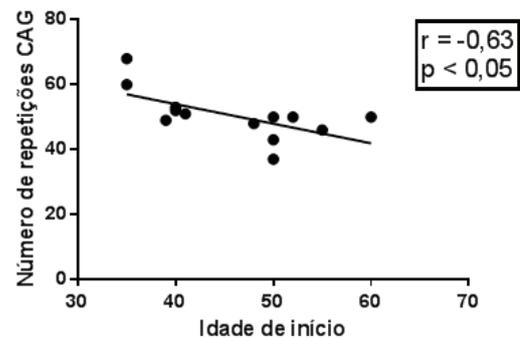


Gráfico 2. Correlação entre idade de início e número de repetições CAG (eletroforese em gel de agarose). r de Pearson = $-0,63$; $p < 0,05$.



3.3 ELETROFORESE CAPILAR

Os alelos normais variaram de 10 a 25 repetições CAG sendo que os alelos normais mais frequentes (17 dos alelos normais, 47%) possuíam 15 repetições CAG. Os expandidos variaram de 36 a 53 repetições CAG sendo que os alelos expandidos mais frequentes (4 dos alelos expandidos, 22%) apresentavam 38 repetições CAG.

Dos 52 alelos investigados, 34 (65%) alelos eram normais, 7 (14%) de penetrância reduzida e 11 (21%) de penetrância completa.

Foram detectados 18 indivíduos com alelo expandido (≥ 36 repetições CAG). (gráfico 3). A média de repetições CAG dos alelos normais foi de 17 ± 5 . Enquanto dos alelos expandidos foi de 40 ± 7 repetições CAG.

Entre os indivíduos com alelo expandido, 15 (83%) eram do sexo masculino e 3 (17%) do sexo feminino. Oito (44%) possuíam suspeita de transmissão de origem materna e nove (50%) de origem paterna; um (6%) indivíduo relatou desconhecer a origem da transmissão da doença.

Dos 18 indivíduos, detectados como portadores de alelo expandido pela técnica de eletroforese capilar, 16 haviam relatado no início do estudo a idade de início da doença. A análise estatística mostrou uma correlação negativa entre idade de início da doença e número de repetições CAG (r de Pearson = $-0,89$; $p < 0,0001$) (gráfico 4).

Gráfico 3. Repetições CAG por alelo de cada indivíduo detectadas pelo método de eletroforese em gel de agarose. Setas: indicam os indivíduos portadores de alelo expandido.

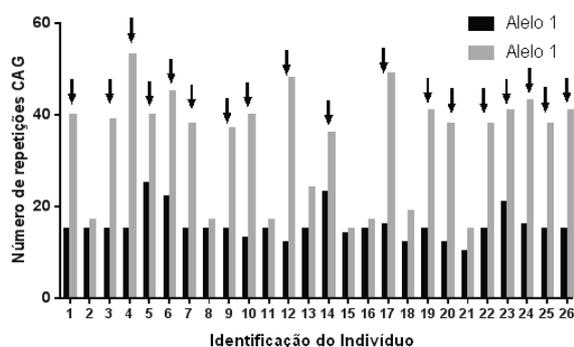
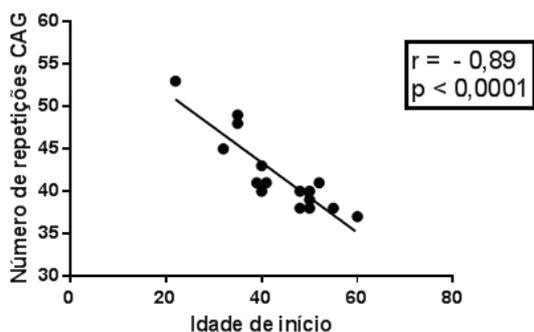


Gráfico 4. Correlação entre idade de início e número de repetições CAG (eletroforese capilar). r de Pearson = - 0,89; $p < 0,0001$.

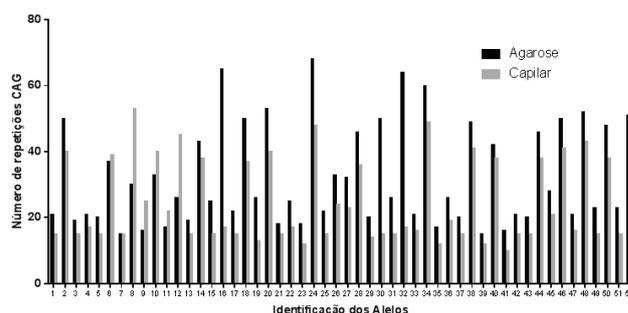


3.4 VARIAÇÃO DOS NÚMEROS DE REPETIÇÕES CAG DETERMINADOS A PARTIR DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E ELETROFORESE CAPILAR

A variação do número de repetições CAG entre as técnicas foi de -23 a +48 repetições. Na maior parte dos alelos, a eletroforese em gel de agarose forneceu o maior número de repetições CAG (gráfico 5).

Dos 26 indivíduos investigados, 20 (77%) iriam ser diagnosticados da mesma forma, independente da técnica utilizada, considerando positivo para DH indivíduo portador de pelo menos um alelo expandido (≥ 36 repetições CAG) e negativo para DH aquele portador somente de alelos normais (< 36 repetições CAG).

Gráfico 5. Comparação das repetições CAG por alelo detectado pela eletroforese em gel de agarose e eletroforese capilar.



3.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA DIAGNÓSTICO DA DH.

A sensibilidade apresentada pela eletroforese em gel de agarose foi de 83%. Enquanto a especificidade foi de 62,5% (figura 1), considerando-se como padrão os resultados da eletroforese capilar.

		Número de Indivíduos	
		Positivo	Negativo
Capilar	Positivo	18	
	Negativo		8
Agarose	Positivo	15 VP	3 FP
	Negativo	3 FN	5 VN

Figura 1. Comparação entre a eletroforese em gel de agarose e a capilar como teste diagnóstico para DH. Painel A: Classificação dos indivíduos na eletroforese capilar. Painel B: Classificação dos indivíduos na eletroforese em agarose. Legenda: VP = verdadeiro positivo. VN = verdadeiro negativo. FP = falso positivo. FN = falso negativo.

4 DISCUSSÃO

O número de repetições CAG revelados pelo teste molecular é de grande importância para o correto aconselhamento genético ao paciente e seus familiares, pois o número de repetições CAG influencia diretamente na idade de início da doença, de forma que quanto maior o número de repetições menor é a idade de início dos sintomas da doença (GUSELLA et al., 1983; THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABO-

RATIVE RESEARCH GROUP, 1993; GIL; REGO, 2008). A influência do número de repetições CAG na idade de início foi reafirmada pelos nossos resultados.

O número de repetições CAG é responsável por 70% da variação na idade de início da doença. Os outros 30% são atribuídos a outros genes modificadores ou fatores ambientais (RUBINSZTEIN et al., 1997).

Os indivíduos afetados que relatam não possuir histórico da doença na família ou desconhecem a origem da transmissão muito provavelmente tiveram falecimento do progenitor afetado antes desse iniciar a manifestação dos sintomas, que se dá geralmente entre 35–50 anos (ZUCATTO; VALENZA; CATTANEO, 2010). Outra possibilidade, quando não existe histórico familiar da doença, de baixa incidência na população é o surgimento de mutação *de novo* que não é herdada de nenhum dos progenitores. Na DH, mutações *de novo* estão associadas com a possível transmissão de alelos expandidos à prole a partir de um alelo normal mutável (27–35 repetições CAG), geralmente, a partir do progenitor masculino (HENDRICKS et al., 2009).

Não existem casos descritos de ausência de sintomas em indivíduos com mais de 40 repetições CAG, assim indivíduos portadores de alelos com penetrância completa possuem 100% de chance de desenvolverem a doença (POTTER et al., 2004). Apesar disso, em nossos resultados, cinco indivíduos portadores de alelos de penetrância completa, dois com mais de sessenta repetições, segundo eletroforese em gel de agarose, ainda não apresentavam sintomas.

Alguns indivíduos com alelos de penetrância reduzida não desenvolvem a DH (POTTER et al., 2004), mas pacientes com alelo de penetrância reduzida tem maior chance de desenvolver a doença caso seu ancestral afetado tenha desenvolvido (MAAT–KIEVIT et al., 2001). Um estudo realizado estima 60% de chance de desenvolver os sintomas quando o indivíduo apresenta 39 repetições CAG, caindo para 14% com 36 repetições (QUARREL; RIGBY; BARRON, 2007). Nesta investigação utilizando-se eletroforese capilar, dois indivíduos apresentaram alelos de penetrância reduzida, mas ainda não tinham apresentado sintomas.

Atualmente, um estudo revelou que indivíduos portadores de alelos normais mutáveis (27–35 repetições CAG) apresentam significantes anormalidades comportamentais (como depressão, apatia, irritabilidade, ansiedade, obsessão), mas funções motoras e cognitivas normais (KILLORAN et al., 2013). Caso tais informações se confirmem por meio de outros estudos, todo aconselhamento genético de indivíduos portadores de alelos normais mutáveis deve ser repensado.

Um estudo de investigação da DH na população brasileira encontrou uma variação 14 a 30 repetições CAG (média=18) em alelos normais e uma variação de 39 a 88 repetições CAG (média=46,7) para os alelos expandidos (RASKIN et al., 2000). No presente estudo, a eletroforese em gel de agarose mostrou uma variação de 15 a 33 repetições (média = 22) para os alelos normais e uma variação de 37 a 68 repetições CAG (média = 51) para os alelos expandidos. A eletroforese capilar mostrou uma variação de 10 a 25 repetições (média = 17) para os alelos normais e uma variação de 36 a 53 repetições CAG (média = 40) para os alelos expandidos.

Indivíduos que apresentam sintomas motores, cognitivos e psicológicos semelhantes à DH, mas são diagnosticados como portadores de alelos normais devem submeter-se a outros testes moleculares diferenciais para verificação da possível ocorrência de doenças *Huntington Like* (SCHNEIDER; WALKER; BHATTIA, 2007).

A precisão de um teste diagnóstico depende de sua sensibilidade e sua especificidade. Quanto maior a sensibilidade (próximo de 100%) de um teste, maior a chance de detectar a doença e quanto maior a especificidade de um teste, maior a chance de que pessoas sem a doença sejam excluídas pelo teste (MENEZES; SANTOS, 1999). A análise dos fragmentos em sequenciador automático de DNA é mais precisa em comparação aos géis de agarose ou poliacrilamida (GUPTA et al., 2010 apud GOULART et al., 2011). Em nossos resultados, a eletroforese em gel de agarose, na grande maioria dos alelos, nos forneceu um número maior de repetições CAG. Além disso, a sensibilidade

e a especificidade da eletroforese em gel de agarose como teste diagnóstico foi de 83% e 62,5%, respectivamente, em relação à eletroforese capilar. Tais valores indicam baixa precisão da eletroforese em gel de agarose como teste diagnóstico para DH.

A precisão dos sequenciadores que realizam eletroforese capilar automatizada pode ser explicada pela alta sensibilidade na detecção da fluorescência, identificando de forma mais eficiente os *amplicons*, possibilitando assim a distinção de *stutters* e pico principal. Os picos *stutters* são artefatos que podem aparecer nos eletroferogramas como grupos de picos, espaçados entre si por no máximo 4 pb, resultado do escorregamento (*slippage*) da Taq polimerase durante o processo de amplificação do DNA por PCR, principalmente em regiões polimórficas de repetições de nucleotídeos *in tandem*. As bandas *stutters* são menores que os picos principais, e normalmente se encontram à esquerda deles (OVERSON, 2009). O arraste observado na eletroforese em gel de agarose de repetições de trinucleotídeos pode dificultar a discriminação dos alelos, podendo haver visualização de um fragmento inespecífico, o que pode explicar variações muito grandes entre as técnicas e também a baixa precisão da eletroforese em gel de agarose no diagnóstico da DH.

Concluindo, tais resultados indicam que a eletroforese em gel de agarose superestima o número de repetições CAG do gene *HTT*, sendo um teste de baixa precisão para o diagnóstico da DH.

5 AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao suporte financeiro da CAPES/PROAP, FAPERJ e CNPq. Agradecemos o apoio do PPGNEURO/UNIRIO, PPGGBM/UNIRIO, FAMINAS–Muriaé, Associação Brasil Huntington (ABH), Departamento de Genética e Biologia Molecular (UNIRIO). Agradecemos também o encaminhamento dos pacientes pela Prof.Dr^a. Suely Rodrigues. Finalmente, agradecemos aos pacientes e familiares afetados pela DH.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO et al. Haplotype analysis of the CAG and CCG repeats in 21 Brazilian families with Huntington's disease. **Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 796–803, 2012.
- GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2803–2820, 2008.
- GOULART, I. C. G. R.; MEROTTO J. A.; NUNES, A. L.; BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1175–1181, 2011.
- GUSELLA, J. F.; WEXLER, N. S.; CONNEALLY, P. M.; NAYLOR, S. L.; ANDERSON, M.A.; TANZI, R. E.; WATKINS, P. C.; OTTINA, K.; WALLACE, M. R.; SAKAGUCHI, A. Y. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, v. 306, p. 234–238, 1983.
- HENDRICKS, A. E.; LATOURELLE, J. C.; LUNETTA, K. L.; CUPPLES, L. A.; WHEELER, V.; MACDONALD, M. E.; GUSELLA, J. F.; MYERS, R. H. Estimating the Probability of de novo HD cases from Transmissions of Expanded Penetrant CAG Alleles in the Huntington Disease Gene from Male Carriers of High Normal Alleles (27–35 CAG). **American Journal of medical genetics**. v. 149A, p. 1375–1381, 2009.
- KILLORAN, A.; BIGLAN, K.M.; JANKOVIC, J.; EBERLY, S.; KAYSON, E.; OAKES, D.; YOUNG, A.B.; SHOULSON, I. Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. **Neurology**, v. 80, p. 2022–2027, 2013.
- MAAT–KIEVIT, A.; LOSEKOOT, M.; DEN BERG, H. V. D. B.V.; VAN OMMEN, G.J.; NIERMEIJER, M.; BREUNING, M.; TIBBEN, A. New problems in testing for Huntington's disease: the issue of intermediate and reduced penetrance alleles. **Journal of medical genetics**. v. 38, Electronic Letter, 2001.

- MARGOLIS, R. L.; ROSS, C. A. Diagnosis of Huntington Disease. **Clinical Chemistry**, v. 49, p. 1726–1732, 2003.
- MENEZES, A. M. B., SANTOS, I. S. Curso de epidemiologia básica para pneumologistas. 4ª parte: epidemiologia clínica. **Jornal de Pneumologia** [online], v. 25, n. 6, p. 321–326, 1999.
- MENKSEN, K.; KAHL, G. **Handbook of plant genome mapping**. Alemanha (Weinheim): Wiley, 2005. v.1, 403p.
- MYERS, R. H. Huntington's Disease Genetics. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 1, p. 255–262, 2004.
- OVERSON, T. L. **System and method for the deconvolution of mixed dna profiles using a proportionately shared allele approach**. United States Army Medical Research And Material Command Mcmrzaj, Fort Detrick, MD, US, 2009. p. 2–4
- POTTER, N. T.; SPECTOR, E. B.; PRIOR, T. W. Technical Standards and Guidelines for Huntington Disease Testing. **Genetics in Medicine**, v. 6, p. 61–65, 2004.
- QUARRELL, O. W.; RIGBY, A. S.; BARRON, L. et al. Reduced penetrance alleles for Huntington's disease: a multi-centre direct observational study. **Journal of medical genetics**, v. 44, n. 68, 2007.
- RASKIN, S.; ALLAN, N.; TEIVE, H. A. G.; CARDOSO, F.; HADDAD, M.S.; LEVI, G.; BOY, R. Jr J. L.; SOTOMAIOR, V. S.; JANZEN-DÜCK, M.; JARDIM, L. B.; FELLANDER, F. R.; ANDRADE, L. A. F. Huntington disease: Dna analysis in brazilian population. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 977–985, 2000.
- RUBINSZTEIN, D.C.; LEGGO, J.; CHIANO, M.; DODGE, A.; NORBURY, G.; ROSSER, E.; CRAUFURD, D. **Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.94, p.3872–3876, 1997.
- SCHNEIDER, S. A.; WALKER R. H.; BHATIA K. P. The Huntington's disease-like syndromes: what to consider in patients with a negative Huntington's disease gene test. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 3, p. 517–25, 2007.
- THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. **Cell**, v. 72, p. 971–983, 1993.
- WALLING, W. H.; BALDASSARE, J. J.; WESTFALL, T. C. Molecular Aspects of Huntington's Disease. **Journal of Neuroscience Research**, v.54, p. 301–308, 1998.
- WARBY, S. C.; VISSCHER, H.; COLLINS, J. A.; DOTY, C. N.; CARTER, C.; BUTLAND, S. L.; HAYDEN, A. R.; KANAZAWA, I.; ROSS, C. J.; HAYDEN, M. R. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, p. 561–566, 2011.
- ZUCATTO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 905–981, 2010.

Recebido em: 07 de novembro de 2013

Aceito em: 25 de novembro de 2013