

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento**

**Frequência mutacional do gene GJB1 (Cx32) na população  
brasileira da doença de Charcot-Marie-Tooth.**

*Fulviana Silva Nishiyama*

Ribeirão Preto

2011

**Fulviana Silva Nishiyama**

**Frequência mutacional do gene GJB1 (Cx32) na população  
brasileira da doença de Charcot-Marie-Tooth.**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Médicas

Área de concentração: Neurologia

Sub-área: Neurociências e Ciências do Comportamento

Orientador: Professor Doutor Wilson Marques Júnior

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Nishiyama, Fulviana Silva

Frequência mutacional do gene GJB1 (Cx32) na população brasileira da doença de Charcot-Marie-Tooth./ Fulviana Silva Nishiyama; orientador Wilson Marques Júnior, - Ribeirão Preto, 2011.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Neurologia, Sub-área: Neurociências e Ciências do Comportamento) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Doença de Charcot-Marie-Tooth
2. Cx32 (GJB1)
3. Sequenciamento

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fulviana Silva Nishiyama

Frequencia Mutacional do gene GJB1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurologia

Aprovado em:

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Instituição: Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP/HC – USP, Ribeirão Preto/SP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira

Instituição: Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP/HC – USP, Ribeirão Preto/SP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Doutor João Aris Kouyoumdjian

Instituição: Departamento de Ciências Neurológicas da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto/SP

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Santa Rita de Cássia pela oportunidade de aprender e por ter me tornado melhor profissional e principalmente uma pessoa melhor.

Agradeço aos integrantes da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira e ao Prof. Dr. João Aris Kouyoumdjian pela colaboração na elaboração desta dissertação, cujas sugestões foram cruciais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço de modo especial a todos os integrantes do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação:

À técnica do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental Sandra Marques pelas orientações não somente quanto à rotina experimental do laboratório e a construção do trabalho, mas também pelos conselhos e apoio pessoal que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À especialista de laboratório Dra. Silvia Andriao Scarso pelo carinho e dedicação.

Ao engenheiro Renato Meirelles pelo auxílio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas amigas do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Msc. Maria Cristina Schiavoni, Aracy Edwirges Vieira da Silva Dias, Giuliana, Thaissa, Daiana, Vilma Aparecida Pessini Campanini, Silvia Leonardo dos Santos e Silvana Loturco, por serem pessoas especiais e por tornarem o ambiente de trabalho um local agradável e feliz.

Às amigas pós-graduandas Cláudia Sares, Vivian Cintra e Carina Spedo por acompanhar todos os meus passos durante esta jornada árdua, mas gratificante, pelo apoio e dedicação.

Aos pacientes que depositam suas vidas para a realização de estudos como este e que nos permitem estudar e aprimorar nossos conhecimentos em busca de melhor qualidade de vida.

Agradeço pelo apoio financeiro aos órgãos: FAPESP, CNPQ, CAPES e FAEPA.

Agradeço a todos os familiares e amigos que compreenderam minha ausência durante estes anos de dedicação a este trabalho.

Em especial às minhas primas

Ana Silvia Gouvea Lima Yamada e Silmara Paula Gouvea de Marco

Que sempre estiveram a meu lado nas decisões profissionais de minha vida, pelas orientações e conselhos, pelo amor e dedicação sem limites.

Às minha amigas:

Keity Cristina Bueno, Thais Rissardi Cerquetane, Tatiana Cardoso e Maria Eloisa B. J. M. Frateschi

“A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades.”

Abraham Lincoln

Aos meus pais Antonio e Isabel

Agradeço pela vida, por guiarem meus passos e simplesmente por me Amar.

À minha irmã Carine

Obrigada pelo apoio, obrigada por sempre estar ao meu lado e principalmente obrigada por ser minha irmã.

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

*Fernando Pessoa*

Minha gratidão ao meu orientador

Prof. Dr. Wilson Marques Júnior

Pela pessoa humana, simples e humilde

Por me ensinar a ser mais humana e acreditar que todos os nossos esforços não são em vão.

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”

*Albert Einstein*



Dedico esta dissertação a meu marido Marcelo

Pelo amor e compreensão.

Pela paciência e dedicação.

Por estar sempre ao meu lado e por não ter permitido que eu desistisse.

Pelo amor que me dá forças para continuar a viver e a buscar sempre mais.

Agradecerei-te sempre, pois a conclusão desta dissertação só é possível graças a você.

"Toda forma de saber nasce de um não saber".

Padre Fabio de Melo

***RESUMO***

A doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) é uma desordem hereditária do sistema nervoso periférico, caracterizada por fraqueza dos membros inferiores, atrofia muscular e perda sensitiva, sendo que as principais alterações clínicas são fraqueza e atrofia progressiva de músculos distais, iniciando nas extremidades inferiores e estendendo até as superiores, com deformidades nos pés (pé cavo), caracterizando marcha com passo arrastado e sucessivas quedas, perda sensitiva distal, diminuição ou ausência dos reflexos tendinosos, além de diminuição da força e destreza das extremidades superiores. CMTX é uma doença autossômica dominante ligada ao cromossomo X a qual corresponde aproximadamente 10% das famílias com CMT, sendo a segunda causa mais frequente da doença, após a duplicação 17p11.2-p12. Neste estudo analisamos 66 pacientes com CMT, negativos para duplicação 17p, em que foram identificadas seis mutações, embora três destas não foram descritas. Desta maneira confirmou uma frequência de mutações em torno de 9% no gene da Cx32. Portanto, nesta pesquisa do gene da Cx32 com CMT demonstrou que a população brasileira teve um comportamento mutacional semelhante ao das demais populações estudadas.

# ***ABSTRACT***

The Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is an inherited disorder of the peripheral nervous system characterized by weakness of the lower limbs, muscular atrophy and sensitivity loss, furthermore the main clinical changes are the weakness and atrophy progressive of distal muscles, starting from lower to upper extremities, with deformities in feet (pes cavus), characterizing shuffled gait and successive falls, sensitivity loss distal, decreased or absent tendon reflexes, besides strength and dexterity decrease of upper extremities. CMTX is a disease autosomal dominant linked to chromosome X, corresponds to almost 10% of the group with CMT, which is the second common cause of this disease after duplication 17p11.2-p12. In this study analyzed 66 patients with CMT, all of them were negatives for duplication 17p, we identified six mutations, although three were not described. Thus, confirming the mutations frequency in about 9% in the Cx32 gene. Therefore, this research of the Cx32 gene with CMT shows that Brazilian population has a similar mutational behavior of the other population studies.

# SUMÁRIO

---

<b>Introdução</b> .....	<b>Página 1</b>
Formas desmielinizantes de herança autossômica dominante (CMY1) .....	Página 5
Charcot-Marie-Tooth 1A .....	Página 7
Charcot-Marie-Tooth 1B .....	Página 8
CMT ligado ao X .....	Página 9
CMT2: Neuropatias axonais autossômicas dominantes .....	Página 11
CMT4: CMT Autossômica recessiva (ARCMT) .....	Página 11
CMT Intermediária .....	Página 12
Investigação molecular da doença de Charcot-Marie-Tooth .....	Página 12
<b>Objetivos</b> .....	<b>Página 15</b>
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>Página 16</b>
Obtenção das amostras .....	Página 16
Seleção dos Primers .....	Página 18
Reação em cadeia da Polimerase (PCR) .....	Página 19
Cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência (DHPLC) .....	Página 19
Reação de Sequenciamento .....	Página 20
Precipitação e purificação da reação de sequenciamento .....	Página 21
Considerações éticas .....	Página 21
<b>Resultados</b> .....	<b>Página 22</b>
Detecção de mutações por DHPLC .....	Página 22
Análise e identificação de mutações por sequenciamento direto .....	Página 23
Frequência mutacional do gene GJB1 (Cx32) na população brasileira com a doença de CMT1 negativos para duplicação 17p .....	Página 26
<b>Discussão</b> .....	<b>Página 27</b>
Métodos diagnósticos .....	Página 29
Mutações no gene Cx32 na população brasileira estudada .....	Página 31
Frequência de mutações da Cx32 na população brasileira estudada .....	Página 34
<b>Conclusão</b> .....	<b>Página 36</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>Página 37</b>
<b>Anexos</b>	

## LISTA DE TABELA E FIGURAS

---

Tabela 1 .....	Página 3
Tabela 2 .....	Página 22
Tabela 3 .....	Página 33



## LISTA DE TABELA E FIGURAS

---

Figura 1.....	Página 11
Figura 2.....	Página 23

# ***INTRODUÇÃO***

# INTRODUÇÃO

---

Descrita originalmente como atrofia muscular peroneira por Jean Martin Charcot e Pierre Marie na França em 1886 e por Howard Henry Tooth na Inglaterra no mesmo ano (SHY e col., 2005) a doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) também conhecida como neuropatia sensitivo-motora hereditária (NSMH) (SHY e col., 2005) é uma desordem hereditária do sistema nervoso periférico, caracterizada por fraqueza e atrofia muscular dos membros inferiores, associada a perda sensitiva de predomínio distal (REILLY e col., 2000). Trata-se de uma doença que se apresenta de modo geral como forma lenta e progressiva, que compromete inicialmente as regiões distais dos membros inferiores, progredindo para as regiões proximais dos membros inferiores e para as regiões distais dos membros superiores, causando tanto atrofia e fraqueza muscular como também perda sensitiva e diminuição ou ausência dos reflexos profundos. Alterações ósseas tais como pés cavos, dedos em martelo e escoliose são frequentes (HARDING E THOMAS, 1980).

Apresenta-se como um grupo de doenças clinica e geneticamente heterogêneas, acometendo adultos e crianças, geralmente causando incapacidade de maneira lenta, no entanto progressiva e significativa, tendo prevalência estimada de um para cada 2.500 habitantes, atualmente considerada a mais frequente das desordens neuromusculares hereditárias (SKRE, 1974).

O diagnóstico da CMT é baseado nos aspectos clínicos, na história familiar, nos achados eletrofisiológicos, nos achados da biópsia de nervo e, mais recentemente, no diagnóstico familiar (REILLY e col., 2000).

Dyck and Lambert (1968a,b) avaliaram um grande número de pacientes com atrofia muscular peroneal e os dividiram em dois grandes grupos, um que apresentava diminuição na velocidade de condução nervosa (VCN) e a biópsia de nervo mostrava neuropatia desmielinizante crônica e outro que apresentava velocidade de condução normal e lesão axonal na biópsia de nervo. Estes autores subdividiram o grupo desmielinizante em dois

# INTRODUÇÃO

---

subgrupos, a doença de Charcot-Marie-Tooth, de herança autossômica dominante e síndrome de Dejerine-Sottas (SDS), de suposta herança autossômica recessiva. Já o grupo axonal foi sub-dividido em três grupos: um com comprometimento sensitivo, a forma axonal de CMT; outro sem comprometimento sensitivo, denominado atrofia muscular espinal progressiva do tipo CMT e um terceiro associado a paraplegia espástica (DYCK & LAMBERT, 1968b; CLARAMUNT e col., 2005).

A CMT é causada por mutações em genes que codificam proteínas com diferentes localizações, incluindo a parte compacta e não compacta da mielina, células de Schwann e axônios, que estão envolvidas em diferentes funções celulares, desde a compactação e manutenção da mielina, até a formação do citoesqueleto, transporte axonal e metabolismo axonal (BARISIC e col., 2007; SZIGETI & LUPSKI, 2009). Independentemente da função comprometida, as principais manifestações o caminho final comum é a degeneração dos axônios, que na maioria dos casos envolve principalmente fibras longas e grossas (PAREYSON e col., 2006). A caracterização de uma neuropatia como sendo axonal ou desmielinizante é feita essencialmente pelo estudo da condução dos nervos periféricos. Eventualmente biópsia de nervo pode ser necessária (REILLY, 2000).

Com a descoberta dos genes responsáveis pela CMT, tornou-se evidente que genes diferentes poderiam produzir o mesmo fenótipo (heterogeneidade genotípica) e que diferentes fenótipos poderiam resultar de mutações em um mesmo gene (heterogeneidade fenotípica) (BIRD e col., 2000).

A heterogeneidade genética da CMT não é só caracterizada por seu grande número de genes e loci descritos, mas também pelos seus diversos tipos de herança genética, sendo que na maioria dos países a mais frequente é a herança autossômica dominante, no entanto são também encontradas a autossômica recessiva e a ligada ao X (SHY e col., 2002; SAIFI e col., 2003).

# INTRODUÇÃO

São conhecidos hoje pelo menos 30 diferentes genes e 50 locis (tabela 1) ([www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations)), prevendo-se que o número final de genes será entre 50 a 100.

**Tabela 1.** Classificação da CMT

	<i>Locus</i>	
CMT1		
(autossômica dominante, desmielinizante)		
CMT1A	17p11.2 - 12	PMP22
CMT1B	1q22 - 23	MPZ/P0
CMT1C	16p13.1 – 12.3	LITAF
CMT1D	10q21 - 22	EGR2
CMT1F	8p21	NFL
Síndrome de Dejerine-Sottas A	17p11.2 – p12	PMP22
Síndrome de Dejerine-Sottas B	1q22 – 23	MPZ
Síndrome de Dejerine-Sottas C	8q23 – 24	
Síndrome de Dejerine-Sottas	19q13.1 – 13.2	
Síndrome de Dejerine-Sottas	10q21 – 22	EGR2
HNPP	17p11.2 - 12	PMP22
CMT2		
(autossômica dominante, axonal)		
CMT2A1	1p35 - 36	KIF1B
CMT2A2	1p35 - 36	MNF2
CMT2B	3q13 – 22	RAB7
CMT2C	12q23 – 24	
CMT2D	7p14	GARS
CMT2E (CMT1F)	8p21	NFL
CMT2F	7q11 – 21	HSP27

# INTRODUÇÃO

CMT2I	1q22	MPZ
CMT2P	3q13.1	
CMT4 (autossômica recessiva, desmielinizante)		
CMT4A	8q13 – 21.1	GDAP1
CMT4B1	11q22	MTMR2
CMT4B2	11p15	SBF2
CMT4C	5q32 – 33	KIAA1985
CMT4D	8q24.3	NDRG1
CMT4E	10q21 – 22	EGR2
CMT4F	19q	PRX
CMT2-AR (autossômica recessiva, axonal)		
CMT2-AR	1q21	Lamin A/C
CMT2-AR	19q13	
CMTX (ligado ao X)		
CMTX1	Xq13.1	GJB1
CMTX2	Xp22.2	
CMTX3	Xq26	
CMTI (CMT intermediário)		
CMTI	19q12	DNM2
CMTI	1p34	MPZ
CMTI	1q22	
CMTI	10q24	
CMT Neuronal / Amiotrofia espinhal distal		
Tipo 2	12q24.3	HSP22
Tipo 2	7q11 - 22	HSP27

## INTRODUÇÃO

---

Tipo 5	7p15	GARS
Tipo 5	11q12-14	BSCL2
Tipo 6	11q13.2 – 13.4	SMARD1
Tipo 7	2q14	
Tipo 7	2p13	DCTN1

### *Formas desmielinizantes de herança autossômica dominante (CMT1)*

A forma de CMT mais frequente é a CMT1. Caracterizada eletrofisiologicamente por apresentar velocidade de condução do nervo mediano (MCV) abaixo de 38m/s (HARDING E THOMAS, 1980). Os indivíduos com CMT1 tornam-se, de modo geral, sintomáticos entre o nascimento e 3a década de vida (MARQUES e col., 2005; HOULDEN & REILLY 2006), embora ocorra diversidade dos limites de idade quanto às primeiras manifestações clínicas características da CMT (THOMAS e col., 1997; MARQUES e col., 2005). A intensidade das manifestações clínicas também é muito ampla, podendo o quadro ser suave ou até resultar em considerável incapacidade e fraqueza muscular, restringindo o paciente a uma cadeira de rodas ou mesmo causando insuficiência respiratória (THOMAS e col., 1997; MARQUES e col., 2005; SHY e col., 2005).

Dentro do abrangente espectro de manifestações clínicas, identificam-se três formas razoavelmente bem definidas. As manifestações “clássicas” ou “típicas” de CMT1 apresentam, de modo geral, intensidade de leve a moderada, em contrapartida a Síndrome de Dejerine – Sottas (SDS) de início precoce e manifestações clínicas mais intensas. A Neuropatia Congênita Hipomielinizante (CHN) tem início neonatal e características clínicas mais graves.

A forma “clássica” é caracterizada clinicamente por atrofia e fraqueza muscular progressivas, perda sensitiva de predomínio distal, redução dos reflexos profundos e um

## INTRODUÇÃO

---

número variável de anormalidades esqueléticas, predominando o pé cavo (THOMAS e col., 1997; SHY e col., 2005; PAREYSON e col., 2006). Os sinais clínicos têm início em regiões distais e progridem, com a evolução da doença, para regiões proximais. A biópsia do nervo sural revela a presença de bulbos de cebola clássicos, cujo aparecimento é atribuído a repetidos episódios de “desmielinização” e “remielinização”. Por ser uma polineuropatia hipertrófica grave e de início precoce, a SDS gera redução mais acentuada da velocidade de condução nervosa e a biópsia de nervo apresenta hipomielinização severa associada a uma neuropatia hipertrófica intensa. Já a CHN tem início ao nascimento e o quadro clínico é definido como síndrome da criança hipotônica, com sinais de dificuldade respiratória e de deglutição (SHY e col., 2005), porém com frequência rara na população. A velocidade de condução nervosa é muito baixa e a biópsia de nervo mostra acentuada redução ou até mesmo ausência de mielina. A forma clássica de CMT1, a SDS e a CHN não são atualmente consideradas entidades distintas, mas sim como variantes de uma mesma condição, a CMT1, uma vez que mutações nos mesmos genes podem ser responsáveis pelos três fenótipos.

Embora todos os fenótipos das síndromes clínicas descritas acima sejam caracterizados por graus variados de desmielinização, sabe-se hoje que as manifestações mais relevantes, tais como a fraqueza muscular, estão associadas não ao grau de desmielinização, mas à intensidade da perda axonal (KRAJEWSKI e col., 2000).

Os subtipos mais frequentes de CMT1 são CMT1A e CMT1B.



# INTRODUÇÃO

---

## *Charcot-Marie-Tooth 1A*

Trata-se de uma neuropatia autossômica dominante, sendo responsável por aproximadamente 80% das neuropatias hereditárias motoras e sensitivas desmielinizantes (BORT e col., 1997). Apresenta quadro clínico clássico da CMT, com velocidade de condução nervosa reduzida e evidência morfológica de comprometimento das células de Schwann. O gene da proteína da mielina periférica de 22 kDa (PMP22) é o responsável pela CMT1A e está situado no locus 17p11.2-p12, que codifica a proteína do mesmo nome, localizada na porção compacta da mielina, constituindo cerca de 2% a 5% das proteínas da mielina periférica (SNIPES e col., 1995). Dois mecanismos de mutação resultam em CMT1A: duplicação da região 17p11-2 (Lupski e col., 1991), presente na maioria dos casos (NELIS e col., 1996; MARQUES W.Jr., 2005) e mutações de ponto do gene PMP22 (LUPSKI e col., 1991; RAEMARKERS e col., 1991; VALENTJIM e col., 1992). Eventos recíprocos durante a meiose, a duplicação e a deleção da região 17p11.2, geram uma célula germinativa com a deleção e outra com a duplicação.

Junto com a cópia única recebida do progenitor normal, a criança afetada receberá duas cópias do progenitor portador da mutação, resultando em três cópias do gene (CMT1A duplicado). A criança que receberá o cromossomo deletado apresentará apenas uma cópia do gene PMP22, desenvolvendo a neuropatia hereditária com suscetibilidade à pressão (HNPP).

O fenômeno da duplicação/deleção ocorre devido um crossing over desigual durante a meiose na formação dos gametas, causado por um desalinhamento de duas regiões altamente homólogas, mas não idênticas – sequências repetitivas CMT1A distal e proximal (CMT1A - REPs) (PENTAO e col., 1992). Descrita em populações de diversos países, a duplicação do cromossomo 17 (SZIGETI e col., 2006) deve ser sempre testada nos casos desmielinizantes.

## INTRODUÇÃO

---

As mutações de ponto no gene PMP22 ocorrem em menor frequência que a duplicação 17p11.2, cerca de 5% dos casos de CMT1, tendo sido descritas 69 mutações até o momento. Podem causar CMT1, SDS e CHN (DYCK & KLEIN, 2005, MARQUES e col., 1998). A maioria dos casos de SDS resulta de mutações de ponto, em geral de mutação de novo autossômica dominante, dos genes PMP22 e P0, simulando herança recessiva, uma vez que esses pacientes, devido à gravidade do quadro (BENSTEAD e col., 1990; REILLY, 1998), não chegam a constituir família.

### ***Charcot-Marie-Tooth 1B***

A CMT1B se apresenta também como uma forma autossômica dominante, sendo menos frequente do que a CMT1A, mas compartilhando aspectos clínicos muito semelhantes. Representa de 5% a 10% dos casos de CMT1, com 126 diferentes mutações descritas neste gene até o momento ([www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations)). O gene envolvido é denominado como proteína zero da mielina (MPZ ou P0) e a proteína resultante é responsável por cerca de 50% das proteínas constituintes da mielina do sistema nervoso periférico (SNIPES e col., 1995). A maioria das mutações no MPZ resulta em CMT1, SDS ou CHN (DE JONGHE e col., 1997; SHY e col., 2005), mas também podem ocasionar neuropatias axonais (MARROSU e col., 1998), fato este que diferencia a variedade de fenótipos associados às mutações em MPZ, que é mais amplo do que o observado em mutações no gene PMP22 (HOULDEN & REILLY, 2006). Estas mutações são geralmente autossômicas-dominantes e mutações de novo ocorrem com certa frequência (FABRIZI e col., 2001).

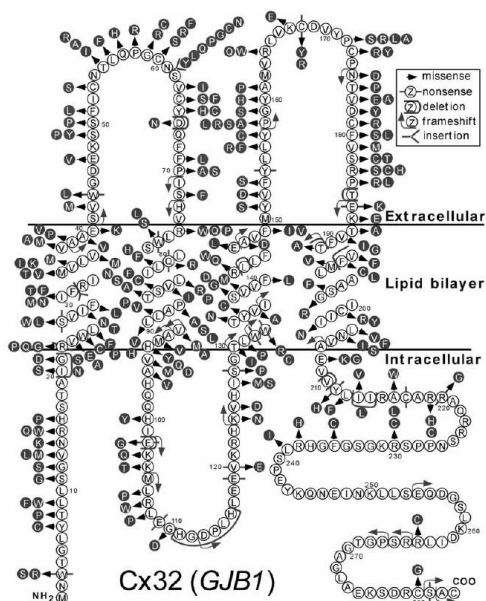
# INTRODUÇÃO

---

## *CMT ligada ao X*

CMTX é uma doença com herança ligada ao cromossomo X e responde por aproximadamente 10% das famílias com CMT, sendo a segunda causa mais frequente da doença, após a duplicação 17p11.2-p12 (IONASESCU e col., 1993). O gene responsável por sua manifestação é GJB1 localizado no cromossomo X, que promove a produção da proteína Cx32 (figura 1) integrante da membrana localizada no intervalo juncional. As junções são canais da membrana celular encontradas em muitos tecidos, geralmente em células adjacentes, mas, como no caso da bainha de mielina, também entre camadas diferentes da mesma célula (BRUZZONE e col., 1996; WHITE & PAUL, 1999). Estão envolvidas em várias atividades da célula, tais como condução elétrica, cooperação metabólica, controle de crescimento, diferenciação celular. Estes canais são compostos por dois hemicanais (ou conexons), sendo que cada conexon é composto de um hexâmero de moléculas de conexina organizado ao redor de um poro central. Seu diâmetro é de 1.2 nm, pequeno demais para permitir a transferência de proteínas e ácidos nucleicos, mas suficientemente grande para permitir a difusão de íons e outras moléculas pequenas (< 1000 Da) (KLEOPA & SCHERER, 2006). Os conexons apresentam função de conectar as lamelas de mielina na própria célula de Schwann, assim como entre diferentes células de Schwann (BONE e col., 1997; FISHBECK e col., 1996). Apresenta 280 aminoácidos, que constituem quatro domínios transmembrânicos, um loop intracelular e dois extracelulares, uma terminação amino e outra carboxi (KLEOPA & SCHERER, 2002).

# INTRODUÇÃO



**Figura 1. Imagem da proteína Cx32. (KLEOPA & SCHERER, 2006).**

Estão envolvidas em várias atividades da célula, tais como condução elétrica, cooperação metabólica, controle de crescimento, diferenciação celular. Estes canais são compostos por dois hemicanais (ou conexons), sendo que cada conexon é composto de um hexâmero de moléculas de conexina organizado ao redor de um poro central. Seu diâmetro é de 1.2 nm, pequeno demais para permitir a transferência de proteínas e ácidos nucleicos, mas suficientemente grande para permitir a difusão de íons e outras moléculas pequenas (< 1000 Da) (KLEOPA & SCHERER, 2006).

Atualmente existem mais de 300 mutações descritas neste gene ([www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations)), sendo o quadro clínico clássico semelhante ao da forma duplicada, havendo, no entanto, um grau de comprometimento diferente de acordo com o gênero, pois os homens apresentam uma doença de gravidade comparável às formas desmielinizantes dominantes, enquanto nas mulheres a gravidade é muito variável, podendo ser assintomática, apresentar um quadro tão grave quanto o masculino ou apresentar um quadro intermediário. Provavelmente, esta variabilidade em mulheres está relacionada com

## INTRODUÇÃO

---

a inativação não preferencial de um dos cromossomos X. Ocasionalmente pode haver envolvimento do sistema nervoso central (MARQUES e col., 1999).

A Cx32 está expressa nas células de Schwann e também nos oligodendrócitos, mas não são encontradas nos neurônios. O acometimento do Sistema Nervoso Central é raro (KLEOPA e col., 2002), no entanto pode ocorrer debilidade transitória, ocasionando disartria e até ataxia (PAULSON e col., 2002; TAYLOR e col., 2003).

### ***CMT2: Neuropatias axonais autossômicas dominantes***

Estes pacientes apresentam o fenótipo clássico da CMT1 com variabilidade da idade de início dos sinais clínicos. A VCN > 38m/s com potencial de ação muscular reduzido, em que os pacientes não são severamente afetados. Até o momento, as mutações identificadas causam de 25 a 35% dos casos de CMT2 (PATZKÓ e SHY, 2011).

O gene responsável por 20% dos casos de CMT2 é o MFN2 (Mitofusina 2), localizado no cromossomo 1p36, manifesta CMT com desenvolvimento severo, acomete população jovem, com sinais clínicos de atrofia ótica e alteração no sistema piramidal, além do quadro clínico característico da CMT (FEELY e col., 2010).

### ***CMT4: CMT Autossômica Recessiva (ARCMT)***

Representa menos de 10% dos casos de CMT da Europa e da América do Norte, dado divergente do encontrado nos países do Mediterrâneo e do Oriente Médio, em que casamentos consanguíneos são frequentes, representando de 30 a 50% dos casos de CMT. A ARCMT é frequentemente desmielinizante e geralmente são os casos mais severos da CMT com fenótipos clássicos (PATZKÓ E SHY, 2011).

Bernard e col. (2006) descrevem os dois principais genes responsáveis pela ARCMT, o gene GDAP1 (Ganglioside-induced differentiation associated protein-1)

# INTRODUÇÃO

---

ocasiona mutações autossômicas dominantes e o gene LMNA (Laminina A/C) está associado a mutações com acometimento clínico variável, manifestando cardiomiopatias, distrofias musculares e dermopatias restritivas.

## *CMT Intermediária*

Fazem parte desta classificação os subgrupos com VCN entre 25-45m/s axonais e desmielinizantes. Estas formas de CMT estão associadas às doenças que afetam o mecanismo das células de Schwann e dos axônios (PATZKÓ E SHY, 2011).

## *Investigação molecular da doença de Charcot-Marie-Tooth*

O avanço molecular permitiu a determinação do perfil mutacional de várias populações, o que claramente tem implicações práticas de aplicação imediata, mas também possibilita um melhor entendimento da função destes genes na normalidade e também na anormalidade, assim como do próprio sistema nervoso periférico (SZIGETI e col., 2006). Na última década, uma quantidade enorme de informações a respeito da função dos nervos periféricos e das consequências de sua disfunção foi obtida com a identificação dos genes responsáveis pelo aparecimento de tais neuropatias (SAIFI e col., 2003; SZIGETI e col., 2006), sendo que alguns destes genes contribuem com fração significativa para as neuropatias periféricas hereditárias.

Dentre as implicações clínicas, destacamos a possibilidade de um diagnóstico preciso, o que é inquestionável e de fundamental importância para os pacientes, suas famílias e seus médicos principalmente para aqueles sem história familiar da doença. Por ser um método diagnóstico extremamente preciso, não agressivo e economicamente acessível, possibilita uma avaliação mais objetiva, evitando a realização de métodos mais agressivos, tal como a biópsia de nervo, ou a realização de um grande número de exames laboratoriais,

## INTRODUÇÃO

---

o que é inviável na maioria dos centros de saúde, mesmo em países economicamente privilegiados.

Outras contribuições importantes são a possibilidade de um aconselhamento genético fundamentado e a realização de testes preditivos. A identificação dos genes responsáveis tem também permitido o estudo de suas funções e dos mecanismos patológicos das neuropatias resultantes. Modelos experimentais, com animais transgênicos, estão sendo desenvolvidos e utilizados na elucidação dos possíveis fatores responsáveis pelo aparecimento destas doenças. Finalmente, todo este avanço tem auxiliado no desenvolvimento de tratamentos baseados na fisiopatogenia (SHY e col., 2006), abrindo perspectivas de tratamento para doenças que, em sua maioria, não causam a morte do paciente, mas estão associadas a incapacidade significativa.

### *Métodos de detecção de mutações de ponto e outras pequenas mutações*

#### *Métodos de screening mutacional*

Existem várias técnicas descritas para *screening* de mutações de ponto em fragmentos de DNA que utilizam a técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, com o objetivo de produzir em larga escala da sequência escolhida em um tubo de ensaio. Esta técnica foi descrita por Kary Mullis no final da década de 80 e revolucionou a genética molecular, principalmente por ser uma estratégia nova de análise de genes através de um método simples e rápido de amplificação de sequências de DNA.

Algumas destas técnicas baseiam-se nas diferenças de mobilidade eletroforética de fragmentos com sequências de DNA selvagens e mutantes: – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis); – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism); – HA (Heteroduplex Analysis); – CSGE

## INTRODUÇÃO

---

(Conformation Sensitive Gel Electrophoresis). Existem ainda outras técnicas que se baseiam na clivagem de bases não pareadas em heteroduplexes: (CCM – Chemical Cleavage Method e EMC – Enzyme Mismatch Cleavage), ou utilizam a detecção de alterações na proteína transcrita por um determinado fragmento de DNA (PTT – Protein Truncation Test). Das técnicas citadas as mais empregadas são o SSCP e RFLP. A técnica de SSCP baseia-se no fato de que a conformação tridimensional de fragmentos de DNA simples-fita depende da sequência de nucleotídeos, sendo que a diferença de um nucleotídeo altera o padrão de migração eletroforética. Esta técnica é uma forma rápida de avaliar se existem pequenas variações em sequências de DNA. (MOLINA & TOBO, 2004).

### *Método de identificação de mutações: Sequenciamento*

Existem diversas técnicas para detecção de mutações em genes conhecidos, sendo mais utilizado o sequenciamento *gold standard*. Ele é o método com maior nível de resolução, permitindo analisar cada uma das bases de determinada sequência de DNA, além de definir a estrutura e a composição de uma cadeia de DNA, permitindo a análise de diversos genes e conseqüentemente de proteínas decorrentes dessa cadeia. Atualmente, as técnicas de *screening* de mutações têm, cada vez mais, sensibilidade e especificidade para detectar alterações de uma única base na sequência de DNA, sendo que a região do gene que apresentar uma alteração será confirmada pela técnica de sequenciamento (LINSOTT, 2002).



# ***OBJETIVOS***

## OBJETIVO

---

O objetivo do presente estudo:

Avaliar a frequência mutacional do gene GJB1 em pacientes brasileiros com neuropatia hereditária sensitivo-motora desmielinizante ou intermediária que foram negativos para a duplicação 17p11.2;

# ***Materiais e Métodos***

## Materiais e Métodos

---

### *OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS*

#### Pacientes

Foram estudados 66 pacientes com CMT1 em seguimento nos ambulatórios de Neurogenética e Neuromuscular do Hospital das Clínicas, FMRP/USP. Os pacientes selecionados apresentavam quadro clínico sugestivo de neuropatia hereditária sensitivo-motora desmielinizante ou intermediária e história familiar era compatível com herança ligada ao X – sem transmissão de pai para filho (homem para homem) – ou eram casos esporádicos. Foram excluídos os pacientes com quadro neurofisiológico sugestivo de neuropatia axonal e aqueles com heranças autossômicas recessiva, mitocondriais ou com transmissão homem-homem.

Todos os pacientes participantes deste estudo foram previamente testados para a duplicação da região 17p11.2-p12, através da técnica de PCR fluorescente semi-quantitativa para a amplificação de marcadores microssatélites polimórficos localizados dentro da região duplicada (THOMAS e col., 1997). A presença ou ausência da duplicação 17p foi também confirmada por DHPLC (NAIMI e col., 2005). Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam a duplicação, exceto aqueles cujo quadro clínico era incomum, condição na qual a presença de duas mutações é relatada (HODAPP e col., 2006).

#### Coleta de Sangue

Aproximadamente 10 mL de sangue foram colhidos de todos os participantes do estudo, após assinatura do termo de consentimento informado (ANEXO I), utilizando-se o sistema de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA.

## Materiais e Métodos

---

### Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído seguindo com o kit PureGene (Gentra), de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante .

### *Lise Celular:*

1. Adicionar a 300ul de sangue, 900ul de RBC Lysis Solution (tampão de lise de glóbulos vermelhos), vórtex por 15 segundos, encubar 1 minuto a temperatura ambiente, invertendo gentilmente 10 vezes durante a incubação.
2. Centrifugar por 20 minutos a 13.000-16.000 rpm (Rotações por minuto). Remover o sobrenadante com uma pipeta deixando apenas o pellet visível de células brancas, deixando um líquido residual de 10-20 ul.
3. Vórtex o tubo vigorosamente por 10s para ressuspender as células brancas no líquido residual.
4. Adicionar 300ul de **Cell Lysis Solution** (Solução de Lise de células brancas). Homogeneizar lentamente com a pipeta.

### *Precipitação de Proteína*

1. Adicionar 100ul de **Protein Precipitation Solution** na célula lisada
2. Vórtex vigorosamente na maior velocidade por 20 segundos para misturar uniformemente a proteína com as células lisadas.
3. Centrifugar de 13.000-16.000 rpm por 1 minuto. As proteínas precipitadas ficarão ao fundo como um botão de cor marrom. Se o pellet de proteína não estiver nessa cor escura repita o passo 2, deixe a amostra encubada no gelo por 5 minutos e repita o passo

### *Precipitação do DNA*

1. Pegar o sobrenadante contendo DNA, deixando o pellet de proteína (marrom), colocar em um microtubo de 1,5 ml e adicionar 300 ul de isopropanol (2-propanol) 100%.
2. Misture a amostra invertendo gentilmente 50 vezes (nesse momento vê-se a nuvem de DNA).
3. Centrifugar a 13.000-16.000 rpm por 1 minuto.

## Materiais e Métodos

4. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, o DNA poderá estar visível como um pequeno pellet esbranquiçado ou transparente, e muitas vezes invisível.
5. Adicionar 300ul de etanol 70%, inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA. Centrifugar a 13.000-16.000 rpm por 1 minuto.
6. Descartar o sobrenadante e permanecerá apenas o pellet de DNA.
7. (Deixar os microtubos abertos até que o etanol se evapore)

### *Hidratação do DNA*

1. Adicionar 30 ul de **DNA Hidration Solution** (ou água milli-Q autoclavada).
2. Encubar por 5 minutos a 65°C para acelerar a hidratação. Estocar o DNA a 4°C.
3. Quando for estocá-lo por longo tempo, armazenar em freezer -20°C ou -80°C.

### *Seleção dos Primers*

As sequências dos *primers* empregados na análise para pesquisa de mutações no gene da Cx32 foram as mesmas utilizadas por Takashima e col. (2001), descritas na tabela 2. As sequencias de nucleotídeos obtidas foram conferidas no site (<http://genome.ucsc.edu>).

<i>Gene</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequência (pares de base)</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>
<b>GJB1 (Cx32)</b>	<i>A: sense: 5' CCAGTTTCTGACAGCTTGCT 3'</i>	495bp	61o C
	<i>Antisense: 5' CTCAAACAACAGCCGGAACAC 3'</i>		
	<i>B: sense 5' GCACAAGGTCCACATCTCAGG 3'</i>	523bp	61o C
	<i>Antisense: 5' AGGGCAGGGTCGGGGTTGGATG 3'</i>		

**Tabela 2.** Seleção de *primers* por Takashima e col. (2001)

## Materiais e Métodos

---

### ***Reação em cadeia da Polimerase (PCR)***

A reação de PCR foi montada à temperatura de aproximadamente 4°C (no gelo), usando 1µl de DNA genômico (200ng) do paciente; 1µl dos *primers* (20µM), *sense* e *anti-sense*, específico para cada região a ser amplificada (Anexo); 5µl de tampão 10X; 3µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 5µl de dNTPs (200mM); 0,5µl de polimerase Taq Platinum (5U/µl) (Invitrogen); q.s.p. 50µl de H<sub>2</sub>O *free DNase*. O perfil térmico foi realizado como descrito a seguir: 95°C, por 5 minutos; 30 ciclos: 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento (específico para cada primer – Tabela 2) por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos e 4°C para conservação.

### ***Cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência (DHPLC)***

#### *Condições para detecção de Mutações por DHPLC*

Para realização da DHPLC foram usados os mesmos *primers* descritos por Takashima e col., 2001. Para o *screening* de mutações, foi também utilizada a técnica de DHPLC usando o D-Wave System 4500 da *Transgenomic*. A amplificação por PCR foi padronizada usando os *primers* descritos na tabela 2. Em seguida, com o produto de PCR realizamos a formação de heteroduplex esfriando-se lentamente de 95°C a 25°C por 45 minutos. Para detecção de mutações no gene da Cx32, uma doença ligada ao X, os heteroduplexes foram formados depois de uma combinação do produto de paciente com um controle normal. Nós determinamos a otimização das condições do DHPLC por vários testes subsequentes de mudanças de temperatura e gradiente de acetonitrila na coluna DNASep. Nós escolhemos a temperatura e gradiente de Tampão A (Trietilamônioacetato e Água), Tampão B (Trietilamônioacetato, Acetonitrila e Água) iniciais usando o programa WaveMaker software da Transgenômics em comparação

## Materiais e Métodos

---

com o Stanford DHPLC Melt program (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). Foram eluídos 12  $\mu$ l do produto de PCR por amostra a um fluxo de 0.9 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila entre 3 e 6 minutos.

### *Reação de Sequenciamento*

Cada segmento do gene da Cx32 foi sequenciado em ambas as direções por sequenciamento direto pela química *Big Dye* (Applied Biosystems) em eletroforese capilar no equipamento ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). A análise do sequenciamento foi feita pelo programa *Sequencing Analysis 5.3.1* (Applied Biosystems).

Para o sequenciamento, as amostras são preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Para cada amostra a ser sequenciada, foram usados aproximadamente 200 - 500ng de DNA (1 a 2  $\mu$ l), 2  $\mu$ l de *primer* (específico de cada região analisada) 5 pmoles/ $\mu$ l, 2  $\mu$ l de Big Dye (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase), 2  $\mu$ l de tampão de diluição do Big Dye (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar o volume final de 10  $\mu$ l. O programa de PCR utilizado foi:

Desnaturação - 96°C por 2 minutos (passo inicial)

Desnaturação - 96°C por 45 segundos;

Pareamento - 50°C por 30 segundos;

Extensão - 60°C por 4 minutos.

Número total de ciclos: 35

Manutenção: 4°C por tempo indeterminado.



## **Materiais e Métodos**

---

### ***Precipitação e purificação da reação de sequenciamento***

O produto das reações de PCR de sequenciamento foi precipitado com 80 µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vórtex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 45 minutos, a 4.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804 R), o sobrenadante foi descartado e, em seguida, o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Este precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% e a seguir, submetido a centrifuga a 3.000 rpm por 10 minutos para precipitação dos fragmentos. O etanol foi removido completamente por centrifugação a 4.000 rpm e inversão do tubo em papel limpo. O precipitado foi incubado à temperatura de 96o por 10 minutos e ressuspensão em 10 µl de formamida, e em seguida desnaturado à 96°C por 2 minutos, mantido no gelo por 2 minutos e em seguida submetido à eletroforese no sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A análise das amostras obtidas pelo sequenciamento foi feita com o programa Sequence Analysis - Applied Biosystems, em que a confirmação dos resultados foi analisada e confirmada por pelo menos duas pessoas que fazem parte do laboratório de neurogenética, local de realização deste estudo.

### ***Considerações éticas***

O presente estudo passou por análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP – USP nº12219/2004 (ANEXO III).

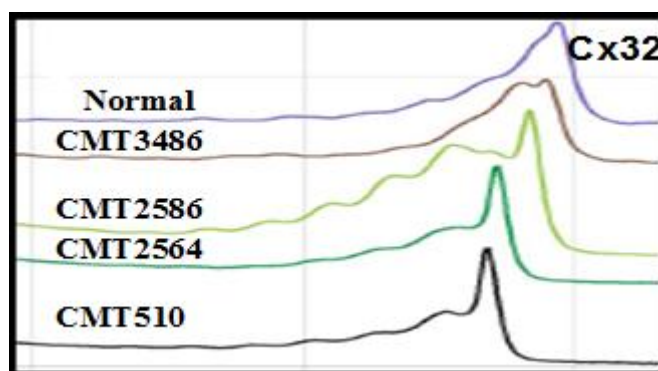
# ***RESULTADOS***

## RESULTADOS

### *Detecção de mutações por Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Eficiência (DHPLC)*

O método de *screening mutacional* para a pesquisa de possíveis alterações genéticas no gene GJB1 associado à CMTX foi o DHPLC. As temperaturas sensíveis e específicas de análise para cada fragmento foram identificadas utilizando-se o programa WaveMaker da Transgenômics.

Nós detectamos seis diferentes alterações por DHPLC, no gene GJB1. Para cada alteração detectada por DHPLC foram utilizadas temperaturas e concentrações de tampões A e B específicos. Cada alteração foi posteriormente identificada e confirmada por sequenciamento direto.



**Figura 1:** Perfil da eluição por DHPLC de 4 pacientes com mutação no gene Cx32 e o controle normal, os pacientes CMT3486, CMT2586, CMT2564 e CMT510 apresentaram respectivamente as seguintes mutações: 541G>A (Val181Met), 491G>A (R164G), 394T>C (W132R) e 431T>G (L144W).

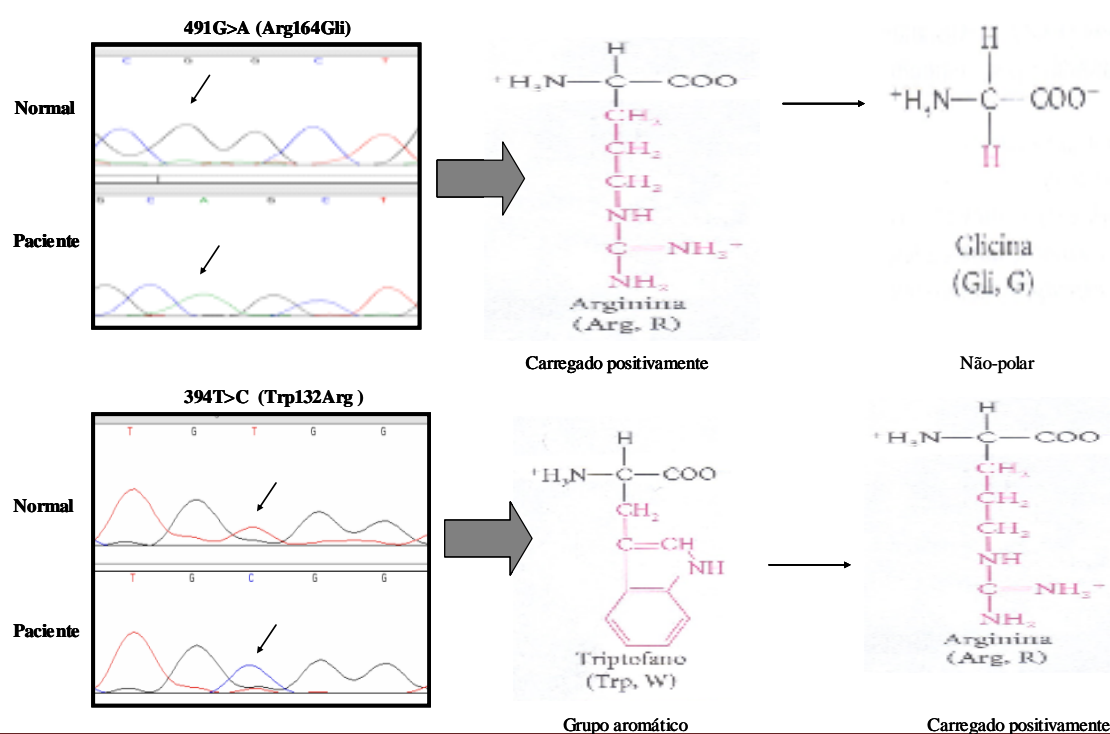
## RESULTADOS

### *Análise e identificação de mutações por sequenciamento direto*

As seis alterações detectadas por DHPLC foram posteriormente identificadas e confirmadas por sequenciamento direto (tabela 3). As mutações detectadas no gene da Cx32 estão localizadas no segundo domínio extracelular (Arg164Gli e Val181Met), no terceiro domínio transmembrânico, na terminação amino - NH<sub>2</sub> (Trp132Arg e Leu144Trp) e na terminação carboxi – COOH (Arg224Leu) da proteína Cx32.

<i>Paciente</i>	<i>Diagnóstico Clínico</i>	<i>Velocidade de condução (m/s)</i>	<i>Troca de nucleotídeos</i>	<i>Troca de aminoácido</i>	<i>Sexo</i>	<i>Descrita</i>
CMT-2586	CMTX	32,4	491G>A	Arg164Gli	M	SIM
CMT-2564	CMTX	36,1	394T>C	Trp132Arg	M	NÃO
CMT-3486	CMTX	16	541G>A	Val181Met	M	SIM
CMT-510	CMTX	34,7	431T>G	Leu144Trp	M	NAO
CMT-5249	CMTX	40,1	28C>T	Leu10Fenil	M	NAO
CMT-7145	CMTX	40	671G>T	Arg224Leu	M	NAO

**Tabela 2.** Características gerais das mutações encontradas no gene GJB1(Cx32).



# RESULTADOS

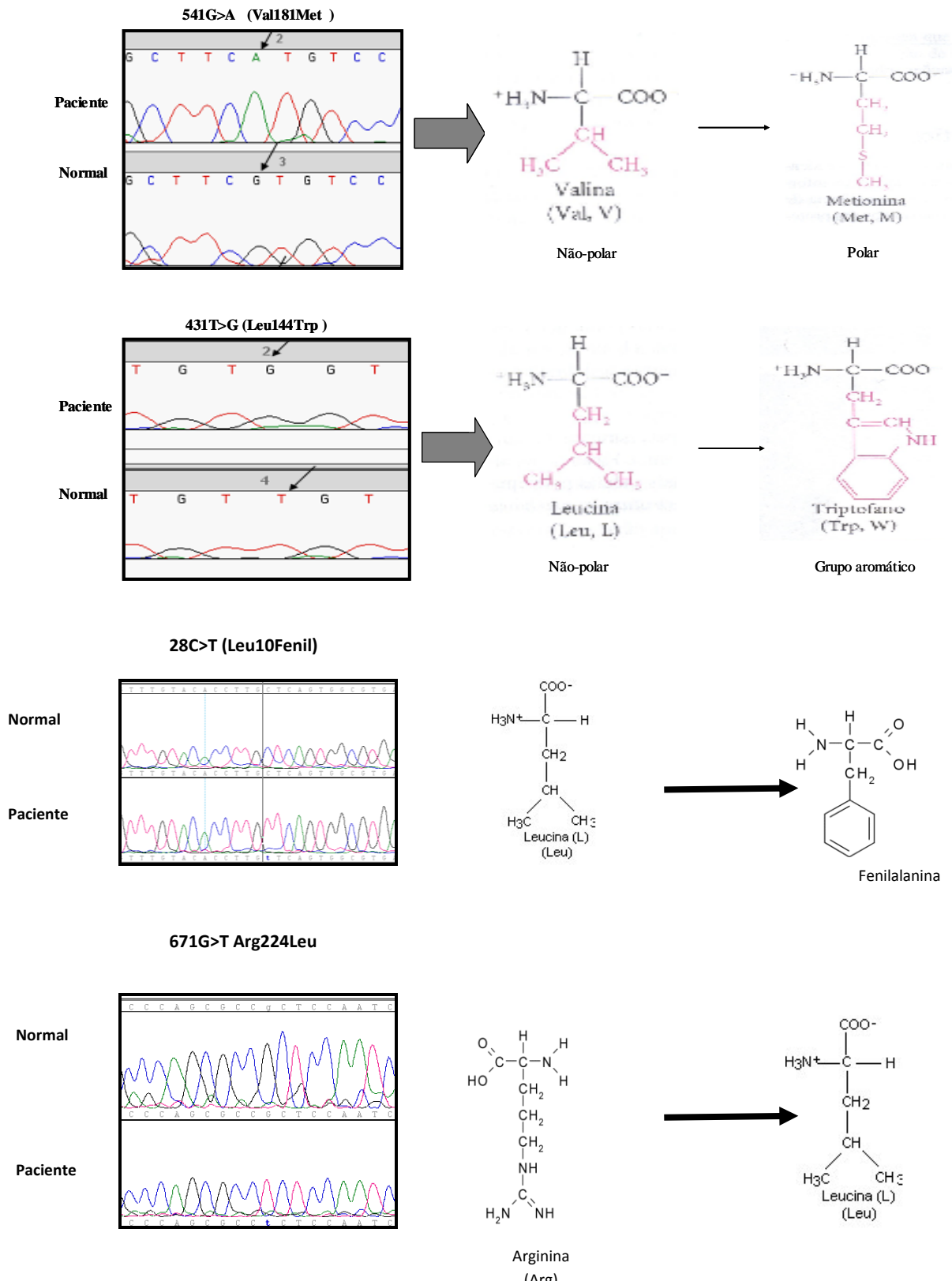


Figura 2. Eletroferograma identificando a troca de bases de cada mutação e consequente troca de aminoácidos.

## RESULTADOS

---

A mutação encontrada no paciente CMT-2586 foi caracterizada pela mudança de G para A, ocasionando a troca do aminoácido Arginina que é carregado positivamente, na posição 164 por Glicina que é um aminoácido polar (Arg164Gli), localizada no segundo loop extracelular, já descrita anteriormente (BORT e col., 1997; PANAS e col., 1998; MERISIYANOVA e col., 2000; YOSHIHARA e col., 2000; DUBOURG e col., 2001; HUEHNE e col., 2003; CHOI e col., 2004; SEEMAN, 2004 e CASASNOVAS e col., 2006).

No paciente CMT-2564, foi identificada uma mutação, descrita por Gouvêa e col. (2008), originada da transição da base T para C resultando na troca do aminoácido Triptofano que pertence ao grupo aromático para Arginina que é um aminoácido carregado positivamente (Trp132Arg), localizada no terceiro domínio transmembrânico.

No paciente CMT-3486, encontramos a transição da base G para A, promovendo a troca do aminoácido Valina, pertencente ao grupo de aminoácidos não-polares, na posição 181, por Metionina que é um aminoácido do grupo polar (Val181Met). Esta mutação, também está localizada no segundo loop extracelular da proteína Cx32. A mutação Val181Met já foi descrita anteriormente (BONE e col., 1997 e CASASNOVAS e col., 2006).

O paciente CMT-510 apresentou uma mutação descrita por Gouvêa e col. (2008), ocorrendo a transversão da base T para G, com troca na posição 144 do aminoácido Leucina, que pertence ao grupo não polar, por Triptofano que é do grupo de aminoácidos aromáticos (Leu144Trp). A mutação Leu144Trp está localizada no terceiro domínio transmembrânico da proteína Cx32.

O paciente CMT-5249 apresentou uma transição de C para T, com troca na posição 28 do aminoácido Leucina, que pertence ao grupo não polar, por fenilalanina, do grupo de aminoácidos não polar (Leu10Fenil). Esta mutação está localizada na terminação amino - NH<sub>2</sub>.

## RESULTADOS

---

No paciente CMT-7145 foi identificada troca de G para T, na posição 224 do aminoácido Arginina, que é um aminoácido carregado positivamente, por Leucina do grupo não polar (Arg224Leu), localizada na terminação carboxi – COOH.

Para o presente estudo foram realizadas análise familiar e screening populacional para as quatro primeiras mutações encontradas, já para as duas últimas mutações encontradas foi realizado screening populacional sem análise familiar, objetivando principalmente a confirmação de mutações e exclusão de polimorfismos.

### ***Frequencia mutacional do gene GJB1 Cx32 na população brasileira com a doença de CMT1 negativos para duplicação 17p.***

Nós analisamos 66 pacientes com quadro clínico sugestivo de CMT1 ou CMT intermediária e negativos para a duplicação 17p11.2, tendo sido encontrados seis mutações no gene GJB1 nos 66 pacientes, representando 9% desta população de estudo. O sequenciamento de 100 indivíduos normais e sem história familiar para doenças neuromusculares não detectou qualquer uma das anormalidades encontradas nestes seis pacientes, excluindo a possibilidade das alterações encontradas serem polimorfismos não causadores de doença. (Anexo I).

# ***DISCUSSÃO***



## DISCUSSÃO

---

A CMT é um grupo de doenças genética e clinicamente heterogêneas, apresentando, no entanto, uma apresentação clínica padrão. Acomete tanto crianças como adultos e, embora geralmente situe-se dentro do espectro benigno das neuropatias periféricas, pode causar incapacidade significativa, e podendo até mesmo causar comprometimento respiratório. Estima-se que um a cada 2500 pessoas possua uma forma de CMT (SKRE e col., 1974). A maioria dos pacientes com CMT apresenta herança autossômica dominante (AD), no entanto formas recessivas, formas ligadas ao X e casos esporádicos também ocorrem, sendo que a maioria dos casos esporádicos resultam de mutações de novo. A CMT é em geral dividida em duas formas de acordo com características eletrofisiológicas e/ou patológicas: uma forma desmielinizante (CMT1), com VC menor que 38 m/s e uma forma axonal (CMT2), com VC maior de 38 m/s (HARDING & THOMAS, 1980; SHY e col., 2005). No entanto, uma forma intermediária é agora reconhecida, de tal forma que são identificados agora três grupos de acordo com a velocidade de condução: uma forma mielínica com VC < 35 m/s, uma forma intermediária com VC situada entre 35 a 45 m/s e uma forma axonal com VC > 45 m/s ( ).

O advento da Biologia Molecular possibilitou um diagnóstico preciso para aquelas formas de CMT que tiveram seus genes identificados, mesmo aqueles casos esporádicos ou cuja história familiar era desconhecida. No início, acreditou-se que o problema diagnóstico das neuropatias hereditárias estava resolvido. Na suspeita diagnóstica, bastaria colher o sangue do paciente para que a etiologia final fosse obtida sem qualquer necessidade de detalhamento clínico. No entanto, o avançar do conhecimento não confirmou esta impressão. O grande número de genes envolvidos, a heterogeneidade clínica e a heterogeneidade genética resultaram em um processo diagnóstico complexo e minucioso, onde a avaliação laboratorial deve ser precedida de uma avaliação clínica e neurofisiológica detalhada (SZIGETI e col., 2006). A variabilidade genética desta doença é grande, transformando o diagnóstico laboratorial em uma atividade complexa e extensa, mesmo frente a um trabalho clínico bem

## DISCUSSÃO

---

detalhado. Pelo menos 40 diferentes genes/loci já estão identificados (BIRD, 2011), esperando-se que esse número seja ainda maior, entre 50 a 100, já que a doença de muitas famílias não se enquadra em nenhuma dessas regiões.

Dentre as CMT1, a forma mais prevalente é a duplicação do gene PMP22 (CMT1A), responsável por aproximadamente 60 a 90% de todos os casos de CMT1 e 40 a 50% de todos os casos de CMT (NELIS e col., 1996; DUBOURG e col., 2001; MARQUES e col., 2005; SZIGETI e col., 2009; SAPORTA e col., 2011). O gene PMP22 está completamente localizado dentro da região duplicada, tendo sido observado que mutações de ponto nesse gene (~1%) também causavam neuropatia desmielinizante, tanto em seres humanos como em animais, confirmando que o PMP22 é o gene causativo da CMT1A (VALENTIJN e col., 1992; SZIGETI e col., 2006). A CMT1B é uma doença AD causada por mutações no gene MPZ, representando cerca de 5 a 10% dos casos de CMT1, apresentando aspectos clínicos semelhantes à CMT1A (BIRD e col., 1999). Em 1998, Warner e col. descreveram mutações no gene da Resposta de Crescimento Precoce tipo 2 (EGR2) como sendo causador de CMT1D. Desde então, tem sido reconhecido que mutações no EGR2, bem como no PMP22 e MPZ podem causar uma ampla variedade de fenótipos, desde CMT1 até SDS e Neuropatia Congênita Hipomielinizante (CHN). Na CMT2 o gene MFN2 (Mitofusina 2), apresenta CMT com desenvolvimento severo, acometendo população jovem, com sinais clínicos de atrofia ótica e alteração no sistema piramidal, além do quadro clínico clássico da CMT (Feely e col., 2010). Recentemente, ficou demonstrado que mutações no gene ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1) são mais frequentes para a CMT4A (NARD), visto que o primeiro locus da CMT4A (NARD) foi mapeado no cromossomo 8q13-q21.1 (CMT4A) em famílias da Tunísia (SAIFI e col., 2003). Fazem parte desta classificação os subgrupos com VCN entre 25-45m/s axonais e desmielinizantes, que estão associadas às

## DISCUSSÃO

---

doenças que afetam o mecanismo das células de Schwann e dos axônios, estes subgrupos são classificados com CMT intermediária (Patzkó e Shy, 2011),

A CMTX é uma neuropatia ligada ao cromossomo X, que responde por aproximadamente 10% das famílias com CMT, sendo a segunda causa mais frequente da doença, após a duplicação (IONASESCU e col., 1993).

### Métodos diagnósticos

Várias técnicas e estratégias pode ser utilizadas para a identificação de mutações de pequeno porte, tais como troca de pares de bases, pequenas inserções e pequenas deleções. A opção confiável é o sequenciamento direto dos genes envolvidos. Embora esta seja, provavelmente, a técnica mais segura e eficiente, tem alto custo financeiro, despende tempo e necessita de capacitação adequada para seu manuseio correto, mesmo utilizando sequenciadores automatizados, baseados na utilização de moléculas fluorescentes. Para a análise por sequenciamento direto de genes grandes, com quantidade elevada de *exons*, é praticamente inviável como método de rotina, utilizado apenas em situações de pesquisa. Por esta razão, diversos métodos de *screening* mutacional, que identificam alterações nos *exons*, sem identificar especificamente a mutação propostos. Nestes métodos, uma vez identificado algum *exon* anormal, somente este será submetido a sequenciamento direto. (MOLINA & TOBO, 2004).

Dentre os métodos de *screening* mutacional, um dos mais utilizados no passado foi o SSCP, *single strand conformational polymorfism*, que se baseia na detecção de polimorfismos ou mutações através da alteração do padrão de migração por eletroforese. Sua sensibilidade é geralmente menor que 75% (CHOI e col., 1999).

Outro método utilizado para *screening* mutacional é o DHPLC que se baseia na detecção de mutações por formação de heteroduplex e posteriormente diferenciando

## DISCUSSÃO

---

moléculas heteroduplexes de moléculas homoduplex pela fase sólida da cromatografia em condições parcialmente desnaturantes. Esta técnica tem sensibilidade e especificidade estimada entre 96% e 100% e tem sido empregada com sucesso na detecção de mutações em diferentes genes de interesse clínico com tempo de análise de aproximadamente 10 minutos por amostra, mostrando-se mais eficiente do que outras técnicas rotineiramente utilizadas para este fim (OEFNER & UNDERHILL, 1995).

A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis* – HRM) é outro método de *screening* mutacional utilizado para detectar alterações na sequência do DNA. Esse método foi recentemente descrito como sendo um método de custo relativamente baixo, simples, sensível e confiável (REED e col., 2007), inclusive para genes associados à CMT (KENNERSON e col., 2007). A HRM não necessita processamento, adição de reagentes ou separação das amostras após a PCR, visto que um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla fita é adicionado na PCR antes da reação de amplificação. Após a amplificação do DNA, uma curva de dissociação é gerada e, para isso, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada. Conforme a temperatura é elevada, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fitas simples. A identificação de alterações no DNA por HRM é realizada através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação de amostras na forma de heteroduplex, quando comparadas a amostras controle homozigotas. As amostras que apresentam alteração na curva de dissociação devem ser submetidas a sequenciamento, para identificar a mutação ou o polimorfismo presente (REED e col., 2007). Portanto, o HRM não substitui o sequenciamento, porém é um método adequado para detecção de alterações na sequência de DNA e apresenta vantagens, tais como baixo custo, facilidade de execução e rapidez na obtenção dos resultados (KENNERSON e col., 2007).

## DISCUSSÃO

---

Já as técnicas de sequenciamento e *RFLP* (digestão enzimática), também utilizadas nesta investigação, são técnicas de confirmação e identificação de mutações.

No presente estudo, levando em consideração o tamanho relativamente pequeno dos gene envolvido (GJB1 – dois fragmentos A/B), foi utilizado o método de sequenciamento direto para detecção das mutações, visto ser o método com maior nível de resolução e confiabilidade.

### **Mutações no gene Cx32 na população brasileira estudada**

O paciente CMT-2586, no qual identificamos a mutação (491G>A) Arg164Gli, apresenta heredograma sem evidências de transmissão de homem para homem e apresentou no exame eletroneuromiográfico uma polineuropatia sensitivo-motora desmielinizante discretamente assimétrica com moderada redução das velocidades de condução (VC mediano= 32,4m/s), apresentando assim um quadro clínico sugestivo de CMTX. Várias mutações foram identificadas neste códon. No trabalho de Bort e col. (1997), todos os pacientes com mutação Arg164Gli apresentavam fenótipo compatível com CMT1 e eram do sexo masculino. Já a mutação (490 C>T) Arg164Trp foi descrita inicialmente em uma família numerosa das Ilhas Canárias, que tinha típica herança ligada ao X, o fenótipo clínico foi consistente com uma neuropatia desmielinizante não hipertrófica, o início dos sintomas foi entre a primeira e segunda década em homens, mas na terceira década em mulheres. Características clínicas e achados neurológicos foram similares aqueles descritos em homens para CMT1A, mas foi brando em mulheres. A velocidade de condução nos nervos mediano e peroneiro foram respectivamente, 24,2 m/s e 23 m/s, e as mulheres apresentaram velocidade de condução do nervo peroneira normal ou pouco reduzida (37m/s a 43m/s) (OTERINO e col., 1996). O códon 164 na conexina tem uma grande susceptibilidade para mutações, descritas em pelo menos 14 artigos (IONASESCU e col., 1996; OTERINO e col., 1996;

## DISCUSSÃO

---

BORT e col., 1997; BONE e col., 1997; PANAS e col., 1998; MERSIYANOVA e col., 2000; YOSHIHARA e col., 2000; DUBOURG e col., 2001; YOUNG e col., 2001; SCHELHAAS e col., 2002; HUEHNE e col., 2003; CHOI e col., 2004; SEEMAN, 2004 e CASASNOVAS e col., 2006), que descrevem duas diferentes mutações neste ponto, a mutação Arg164Trp e a mutação Arg164Gli. Choi e col. (2004) consideraram a mutação Arg164Gli como causativa e não a identificaram na análise de 105 pessoas saudáveis. Casasnovas e col. (2006), estudando 60 pacientes com características clínicas de CMT-X (herança dominante, nenhuma transmissão de homem para homem ou esporádica) foram estudadas para alterações no gene da Cx32 em 60 pacientes, dos quais 34 apresentaram mutações no gene Cx32. Destes, 10 apresentaram mutações, em famílias independentes, no códon 164, sendo quatro no nucleotídeo 490 (Arg164Trp) e seis no nucleotídeo 491 (Arg164Gli), as duas mutações no códon 164, tendo considerado esta área como um hot spot para mutações de ponto no gene Cx32, respondendo por aproximadamente 27% das mutações encontradas neste gene.

A mutação (394T>C) Trp132Arg foi encontrada em dois irmãos, tendo o caso índice (CMT-2564) 30 anos. Além dos sinais clínicos característicos da doença de Charcot-Marie-Tooth, havia ainda tremor postural e de ação nos membros superiores. O exame eletroneuromiográfico evidenciou uma polineuropatia sensitivo-motora desmielinizante simétrica com moderada redução das velocidades de condução (VC mediano = 36,1 m/s). Clinicamente, merece destaque a presença do tremor associado à mutação Trp132Arg, um achado relativamente incomum na CMTX, embora já tenha sido descrito anteriormente. Eletrofisiologicamente, a VC intermediária parece ser uma característica marcante dessa forma de NHSM.

Para confirmar que a mutação Trp132Arg não era um polimorfismo comum à população normal foi realizada análise desta mutação em 100 controles normais por DHPLC, e a mutação não estava presente. Esta mutação não foi descrita anteriormente, mas foi

## DISCUSSÃO

---

encontrada no mesmo códon a mutação (396G>A) Trp132X por Lin e col. 1999, com quadro clínico típico de CMTX.

A mutação (541G>A) Val181Met foi identificada no paciente CMT-3486, com VC mediano=16m/s, uma velocidade de condução bem abaixo das encontradas nos quadros clínicos típicos de CMTX, que geralmente é em torno dos 30 m/s (DUBOURG e col., 2001). Pode ser que o efeito severidade de algumas mutações estejam relacionadas com sua localização e/ou troca de aminoácidos. Esta mutação foi apenas descrita por Bone e col. (1997) e Casasnovas e col. (2006), e não relataram a VC ou qualquer gravidade no quadro clínico do paciente, relacionando a mutação apenas com CMTX. Outra mutação também foi descrita no códon 181 (Val181Ala) por Abrams e col. (2003) apresentou uma neuropatia severa com início precoce.

O paciente CMT-510, apresentou a mutação (431T>G) Leu144Trp. A velocidade de condução foi de 34,7 m/s, o paciente apresenta quadro clínico típico de CMTX. Esta mutação não foi descrita anteriormente, mas outra mutação no mesmo códon já foi relatada, a Leu144del, que também resultou em quadro clínico sugestivo de CMTX (FAIRWEATHER e col., 1994). Para o presente estudo foram realizados análise familiar e screening populacional para as quatro primeiras mutações encontradas, já para as duas últimas mutações encontradas foi realizado screening populacional sem análise familiar, objetivando principalmente a confirmação de mutações e exclusão de polimorfismos.

O paciente CMT-5249 apresentou mutação (28C>T) Leu10Fenil. Apresentava VC de 40,1 m/s, com quadro clínico típico de CMT1. Esta mutação não foi descrita anteriormente, mas foi encontrado um polimorfismo na posição 30C>T sem troca de aminoácido Leu10Leu, descrita por Numakura e col. (2002) e Choi e col. (2004) O paciente CMT-7145 apresentou mutação 671G>T (Arg224Leu). Apresentando VC de 40 m/s, com quadro clínico típico de CMT1. Esta mutação ainda não foi descrita pela comunidade científica atual. No entanto,

## DISCUSSÃO

---

Bone e col. (1997) descreveram mutação na posição 658C>G (Arg220Gly), região próxima a mutação encontrada neste estudo, tendo também manifestação clínica de CMT1, caracterizando CMTX.

Localizadas no *segundo domínio extracelular* as mutações encontradas neste estudo (Arg164Gli e Val181Met) e outras duas no *terceiro domínio transmembrânico* (Trp132Arg e Leu144Trp) confirmam o relato de Casasnovas e col. (2006), relatando que o segundo domínio extracelular que representa apenas 13% do tamanho da conexina 32, é o domínio com maior tendência a apresentar mutações, o que sugere ser esta uma importante área funcional na Conexina 32 e/ou com grande tendência a desenvolver mutacoes. Já o *terceiro domínio transmembrânico* representa apenas 7,5% do tamanho da conexina 32 e tem um menor número de mutações são quando comparado ao segundo *domínio extracelular*.

As mutações novas encontradas neste estudo se encontram *na terminação amino - NH2 e na terminação carboxi – COOH* da proteína Cx32.

Para o presente estudo foram realizados análise familiar e screening populacional para as quatro primeiras mutações encontradas, já para as duas últimas mutações encontradas foi realizado screening populacional sem análise familiar, objetivando principalmente a confirmação de mutações e exclusão de polimorfismos.

### **Frequência de mutações da Cx32 na população brasileira estudada**

Nos 66 pacientes com CMT, negativos para duplicação 17p11.2, analisados nesse estudo, foram identificadas seis mutações, sendo que quatro não haviam sido escritas. Confirmando assim uma frequência de aproximadamente 9% de mutações no gene da Cx32, frequência esta já descrita por Ionasescu e col. (1993).



## DISCUSSÃO

Mutações na Cx32 foram as mais frequentes em todas as populações estudadas, variando de 8% a 30%. Fato este, que confirma o resultado obtido neste estudo, em que mutações na Cx32 são mais frequentes na população de pacientes com CMT tanto do Brasil quanto em diversas outras populações. Até o presente momento, muitos estudos populacionais envolvendo Cx32 haviam sido realizados em várias outras populações, mas nenhuma na população brasileira. Este estudo vem para confirmar a necessidade de se estudar Cx32 na população brasileira de CMT e também conclui a importância de inserção da investigação molecular do gene da Cx32 na rotina de diagnósticos do pacientes com CMT no Brasil.

<b>População</b>	<b>Pacientes (N)</b>	<b>Mutações Cx32</b>	<b>Trabalhos Realizados</b>
<b>Americana</b>	66	12%	Boerkoel e col. (2002)
<b>Espanhola</b>	35	17%	Bort e col. (1997)
<b>Russa</b>	50	14%	Mersiyanova e col. (2000)
<b>Coreana</b>	17	11,7%	Choi e col. (2004)
<b>Australiana</b>	88	30,1%	Nicholson e col. (1999)
<b>Italiana</b>	72	16,6%	Mostacciulo e col. (2001)
<b>Japonesa</b>	205	20,4%	Hattori, e col. (2003)
<b>Brasileira</b>	66	9%	(presente estudo)

**Tabela 3.** Frequencia mutacional da Cx32 em oito populações diferentes.

***CONCLUSÃO***

## CONCLUSÃO

---

Os resultados do presente estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

1. A população brasileira do gene da Cx32 estudada com CMT tem um comportamento mutacional semelhante ao das demais populações estudadas.
2. Mutações no gene Cx32 são frequentes, confirmando a frequência já descritas em diversos estudos, sendo a segunda mais frequente dentre outros genes da CMT.
3. Além das mutações já conhecidas (Arg164Gli, Trp132Arg, Val181Met, Leu144Trp), identificamos duas mutações novas (Leu10Fenil e Arg224Leu), aumentando o número de mutações associadas à forma desmielinizante de CMT.

***REFERÊNCIAS***

***BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABRAMS, C.K.; FREIDIN, M.; BUKAUSKAS, F.; DOBRENIS, K.; BARGIELLO, T.A.; VERSELIS, V.K.; BENNETT, M.V.; CHEN, L.; SAHENK, Z. Pathogenesis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: differential effects of two mutations in connexin 32. **J Neurosci.**, 2003 Nov 19;23(33):10548-58.

BARISIC, N.; CLAEYS, K. G.; SIROTKOVIĆ-SKERLEV, M.; LOFGREN, A.; NELIS, E.; DE JONGHE, P.; TIMMERMAN, V. Charcot–Marie–Tooth disease: a clinico-genetic confrontation. **Ann. Hum. Genet.**, 72(Pt 3): 416-441, 2007.

BAXTER RV, BEN OTHMANE K, ROCHELLE JM, ET AL. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutation in Charcot- Marie-Tooth disease type 4A/8q21. **Nat Genet** 2002;30:21-2.

BEN OTHMANE K, HENTATI F, LENNON F, ET AL. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease no chromosome 8q. **Hum Mol Genet** 1993;2:1625-8.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

BENSTEAD, T.J.; KUNTZ, N.L.; MILLER, R.G.; DAUBE, J.R. The electrophysiologic profile of Dejerine-Sottas disease (HMSN III). **Muscle Nerve**, 13: 586-592, 1990.

BERNARD R, DE SANDRE-GIOVANNOLI A, DELAGUE V, et al. : Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. **Neuromolecular Med** 2006, 8 :87-106.

BIRD, T.D.; TAPSCOTT, S.J. Clinical Neurogenetics. In: BRADLEY, W.G.; DAROFF, R.B.; FENICHEL, G.M.; MARSDEN, C.D. (EDS). **Neurology in Clinical Practice**, 3<sup>a</sup> ed. Boston. Butterworth-Heinemann, 777-803, 2000.

BOLINO A, MUGLIA M, CONFORTI FL, ET AL. Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutation in the gene encoding myotubularin-related protein-2. **Nat Genet** 2000;25:17-19.

BONE, L.J.; DESCHÊNES, S.M.; BALICE-GORDON, R.J.; FISCHBECK, K.H.; SCHERER, S.S. Connexin 32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Neurobiology of Disease**, 4: 221-230, 1997.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

BORT, S.; MARTINEZ, F.; PALAU, F. Prevalence and parental origin of de novo 1.5-Mb duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1<sup>a</sup>. **Am. J. Hum. Genet.**, 60: 230-233, 1997.

BRUZZONE, R.; WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. **Eur. J. Biochem.**, 238: 1-27.

CASASNOVAS, C.; BANCHS, I.; CORRAL, J.; MARTÍNEZ-MATOS, J.A.; VOLPINI, V. Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. **Clin Genet.**, 70(6):516-23, 2006.

CHOI, B.O.; LEE, M.S.; SHIN, S.H.; HWANG, J.H.; CHOI, K.G.; KIM, W.K.; SUNWOO, I.N.; KIM, N.K.; CHUNG, K.W. Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. **Hum Mutat.**, 24(2):185-6,2004.

CHOY, Y.S.; DABORA, S.L.; HALL, F.; RAMESH, V.; NIIDA, Y.; FRANZ, D.; KASPRZYK-OBARA, J.; REEVE, M.P.; KWIATKOWSKI, D.J. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. **Ann. Hum. Genet.**, 63(5):383-91, 1999.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

CLARAMUNT, R.; PEDROLA, L; SEVILLA, T.; et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. **J Med Genet.**, (42): 358-365, 2005.

CUESTA A, PEDROLA L, SEVILLA T, ET AL. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. **Nat Genet** 2001;30:22-5.

DE JONGHE, J.; TIMMERMAN, V.; NELIS, E.; SPOELDERS, P.; MARTIN, J-J.; VAN BROECKHOVEN, C. Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. **Periph. Nerv. Syst.**, 2: 370-387, 1997.

DE SANDRE-GIOVANNOLI A, CHAOUCH M, KOZLOV S, ET AL. Homozygous defects in LMNA, encoding Lamin A/C nuclear proteins, causes autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. **Am J hum Genet** 2002;70:726-36.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

DUBOURG, O.; TARDIEU, S.; BIROUK, N.; GOUIDER, R.; LÉGER, J.M.; MAISONOBE, T.; BRICE, A.; BOUCHE, P.; LEGUERN, E. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Brain.**, 124(10):1958-67, 2001.

DYCK, P.J. ; KLEIN, C.J. Genetic testing in inherited peripheral neuropathies. **J. Periph. Nerv. Syst.**, 10(1): 77-84, 2005.

DYCK, P.J. ; KLEIN, C.J. Genetic testing in inherited peripheral neuropathies. **J. Periph. Nerv. Syst.**, 10(1): 77-84, 2005.

FABRIZI, G.M.; CAVALLARO, T.; JARRE, L.; POLO, A., RIZZUTO, N. A somatic and germline mosaic mutation in MPZ/P(0) mimics recessive inheritance of CMT1B. **Neurology**, 57(1): 101-105, 2001.

FAIRWEATHER, N.; BELL, C.; COCHRANE, S.; CHELLY, J.; WANG, S.; MOSTACCIUOLO, M.L.; MONACO, A.P.; HAITES, N.E. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). **Hum Mol Genet.**,; 3(1):29-34, 1994.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

FEELY SMR, LAURA M, SISKIND CC, et al. : MFN2 mutation cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. **Neurology** 2010, In Press. This paper evaluates the clinical phenotypes of all patients with CMT2A evaluated at the National Hospital for Neurology and Neurosurgery in London and the CMT Clinic at Wayne State University in Detroit, Michigan.

FISHBECK, K.H.; DESCHÊNES, S.M.; BONE, L.J.; SCHERER, S.S. Connexin 32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, LXI: 673-677, 1996.

GOUVEA, S.P.; BORGHETTI, V.H.S.; BUENO, K.C.; GENARI, A.B.; LOURENÇO, C.M.; SOBREIRA, C.; BARREIRA, A.A.; MARQUES, W.JR. Coumpound Charcot-Marie-Tooth disease may determine unusual and milder phenotypes. **Neurogenetics.**, 11(1): 135-8. 2010.

GUILBOT A, WILLIANS A, RAVISE N, ET AL. A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. **Hum Mol Genet** 2001;10:415-21.

HARDING AE, THOMAS PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. **Brain** 1980;103:259-80.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

HATTORI N, YAMAMOTO M, YOSHIHARA T, KOIKE H, NAKAGAWA M, YOSHIKAWA H, OHNISHI A, HAYASAKA K, ONODERA O, BABA M, YASUDA H, SAITO T, NAKASHIMA K, KIRA J, KAJI R, OKA N, SOBUE G. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. **Brain** 126: 134-151, 2003.

HODAPP J.A.; CARTER G.T.; LIPE, H.P.; MICHELSON, S.J.; KRAFT G.H.; BIRD, T.D. Double Trouble in Hereditary Neuropathy. Concomitant Mutations in the PMP22 gene and another gene produce novel phenotypes. **Arch Neurol.**, 63:112-117, 2006.

HOULDEN, H; REILLY, M.M. Molecular genetics of Autosomal-Dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. **NeuroMolecular Medicine**, 8: 43-62, 2006.

HUEHNE, K.; BENES, V.; THIEL, C.; KRAUS, C.; KRESS, W.; HOELTZENBEIN, M.; PLONER, C.J.; KOTZIAN, J.; REIS, A.; ROTT, H.D.; RAUTENSTRAUSS, B.W. Novel mutations in the Charcot-Marie-Tooth disease genes PMP22, MPZ, and GJB1. **Hum. Mutat.**,21(1):100, 2003.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

IONASESCU, V.V.; SEARBY, C.; GREENBERG, S.A. Dejerine-Sottas disease with sensorineural hearing loss, nystagmus, and peripheral facial nerve weakness: de novo dominant point mutation of the PMP22 gene. **J. Med. Genet.**, 33(12):1048-9, 1996.

KALAVDIJEVA L, GRESHAM D, GOODING R, ET AL. N-myc-downstream regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. **Am J Hum Genet** 2000;67:47-58.

KENNERSON, M. L. ; WARBURTON, T. ; NELIS, E. ; BREWER, M. ; POLLY, P. ; DE JONGHE, P. ; TIMMERMAN, V. ; NICHOLSON, G. A. Mutation scanning the GJB1 gene with high-resolution melting analysis : implications for mutation scanning of genes for Charcot-Marie-Tooth disease. **Clin. Chem.**, 53(2) :349-52, 2007.

KLEOPA, K.A.; SCHERER, S.S. Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **NeuroMolecular Medicine**, 8 (online): 1559-1774, 2006.

KRAJEWSKI, K.M.; LEWIS, R.A.; FUERST, D.R. Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. **Brain**, 123(Part 7): 1516-1527, 2000.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

LEAL A, MORERA B, DEL VALLE G, ET AL. A second locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 19q13.3. **Am J Hum genet** 2001;68:269-74.

LIN, G.S.; GLASS, J.D.; SHUMAS, S.; SCHERER, S.S.; FISCHBECK, K.H. A unique mutation in connexin32 associated with severe, early onset CMTX in a heterozygous female. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 14;883:481-4, 1999.

LINSCOTT, A.J. Molecular diagnostics for infectious disease. **Pathol Case**, 7(2):64-69, 2002.

LUPSKI, J.R.; OCA-LUANA, R.M.; SLAUGENHAUPT, S.; PENTAO, L.; GUZZETA, V.; TRASK, B.J.; SAUCEDO-CARDENASS, O.; BARKER, D.F.; KILLIAN, J.M.; GARCIA, C.A.; CHAKRAVARTI, A.; PATEL, P.I. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. **Cell**, 66:219-232, 1991.

MARQUES, W. JR.; FREITAS, M.R.; NASCIMENTO, O.J.M.; OLIVEIRA, A.B.; CALIA, L.; MELO, A.; LUCENA, R.; ROCHA, V.; BARREIRA, A.B. 17p duplicated Charcot Marie Tooth 1A: characteristics of a new population. **J. Neurol.**, 252: 972-979, 2005.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

MARQUES, W. JR.; THOMAS, P.K.; SWEENEY, M.G.; WOOD, N.W. Dejerine-Sottas neuropathy and PMP22 point mutations: a new base pair substitution and a possible “hotspot” on Ser72. **Ann. Neurol.**, 43:680-683, 1998.

MARQUES, W.JR.; SWEENEY, M.; WROE, S.J.; WOOD, N.W. Central nervous system involvement in a new connexin 32 mutation affecting identical twins. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 66: 803-804, 1999.

MARROSU, M.G.; VACCARGIU, S.; MARROSU, G.; VANNELLI, A.; CIANCHETTI, C.; MUNTONI, F. Charcot Marie Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. **Neurology**, 50(5): 1397-1401, 1998.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

MENDES, M.Q.; LOPES, H.J.J. **Atualização em Bioquímica Clínica**. 1ª Ed. Editora: Mai LTDA, 1973.

MERSIYANOVA, I.V.; ISMAILOV, S.M.; POLYAKOV, A.V.; DADALI, E.L.; FEDOTOV, V.P.; NELIS, E.; LÖFGREN, A.; TIMMERMAN, V.; VAN BROECKHOVEN, C.; EVGRAFOV, O.V. Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. **Hum. Mutat.** 15(4):340-7, 2000.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R.; Uso das técnicas de Biologia Molecular para diagnóstico. **Biologia Molecular Atualização** (Einstein), 2(2): 139-142, 2004.

NAIMI, M.; TARDIEU, S.; DEPIENNE, C.; RUBERG, M.; BRICE, A.; DUBOURG, O.; LEGUERN, E. Detection of genomic rearrangements by DHPLC: a prospective study of 90 patients with inherited peripheral neuropathies associated with 1711.2 rearrangements. **Am J Med Genet.**, 136A:136-139, 2005.

NELIS E., VAN BROECKHOVEN C., DE JONGHE P. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. **Eur. J. Hum. Genet.** 4(1), 25-33, 1996.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

NUMAKURA, C.; LIN, C.; IKEGAMI, T.; GULDBERG, P.; HAYASAKA, K. Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations. **Hum Mutat.**, 20(5):392-8, 2002.

OEFNER, P.J.; UNDERHILL, P.A. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). **Am. J. Hum. Genet.** 57(Suppl): A266, 1995.

OTERINO, A.; MONTÓN, F.I.; CABRERA, V.M.; PINTO, F.; GONZALEZ, A.; LAVILLA, N.R. Arginine-164-tryptophan substitution in connexin32 associated with X linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. **J Med Genet.**, 33(5):413-5, 1996.

PANAS, M.; KARADIMAS, C.; AVRAMOPOULOS, D.; VASSILOPOULOS, D. Central nervous system involvement in four patients with Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 extracellular mutations. **J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.** 65(6):947-8, 1998.

PAREYSON, D.; SCAIOLI, V.; LAURA, M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. **NeuroMol Medicine**, 8:1-23, 2006.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

PATZKÓ Á, SHY ME. Update on Charcot-Marie-Tooth disease. **Curr Neurol Neurosci Rep** 2011, 11 ;78-88.

PAULSON HL, GARBERN JY, HOBAN TF ET AL. :Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Ann Neurol** 2002, 52 :429-434.

PENTAO, L.; WISE, C.; CHINAULT, A.; PATEL, P.; LUPSKI, J.R. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5Mb monomer unit. **Nat. Genet.**, 2: 292-300, 1992.

RAYEMAEEKERS, P.; TIMMERMAN, V.; NELIS, E.; DE JONGHE, P.; HOOGENDIJK, J.E.; BAAS, F.; BARKER, D.F.; MARTIN, J.J.; DE VISSER, M.; BOLHUIS, P.A.; VAN BROECKHOVEN, C. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). **Neuromuscul Disord.**, 1: 93-97, 1991.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

REED, G. H. ; KENT, J. O. ; WITTWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, 8(6) :597-608, 2007.

REILLY, M.M. Classification of hereditary motor and sensory neuropathies. **Curr. Opin. Neurol.**, 13: 561- 564, 2000.

SAIFI GM, SZIGETI K, SNIPES GJ, GARCIA CA, LUPSKI JR. Molecular mechanisms diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. **J Invest Med** 2003; 51:261-83.

SAPORTA, A. S. D. ; SOTTILE, S. L. ; MILLER, L. J. ; FEELY, S. M. E. SISKIND, C. E. ; SHY, M. E. Charcot-Marie-Tooth Disease Subtypes and Genetic Testing Strategies. **Ann. Neurol.**, 69 :22-33, 2011.

SCHELHAAS, H.J.; VAN ENGELEN, B.G.; GABREËLS-FESTEN, A.A.; HAGEMAN, G.; VLIEGEN, J.H.; VAN DER KNAAP, M.S.; ZWARTS, M.J. Transient cerebral white matter lesions in a patient with connexin 32 missense mutation. **Neurology**, 59(12):2007-8, 2002.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

SEEMAN, P.; MAZANEC, R.; HUEHNE, K.; SUSLÍKOVÁ, P.; KELLER, O.;

RAUTENSTRAUSS, B. Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation. **Neurology**. 63(4):733-5, 2004.

SHY ME, GARBEM JY, KAMHOLZ J. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. **Lancet Neurol** 2002; 1:110-8.

SHY, M.E.; LUPSKI, J.R.; CHANCE, P.F.; KLEIN, C.J.; DYCK, P.J. Hereditary motor and sensory neuropathies: an overview of clinical, genetic, electrophysiologic, and pathologic features. In Dyck PJ and Thomas PK (eds): **Peripheral Neuropathies**, 4th edition. Philadelphia, W. B. Saunders, p.1632-1658, 2005.

SKRE, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. **Clin. Genet.**, 6: 98-118, 1974.

SNIPES, G.J.; SUTER, U. Molecular anatomy of myelin proteins in the peripheral nerve system. **J. Anat.**, 186: 483-494, 1995.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

SZIGETI, K.; GARCIA, C.A.; LUPSKI, J.R. Charcot-Marie-Tooth disease and related hereditary polyneuropathies: molecular diagnostics determine aspects of medical management. **Genetics in medicine**, 8:86-92, 2006.

SZIGETI, K.; GARCIA, C.A.; LUPSKI, J.R. Charcot-Marie-Tooth disease and related hereditary polyneuropathies: molecular diagnostics determine aspects of medical management. **Genetics in medicine**, 8:86-92, 2006.

TAKASHIMA, H.; BOERKOEL, C.F.; LUPSKI, J.R. Screening for mutations in a genetically heterogeneous disorder: DHPLC versus DNA sequence for mutation detection in multiple genes causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. **Genetics in Medicine**, 3(5): (BIRD 1982; LIU 1998; BIRD 2000; TAKASHIMA 2001; CUESTA 2002; LINSCOTT 2002; BOERKOEL 2003; SAIFI 2003; CHEN 2004; LIU 2004; CLARAMUNT 2005; KABAZÍNSKA 2005; NIEMANN 2005; PEDROLA 2005; SAIFI 2005; SHY 2005; Shy 2006; SZIGETI 2006), 2001.

TAYLOR RA, SIMON EM, MARKS HG, et al. : The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease : more than a peripheral problem. **Neurology** 2003, 61 :1475-1478.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

THOMAS, P.K.; MARQUES, W. JR.; DAVIS, M.B.; SWEENEY, M.G.; KING, R.H.M.; BRADLEY, J.L.; MUDDLE, J.R.; TYSON, J.; MALCOLM, S.; HARDING, A.E. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. **Brain**, 120: 465-478, 1997.

VALENTJIM, L.J.; BOÇHUIS, P.A.; ZORN, I.; HOOGENDIJKJE, J.E., VAN DEN BOSCH, N.H.; HENSELS, G.W.; STANTON, V.P.; HOUSMAN, D.E.; FISHBECK, K.H.; ROSS, D.A.; NICHOLSON, G.A.; MEERSHOECK, E.J.; DAUWERSE, H.G.; VANOMMEN, G.J.B.; BAAS, F. The peripheral myelin gene PMP22/GAS-3 is duplicated in Charcot- Marie-Tooth disease type 1A. **Nat. Genet.**, 1: 166-170, 1992.

WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. **Ann. Rev. Physiol.** 61: 283-319, 1999.

YOSHIHARA, T.; YAMAMOTO, M.; DOYU, M.; MIS, K.I.; HATTORI, N.; HASEGAWA, Y.; MOKUNO, K.; MITSUMA, T.; SOBUE, G. Mutations in the peripheral myelin protein zero and connexin32 genes detected by non-isotopic RNase cleavage assay and their phenotypes in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. **Hum. Mutat.**, 16(2):177-8, 2000.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

YOUNG, P.; GROTE, K.; KUHLENBÄUMER, G.; DEBUS, O.; KURLEMANN, H.; HALFTER, H.; FUNKE, H.; RINGELSTEIN, E.B.; STÖGBAUER, F. Mutation analysis in Chariot-Marie Tooth disease type 1: point mutations in the MPZ gene and the GJB1 gene cause comparable phenotypic heterogeneity. **J Neurol.**, 248(5):410-5, 2001.

***ANEXOS***

# ANEXOS

---

## Anexo I - Identificação do Indivíduo Controle

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: F  M

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Doença neuromuscular na família: Sim  Não

Casamentos Consanguíneos na família: Sim  Não



# ANEXOS

---

## Anexo II - Sequência dos Amplicons Analisados.

### 1. Amplicons dos genes Cx32.

#### Fragmento A:

gggcacagaacaggtgggtgcaggctgggtgtccggcgctgggacacaagtgtctgtgttagggtggcggaaagtcaggcgtttgatctgaattctaaaggcgttttcagac  
cccacaaaggtctcattgtgcagacactgggtataaagcagcatatgactccccagaccggGCGGTGATGAATTGGGACGCAGGCGCGGAGCCCA  
GGGACCACTCCCCCTGACAGACATGAGACCATAGGGGACCTGTCTGGGTGGCCTCAGGGATAGGCGCTCCCCA  
AGtaagagggctttgtgagtttccccaggtctggagtaaggagctaggggacagggagccataggggatggctgatatcggacaagatggccttgcaagaaggggct  
ggcgggaaaagaatgttgatgaaagcgaagaaggggatgggctcaggaggtcaagtcaagtgaagtgaaggaggagagaagctggcaaggagatggggtgacg  
aggaaagacatgaccatccttcttctgactggtcttggagagttgaggggggtgcgcaggcagtgctatggcggcggacttccacccagcttctgacagcttctcag  
gtggtgttttcagGTGTGAATGAGGCAGGATGAACTGGACAGGTTTGTACACCTTGCTCAGTGGCGTGAACCGGCAT  
TCTACTGCCATTGGCCGAGTATGGCTCTCGGTCATCTTCATCTTCAGAATCATGGTGTGGTGGTGGCTGCAGA  
GAGTGTGTGGGGTGTATGAGAAATCTTCCTTCATCTGCAACACACTCCAGCCTGGCTGCAACAGCGTTTGTATG  
ACCAATTCTTCCCATCTCCCATGTGCGGCTGTGGTCCCTGCAGCTCATCCTAGTTTCCACCCAGCTCTCCTCG  
TGGCCATGCACGTGGCTCACCAGCAACACATAGAGAAGAAAATGCTACGGCTTGAGGGCCATGGGGACCCCT  
ACACCTGGAGGAGGTGAAGAGGCACAAGGTCCACATCTCAGGGACACTGTGGTGGACCTATGTCATCAGCGTG  
GTGTTCCGGCTGTTGTTTGTAG

#### Fragmento B:

GCCGTCTTCATGTATGTCTTTTATCTGCTCTACCCTGGCTATGCCATGGTGC GGCTGGTCAAGTGC GACGTCTAC  
CCCTGCCCCAACACAGTGGACTGCTTCGTGTCCCGCCCCACCGAGAAAACCGTCTTCACCGTCTTCATGCTAGC  
TGCTCTGGCATCTGCATCATCCTCAATGTGGCCGAGGTGGTGTACCTCATCATCCGGGCTGTGCCCGCCGAG  
CCCAGCGCCGCTCCAATCCACCTTCCCGCAAGGGCTCGGGCTTCGGCCACCGCCTCTCACCTGAATACAAGCAG  
AATGAGATCAACAAGCTGCTGAGTGAGCAGGATGGCTCCCTGAAAGACATACTGCGCCGCAGCCCTGGCACC  
GGCTGGGCTGGCTGAAAAGAGCGACCGCTGCTCGGCCTGCTGATGCCACATACCAGGCAACCTCCCATCCA  
CCCCGACCCTGCCCTGGGCGAGCCCTCCTTCTCCCCTGCCGGTGCACAGGCCTCTGCCTGCTGGGGATTACT  
CGATCAAAACCTTCCCTTCCCTGGCTACTTCCCTTCTCCC GGCCCTTCCCTTTGAGGAGCTGGAGGGGTGGGG  
AGCTAGAGGCCACCTATGCCAGTGTCAAGGTTACTGGGAGTGTGGGCTGCCCTTGTTCCTGCACCCCTTCCCT  
CTTCCCTCTCCCTCTCTGAGGACTGGGTACAAGAGATGGGATGCTCCGACAGCGTCTCCAATTATGAAAC  
TAATCTTAACCTGTGCTGTGATACCTGTTTCTGGAGTCACATCAGTGAGGAGGGATGTGGGTAAGAGGA  
GCAGAGGGCAGGGGTGCTGTGGACATGTGGGTGGAGAAGGGAGGGTGGCCAGCACTAGTAAAGGAGGAATA  
GTGCTTGTGCCCACAAGGAAAAGGAGGAGGTGTCTGGGGTGGAGGAGTTAGGGAGAGAGAAGCAGGCAGAT  
AAGTTGAGCAGGGGTTGGTCAAGGCCACCTTGCCTCTAGTCCCCAAGGCCTCTCTGCTGAAATGTTACA  
CATTAAACAGGATTTTACAGtaaatgaagagtggtctgtgtgttcaagttcttctctgaacctctgacctccccaggtgatgctggccttggttttactgat  
taagaagggaacaggcaaaagaagtagtactgtagtgaagctgcaaatgaggaaactgacttctggccgcagagcca

# ANEXOS

---

## Anexo III- Comitê de Ética/ Processo HCRP nº12219/2004



CEP. 14048-900  
RIBEIRÃO PRETO - S.P.  
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

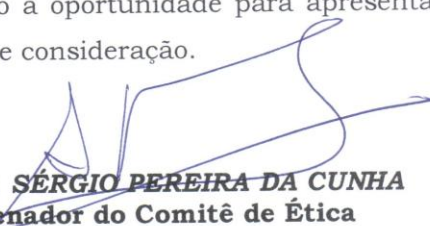
Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2004

Ofício nº 3397/2004  
CEP/SPC

**Prezada Senhora:**

O trabalho intitulado **“ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES: PMP22, PO, CX32 E EGR2 EM PACIENTES COM A DOENÇA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 194ª Reunião Ordinária realizada em 06/12/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 12219/2004.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

  
**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**SILMARA PAULA GOUVÊA DE LIMA**  
**PROF. DR. WILSON MARQUES JÚNIOR (Orientador)**  
Depto. de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica  
Em mãos

# SIX NEW MISSENSE MUTATIONS IN GJB1 GENE

Fulviana S. Nishiyama, Silmara P. Gouvêa, Keity C. Bueno, Vinícius H. Borghetti, Nilson Nicolau Júnior, Amilton, Wilson Marques Júnior.

Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo - Brasil.

**Abstract:** The Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is a neuropathy caused by mutations in the GJB1 gene, which occurs in 10% of CMT families. This paper describes four new mutations in the GJB1 gene. A previous functional *in silico* study revealed evidence for a deficit in the function of protein Cx32 and an increased pathogenic effect (agora precisa verificar as duas novas). Therefore, this study contributes to the knowledge of more mutations associated to X-linked CMT disease (CMTX).

**Keywords:** CMTX, Cx32, GJB1

## Introduction

Originally described as peroneal muscular atrophy by Jean Martin Charcot and Pierre Marie in France in 1886 and Howard Henry Tooth in England the same year (SHY et al., 2005) The Charcot-Marie-Tooth (CMT) is an inherited disorder peripheral nervous system characterized by weakness of the lower limbs, muscular atrophy and sensory loss (Reilly et al., 2000), with the main clinical weakness and progressive atrophy of distal muscles, beginning in the lower extremities and extending to the upper extremities, with foot deformities (pes cavus), characterizing gait shuffled and repeated drops, distal sensory loss,

decreased or absent tendon reflexes (Harding and Thomas, 1980), and reduction of strength and dexterity of upper extremities.

Connexins are a homogeneous family of proteins expressed in a large variety of tissues and known for their assembly into intercellular channels, called gap junctions (Saez et al., 2003). Twenty-one different human connexin genes have been reported so far, each coding for a transmembrane protein with the same protein topology (Sohl et al., 2004). A connexin consists of four  $\alpha$ -helical transmembrane domains (TM1–TM4), two extracellular loops (EL1 and EL2), a cytoplasmic loop (CL) between TM2 and TM3, and cytoplasmic aminoterminal (NT) and carboxy-terminal (CT) domains (Evans et al., 2002). Since the first description of a mutation in the GJB1 gene (coding for Cx32) in patients with the X-linked Charcot-Marie-Tooth (CMTX) syndrome in 1993 (Bergoffen et al., 1993), disease-causing mutations have been detected in almost every connexin gene.

The X-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX), is an inherited X-linked Neuropathy caused by mutations in the GJB1 gene, corresponds to approximately 10% of CMT families, responsible for cause of the disease after the 17p11.2-p12 duplication (Lupski et al., 1991; Raeymaekers et al., 1991).

More than 300 mutations in this gene have already been identified, and although its classical phenotype in the range of CMT manifestations, there are some particularities, clinical picture being similar to that of the duplicated form, including different degree of severity according to gender. In males it is comparable to that of the dominant demyelinating form, while in females the severity is variable, ranges from asymptomatic; to as severe as in males. This variability is probably related with the inactivation of one of the X-chromosomes. The central nervous system may be occasionally involved (Marques et al., 1999).

We describe here four new missense mutations in the GJB1 gene found in Brazilian patients with CMT Neuropathy.

## **Patients and Methods**

### *Clinical Information*

All patients in this study were previously tested for duplication of the region 17p11.2-p12, using the technique of semi-quantitative fluorescent PCR for amplification of polymorphic microsatellite markers located within the duplicated region (Thomas et al., 1997). The presence or absence of 17p duplication was also confirmed by DHPLC (NAIM et al., 2005). The study excluded patients who had duplication, except those whose clinical picture was unusual condition in which the presence of two mutations is reported (Hodapp et al., 2006).

Patient CMT-510 had a moderate nerve conduction velocity (VC = 34.7 m/s), with a clinical picture suggestive of CMTX.

The index case CMT-2564 and his brother also showed a typical CMTX clinical picture, with postural and action tremors in the upper limbs. Besides the characteristic clinical signs of Charcot-Marie-Tooth disease, there was action and postural tremor in upper limbs. Electromyographical examination showed a sensorimotor demyelinating polyneuropathy symmetrical with moderate reduction of conduction velocities (median CV = 36.1 m / s). Clinically, it is worth noting the presence of the mutation Trp132Arg tremor, an unusual finding in CMTX. VC electrophysiologically the middle seems to be characteristic of this form of Hereditary Sensory Motor Neuropathy (NHSM).

Patient CMT-3486, with median CV = 16m / s, a conduction velocity well below those found in typical clinical CMTX, which is usually around 30 m / s (Dubourg et al., 2001).

The patient CMT-5249 presenting CV of 40.1 m / s, with clinical symptoms of CMT1.

The patient CMT-7145 presenting CV 40 m / s, with clinical symptoms of CMT1.

### Molecular Investigation

After informed consent (Research Ethics Committee, document 12219/2004), DNA was extracted from peripheral blood according to standard procedures. Exon 2 of the GJB1 gene was amplified by PCR. A mutational screening for PMP22, MPZ and Cx32 was carried out by DHPLC, as an abnormal pattern was seen in connexin 32, this gene was sequenced on ABI 3130 Genetic Analyzer DNA Sequencer.

To ascertain that the mutations were not a polymorphism common to the Brazilian population, 100 normal controls were screened with DHPLC. Additionally, an *in silico* analysis was carried out to preview the possible consequences of the found abnormalities.

Change of the stability generate by mutations was made by the programs I-Mutant 2.0 (Capriotti et al, 2005), MUpro (Cheng et al., 2005). Additionally analysis for the probability of a deleterious effect on the protein function or mutations associated with illness was made by PMUT (Ferrer-Costa et al., 2005), SIFT (Ng e Henikoff, 2003), PolyPhen (Ramensky et al., 2002) and MutPred (Li et al., 2009). We used the reference sequence NM\_000166.5.

### **Results**

Patient CMT-510 and his cousin presented a mutation not previously described, i.e., a T to G transversion at position 144 of the amino acid leucine, which belongs to the non polar group, for tryptofan, which belongs to the aromatic group of amino acids (L44W). The L144W mutation is located at the third transmembrane domain of the GJB1 protein. One hundred normal controls were surveyed for the presence of the new mutation, but no alteration was found in any of them (Figure 1).

Also in patient CMT-2564, a not-yet-described mutation was identified: a T to C transition resulting in the replacement of the amino acid tryptofan, which belongs to the aromatic group, for arginine, which is a positively charged amino acid (W132R), located at

the third transmembrane domain. The W132R mutation was surveyed in 100 normal controls and not found in any of them (Figure 1).

The mutation found in patient CMT-2586 was characterized by the change of G to A, causing the exchange of the amino acid arginine which is positively charged in position 164 by glycine which is a polar amino acid (Arg164Gly), located on the second extracellular loop, as described previously (BORT et al. 1997; PANAS et al. 1998; MERSIYANOVA et al., 2000, Yoshihara et al. 2000; Dubourg et al., 2001; Huehn et al., 2003, Choi et al., 2004; Seeman, 2004 and Casasnovas et al., 2006).

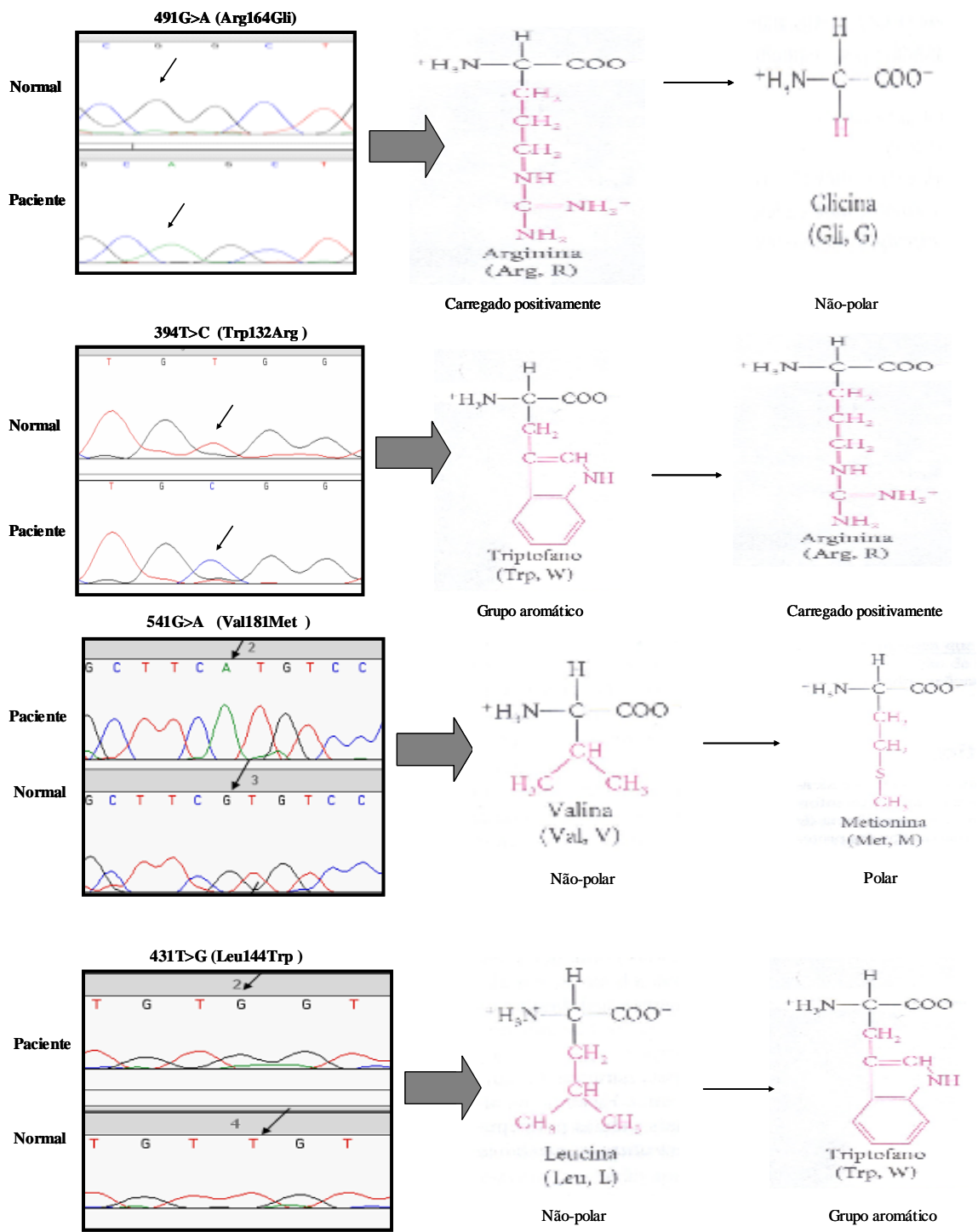
In patient CMT-2564, we identified a mutation, described by Gouvea et al. (2008), originated from the transition from T to C base change resulting in the amino acid tryptophan in a group for aromatic amino acid arginine is a positively charged (Trp132Arg), located in the third transmembrane domain.

In patient CMT-3486, found the transition from G to A base, promoting exchange of the amino acid valine, which belongs to the group of non-polar amino acid at position 181 by amino acid methionine which is a polar group (Val181Met). This mutation, also located on the second extracellular loop of Cx32 protein. The Val181Met mutation has been described previously (Bone et al., 1997 and Casasnovas et al., 2006).

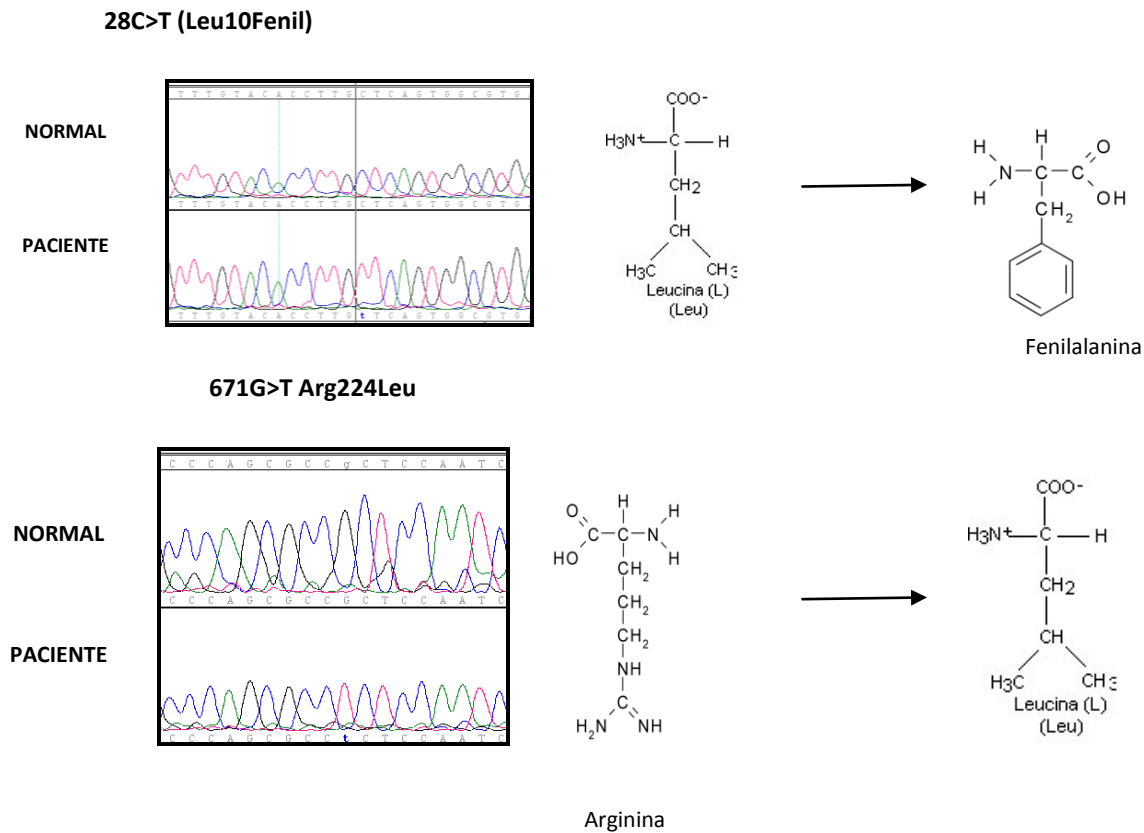
The patient CMT-510 had a mutation described by Gouvea et al. (2008), occurring at the base transversion T to G exchange at position 144 with the amino acid leucine, which belongs to the non-polar, for Tryptophan which is the group of aromatic amino acids (Leu144Trp). Leu144Trp mutation is located in the third transmembrane domain of Cx32 protein.

The patient CMT-5249 showed a transition from C to T exchange at position 28 with the amino acid leucine, which belongs to the non-polar, for phenylalanine, the group of non-polar amino acids (Leu10Fenil). This mutation is located in the amino-NH<sub>2</sub> termination. Parte superior do formulário

In patient CMT-7145 was identified G to T exchange at position 224 of amino acid arginine, which is a positively charged amino acid, leucine by the non-polar group (Arg224Leu), located in the carboxy terminated - COOH.







**Figure1.** Electropherogram identifying the exchange of bases of each mutation and consequent change of amino acid.

The *in silico* analyses of both mutations predicted stability decrease and pathogenic effects on protein GJB1, classifiers both a disease-causing mutations in two novel mutations described.

## Discussion

The patient CMT-2586, which identified the mutation (491G> A) Arg164Gli, pedigree shows no evidence of transmission from man to man and presented in an examination electromyographical sensory-motor demyelinating polyneuropathy slightly asymmetric with

moderate reduction of conduction velocities (CV median = 32.4 m / s), thus presenting a clinical picture suggestive of CMTX. Several mutations were identified in this codon.

In the work of Bort et al. (1997), all patients had mutated Arg164Gli compatible with CMT1 phenotype and were male. Since the mutation (490 C> T) Arg164Trp was initially described in a family from the Canary Islands, which had typical X-linked inheritance, the clinical phenotype was consistent with a non-hypertrophic demyelinating neuropathy, the onset was between the first and second decade in men, but in the third decade in women.

Clinical and neurological findings were similar to those described for CMT1A in men, but was mild in peroneal were respectively, 24.2 m / s and 23 m / s, and women had reduced peroneal conduction velocity in normal or mild (37m/sa 43m / s) (OTERINO et al., 1996). The codon 164 in connexin has a greater susceptibility to mutations, described in at least 14 articles (IONASESCU et al. 1996; OTERINO et al. 1996; BORT et al. 1997; BONE et al. 1997; and PANAS col. 1998; MERSIYANOVA et al., 2000, Yoshihara et al. 2000; Dubourg et al., 2001, Young et al. 2001; SCHELHAAS et al. 2002; Huehn et al., 2003, Choi et al ., 2004; Seeman, 2004 and Casanovas et al., 2006), depicting two different mutations at this point, the mutation and the mutation Arg164Trp Arg164Gli. Choi et al. (2004) considered as a causative mutation Arg164Gli and not identified in the analysis of 105 healthy people.

Casanovas et al. (2006), studying 60 patients with clinical features of CMT-X (dominant inheritance, no transmission from man to man or sporadic) were studied for changes in the Cx32 gene, the 60 patients, 34 had mutations in Cx32, and 34 patients mutation, 10 had mutations in independent families, codon 164, four at nucleotide 490 (Arg164Trp) and six at nucleotide 491 (Arg164Gli), the two mutations in codon 164 and considered this area as a hot spot for mutations point in the Cx32 gene, accounting for approximately 27% of the mutations found in this gene.

The mutation (394T> C) Trip132Arg was found in two siblings and the index case (CMT-2564) 30. Besides the characteristic clinical signs of Charcot-Marie-Tooth disease, there was action and postural tremor in upper limbs. examination electromyographical showed a sensorimotor demyelinating polyneuropathy with moderate symmetrical reduction of conduction velocities (median CV = 36.1 m / s). Clinically, it is worth noting the presence of the mutation Trp132Arg tremor, an unusual finding in CMTX. VC electrophysiologically the middle seems to be characteristic of this form of Hereditary

Sensory Motor Neuropathy (NHSM). To confirm that the mutation Trp132Arg was not a common polymorphism in the normal population of this mutation analysis was performed in 100 normal controls by DHPLC, and the mutation was not present. This mutation has not been reported previously, but was found in the same codon mutation (396G> A) Trp132X by Lin et al. 1999, with a picture of clínico típico CMTX.

The mutation (541G> A) was identified Val181Met in patient CMT-3486, with median CV = 16m / s, a conduction velocity well below those found in Tables Typical clinical CMTX, which is usually around 30 m / s (Dubourg et al., 2001). It may be that the effect severity of some mutations are related to their location and / or exchange of amino acids. This mutation has only been described by Bone et al. (1997) and Casasnovas et al. (2006), and did not show the VC or the clinical severity of the patient, relating the mutation only with CMTX. Another mutation was also described in codon 181 (Val181Ala) by Abrams et al. (2003) presented a severe neuropathy with early onset.

The patient CMT-510, showed the mutation (431T> G) Leu144Trp. Speed conduction was 34.7 m / s, the patient has clinical symptoms CMTX. This mutation has not been reported previously, but another mutation in the same codon has been reported, the Leu144del, which also resulted in a clinical diagnosis of CMTX (Fairweather et al., 1994).

The patient presented CMT-5249 mutation (28C> T) Leu10Fenil. VC had 40.1 m / s, with clinical symptoms of CMT1. This mutation has not been reported previously, but has found a polymorphism at position 30C> T Leu10Leu without changing amino acid, described by Numakura et al. (2002) and Choi et al. (2004).

The patient presented CMT-7145 mutation 671G> T (Arg224Leu). Presenting CV of 40 m / s, with clinical symptoms of CMT1. This mutation has been described by the scientific community today. However, Bone et al. (1997) described mutation at position 658C> G (Arg220Gly) region near the mutation found in this study, also clinical manifestation of CMT1, CMTX characterized.

Located on the second extracellular domain mutations found in this study (Arg164Gli and Val181Met) and another two in the third transmembrane domain (Trp132Arg and Leu144Trp) confirm the report Casasnovas et al. (2006), in which the second extracellular domain represents only 13% of the size of connexin 32, but is more often the domain of finding mutations, suggesting that this is an important functional area in the Connexin 32.

The third transmembrane domain represents 7.5% of the size of connexin 32 and a lower number of mutations are detected at this site compared to the second extracellular domain. The new mutations are found in this study, the amino terminated - NH<sub>2</sub> and carboxy terminated - COOH of Cx32 protein.

Such a mutation was not previously described either, but another one, Leu144del, was found at the same codon, and also resulted in a clinical picture suggestive of CMTX (Fairweather *et al.*, 1994).

The clinical onset of CMTX in affected males is between 5 and 20 yr of age. The initial symptoms include difficulty in running and frequently sprained ankles; foot drop, and sensory loss in the legs develop later. Depending on the severity of the disease, the distal weakness may progress to involve the gastrocnemius and soleus muscles, even to the point where assistive devices are required for ambulation. Weakness, atrophy and sensory loss also develop in the hands, particularly in the thenar muscles (Hahn *et al.*, 2000).

Recently, Guo *et al.* (2010) studied a large Chinese family with the mutation H100Y that is located in intra-cellular loop mutation. This mutation probably causes disease through disturbance of the pH balance or related tissues, with dominant negative effects, the clinical features showed muscle atrophy can be seen in the distal parts of the limbs. The lower parts of the legs show a “stork leg” or “inverted bottle” appearance in two individuals. Palmar muscle atrophy in the hands was patently observed in two patients. The phenotype of the male was more severe than that of the female.

Anand *et al.* (2010) reported a mutation V177A, located in second domain extracellular in a 7-year-old male of Caucasian origin presented with a sudden onset stroke-like episode manifesting as left hemiparesis and dysphasia following an upper respiratory tract infection. Electrophysiological studies showed a mixed demyelinating and axonal sensorimotor neuropathy in keeping with CMTX.

The new mutations here described are located at the third transmembrane domain. According to Casasnovas *et al.* (2006), the third transmembrane domain represents 7.5% of the Cx32 protein size, and a smaller number of mutations and effect deleterious are detected at this position when in comparison with the second domain extra-cellular that represents only 13% of the size of the Cx32, but is the domain where the mutations occur more frequently, what is going to be this an important functional area in the Cx32.

We suggest that different phenotypes in CMTX can be related with the particularity of the mutation and its location in each domain or loop of the protein GJB1 and still, effects epigenetic too can modify the severity of illness or genomic disorder. Based on *in silico* data, our study indicates that the new mutations here described have pathogenic and deleterious effects with typical phenotype of CMTX, what increases the number of CMTX-associated mutations.

## References

1. Capriotti, E., Fariselli, P., Casadio, R. (2005) I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure *Nucleic Acids Res.*, . 33, W306–W310.
2. [CasasNovas, C.](#); [Banchs, I.](#); [Corral, J.](#); [Martínez-Matos, J.A.](#); [Volpini, V.](#) Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. [Clin Genet.](#), 70(6):516-23, 2006.
3. Cheng, J., Randall, A., Baldi, P. (2005) Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines *Proteins*, 62, 1125–1132 .
4. [Fairweather, N.](#); [Bell, C.](#); [Cochrane, S.](#); [Chelly, J.](#); [Wang, S.](#); [Mostacciolo, M.L.](#); [Monaco, A.P.](#); [Haites, N.E.](#) Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). [Hum Mol Genet.](#); 3(1):29-34, 1994.
5. Ferrer-Costa C, Gelpi JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, et al. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics*. 2005;21:3176–3178.

6. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. 2009. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25: 2744-2750.
7. [Lin, G.S.](#); [Glass, J.D.](#); [Shumas, S.](#); [Scherer, S.S.](#); [Fischbeck, K.H.](#) A unique mutation in connexin32 associated with severe, early onset CMTX in a heterozygous female. [Ann. N. Y. Acad. Sci.](#), 14;883:481-4, 1999.
8. Lupski, J.R.; Oca-Luana, R.M.; Slaugenhaupt, S.; Pentao, L.; Guzzeta, V.; Trask, B.J.; Saucedo-Cardenass, O.; Barker, D.F.; Killian, J.M.; Garcia, C.A.; Chakravarti, A.; Patel, P.I. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, 66:219-232, 1991.
9. Marques, W.Jr.; Sweeney, M.; Wroe, S.J.; Wood, N.W. Central nervous system involvement in a new connexin 32 mutation affecting identical twins. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 66: 803-804, 1999.
10. Ng, P.C. and Henikoff, S. 2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31: 3812 -3814.
11. Rayemaekers, P.; Timmerman, V.; Nelis, E.; De Jonghe, P.; Hoogendijk, J.E.; Baas, F.; Barker, D.F.; Martin, J.J.; De Visser, M.; Bolhuis, P.A.; Van Broeckhoven, C. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). *Neuromuscul Disord.*, 1: 93-97, 1991.
12. Ramensky, V., Bork, P., and Sunyaev, S. 2002. Human non-synonymous SNPs: Server and survey. *Nucleic Acids Res.* 30: 3894 -3900.

13. FUQIANG GUO, YI SHI, YING LIN, XIAOQI LIU, BIN LIU, YING LIU, YANG YANG, , FANG LU, SHI MA, and ZHENGLIN YANG. Mutation in Connexin 32 causes Charcot-Marie-Tooth disease in a large family Chinese. *Muscle and Nerve*. 42: 715-721, 2010.
14. Hahn A.F., Ainsworth P.J., Naus C.C.G., Mao J., Bolton C.F. Clinical and Pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle and Nerve* S39-S48. 2000
15. [Anand G](#), [Maheshwari N](#), [Roberts D](#), [Padeniya A](#), [Hamilton-Ayers M](#), [van der Knaap M](#), [Fratter C](#), [Jayawant S](#). DEVELOPMENTAL MEDICINE & CHILD NEUROLOGY. Jul;52(7):677-9.2010
16. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;82:1359–400.
17. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228–32.