ROBERTO ROZENBERG

**ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE HEXA NA POPULAÇÃO
JUDAICA BRASILEIRA – AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DE UM PROGRAMA
PREVENTIVO DA DOENÇA DE TAY-SACHS**

São Paulo

2000

ROBERTO ROZENBERG

**ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE HEXA NA POPULAÇÃO
JUDAICA BRASILEIRA – AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DE UM PROGRAMA
PREVENTIVO DA DOENÇA DE TAY-SACHS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na
Área de Genética

Orientadora: Profa Dra Lygia da Veiga Pereira

São Paulo

2000

Rozenberg, Roberto.

Análise da incidência de mutações no gene HEXA na população judaica brasileira – avaliação da importância de um programa preventivo da doença de Tay-Sachs

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética.

1. Doença de Tay-Sachs 2. Triagem genética 3.
Gene HEXA I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética.

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira
Orientadora

Em primeiro lugar à Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira, por ter aceito o desafio e pela excelente orientação no decorrer desses anos.

Agradeço aos meus pais pela torcida, pelo orgulho e pela liberdade que sempre me transmitiram.

À estagiária Mailin Meisen pela amizade e pelo apoio no desenvolvimento do projeto de mestrado.

À Professora Feige Kaplan do “Hospital for Sick Children” da Universidade McGill de Montreal, pelo importante direcionamento da amostragem ao ensino médio.

Aos professores e diretores das escolas participantes, em especial à Evelina Holender e Sonia Heilman do Colégio IL Peretz, prof. Armando e profa. Joana do Colégio Bialik, profs. Marcos Ingelstein e Eva Chalfon do Colégio Renascença, prof. Jaime do Colégio Eliezer Steinbarg, e ao João, Osmar e profa. Lygia do Colégio Liessin.

Ao Dr Alexandre Ghelman pelo apoio voluntário à extensão do projeto às escolas do Rio de Janeiro.

À profa. Lea Pelleg, coordenadora do programa preventivo da DTS em Israel, pelas amostras fornecidas. A profa. Ruth Navon, pela recepção calorosa e pelos conhecimentos passados, sobre as descobertas e sobre a prevenção da DTS em Israel.

Ao professor Paulo Otto por ter transmitido tantos conhecimentos e por ter sido um forte exemplo profissional.

À Luciana Vasques pelo apoio nos procedimentos de biologia molecular.

Aos colegas de laboratório, Christian Merkel, Fernanda Barcellos, Fernanda Lima, Denilce Sumita, Jacaré, e professores Alexandre e Irina Kerkis e Marina Soukoian.

À Maraísa pela importante ajuda na formatação desta tese.

Aos funcionários do departamento de Genética do IB-USP, principalmente à Daysi, Helenice, Cícero e Paulo.

Ao professor Bernardo Beiguelman pela inspiração e pelas correções e revisões da tese. Ao Dr Mario Dolnikoff pelo apoio pessoal e acadêmico, literalmente desde que nasci.

Ao Dr Zan Moustachi pela amizade e pelo empurrão inicial sem o qual este projeto não teria se iniciado.

À Dra. Conceição Segres do Hospital Israelita Albert Einstein pela confiança depositada.

À Dra. Ana Paula Martins e ao pessoal do serviço de atendimento da Genética da Escola Paulista de Medicina.

Aos pais de pacientes estudados, pela boa vontade e pelo desejo de ajudar e de serem ajudados.

À Dra Dafne Horovitz pela sua prontidão em ajudar.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Enfim, à todos aqueles que tenham contribuído para a execução desta tese de mestrado.

Da: Dalton

kDa: kilo-Dalton

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxi-ribonucleotídeo

DPN: diagnóstico pré-natal

DTS: doença de Tay-Sachs (forma clássica, quando não for especificado tratar-se de outra forma)

EUA: Estados Unidos da América

h: hora

Kb: kilobase

M: molar

ml: mililitro

mM: milimolar

µg: microgramas

µl: microlitros

NaOH: Hidróxido de Sódio

NY: Nova York

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia da polimerase

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

rpm: rotações por minuto

TBE: tampão Tris-borato-EDTA

V: Volts

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e descrição da doença de Tay-Sachs (DTS)	1
1.2. Aspectos Bioquímicos	4
• Variantes de início juvenil e tardio da DTS	9
1.3. Genética Molecular	10
• Mutações no gene HEXA na população Ashkenazita	12
1.4. Programas preventivos da DTS	14
1.4.1. Histórico e impacto dos programas preventivos	16
1.4.2. O método enzimático de detecção de heterozigotos	23
• Restrições da especificidade do método enzimático.....	24
1.4.3. Diagnóstico molecular	25
2. OBJETIVO	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Amostragem	30
3.1.1. Palestras	30
3.1.2. Coleta	31
3.2. Preparo das amostras	31
3.2.1. Protocolo de extração de DNA de mucosa bucal	32
3.2.2. Método de análise das mutações	32
3.3 Envio de resultados	35
3.4. Análise estatística	36

4. RESULTADOS	37
4.1. Apresentação do programa a diferentes entidades comunitárias	37
4.2. Taxa de participação nas escolas	38
4.3. Estatísticas dos formulários	41
4.3.1. Questionário aos alunos	41
4.3.1.a) Conhecimento prévio da existência da doença	41
4.3.1.b) Familiaridade	42
4.3.1.c) Outras informações	43
4.3.1.d) Estimativa da fração Ashkenazita da amostra	44
4.3.2. Questionário aos pais	46
4.4. Análise de mutações	47
4.5. Resultados dos questionários de portadores	49
4.6. Retorno de famílias e participantes diversos	49
5. DISCUSSÃO	50
5.1. Frequência de portadores	50
5.2. O Diagnóstico Molecular	54
5.3. Uma abordagem não-alarmista da DTS no Brasil	58
5.4. O modelo preventivo canadense e a taxa de participação	62
5.5. Aspectos éticos da triagem genética	64

• Impacto de programas preventivos no ensino médio	67
5.6. Aspecto legal da triagem no Brasil	69
5.7. Inclusão de outras doenças no programa preventivo da DTS	70
5.8. Perspectivas futuras dos programas preventivos	71
 6. CONCLUSÕES	 74
 7. RESUMO	 75
 8. ABSTRACT	 77
 9. ANEXO	 79
 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e descrição da doença de Tay-Sachs (DTS)

A primeira descrição da doença de Tay-Sachs (DTS) data de 1881, feita por Warren Tay, um oftalmologista inglês, que observou uma lesão macular incomum numa criança de um ano de idade que sofria de fraqueza muscular. Ao exame oftalmológico ele encontrou “na região do ponto amarelo de cada olho, uma mancha branca conspícua, mais ou menos circular mostrando ao centro um ponto circular de coloração vermelho amarronzada, contrastando estranhamente com a área branca ao redor dele”.

Independentemente, o neurologista americano Bernard Sachs, 1887, descreveu o caso de uma criança com uma forma peculiar de deficiência mental e cegueira, que faleceu aos dois anos de idade. Ele descreveu o quadro clínico e incluiu os resultados da autopsia de seu primeiro paciente, entre os quais assinalou deformação craniana e malformações neuronais observadas microscopicamente. Segundo ele, o aumento de volume do cérebro era devido a tumefação ou “baloneamento” de células nervosas (revisado por Mange & Mange, 1989).

Kingdon (1892) sintetizou o trabalho dos dois autores (Tay e Sachs) e demonstrou que Tay havia apenas descrito manifestações clínicas e oculares da mesma doença (revisado por Slome, 1933). Sachs sugeriu posteriormente para essa doença, o nome idiotia amaurótica familiar (do grego *amaurosis*, escuridão) embora na atualidade seja tratada por doença de Tay-Sachs (DTS).

As lesões histológicas características do sistema nervoso nessa doença são corpos membranosos citoplasmáticos com inclusões em camadas. Em crianças afetadas por essa doença, acima dos 18 meses, o peso do cérebro pode ser de 20 a 50% maior do que o normal, devido à presença dessas inclusões no citoplasma de neurônios (Kolodny, 1979).

Slome (1933) apresentou um sumário dos dados de diferentes autores, de 1881 até 1923, somando 71 famílias descritas. A maioria das famílias era de origem judaica, fato que já havia sido notado por Sachs (1896). Nessa revisão, o autor percebeu que uma característica marcante da doença é a constância da idade de início e a uniformidade do progresso das manifestações clínicas. Na maioria dos casos não há associação com pré-maturidade e a gravidez é normal. A criança apresenta um desenvolvimento normal nos primeiros meses. Frequentemente, os primeiros sinais observados são a falta de tônus muscular, apatia, deficiência auditiva e visual, acompanhada de nistagmo. No primeiro ano de vida, a criança pode ser atraída pela luz e mover os olhos, seguindo objetos. Posteriormente, advém uma cegueira total. Em contraste com crianças normais, não há interesse no ambiente circundante, nem nos brinquedos. O paciente torna-se incapaz de manter a cabeça firme e de sentar e não aprende a falar. O estado mórbido progride até a perda total de movimentação. A criança torna-se letárgica e a morte advém tipicamente no segundo ano de vida. Na fase terminal a criança não se alimenta sem a ajuda de tubos, as convulsões, os problemas bronquiais e a pneumonia são típicos, assim como uma resposta de sobressalto a estímulos auditivos agudos (Slome, 1933; Mange & Mange, 1989; Gravel *et al.*, 1995).

Em casos duvidosos, o exame oftalmológico é um forte indicador da doença. À fundoscopia observa-se um ponto vermelho na retina. Essa mancha macular é devida a deposição lipídica nas células ganglionares da retina, o que desnuda a camada pigmentar subjacente (Kolodny, 1979). Embora não seja patognomônica, a mancha vermelho-cereja é encontrada em todos os pacientes com a forma clássica da DTS e da doença de Sandhoff, sendo um forte indício dessas doenças (Gravel *et al.*, 1995).

Em 1957 foi fundada nos EUA uma associação de pais de crianças afetadas pela DTS e doenças associadas (National Tay-Sachs Disease and Allied Disorders Association). Essa associação promoveu nos anos seguintes 5 simpósios sobre esfingolipidoses. De sua competência iniciaram-se os programas de prevenção da DTS.

Aronson e Volk (1962) analisaram dados de 219 casos de Tay-Sachs em 182 irmandades e compararam seus dados com 127 casos reunidos por Slome (1933), 99 casos coletados por Ktenidès (1954), 58 casos analisados geneticamente por Kozinn *et al.* (1957) e 45 casos de Tay-Sachs reunidos por Goldschmidt *et al.* (1956). Nessa coletânea de observações estavam ausentes a expressão da doença em abortos espontâneos, variantes clínicas significativas e associação familiar com outras malformações, anomalias ou doenças. A transmissão foi claramente reconhecida como autossômica recessiva sem preferência por sexos. Os parentes de afetados formavam uma população notavelmente saudável. Aproximadamente 10% dos afetados pela DTS não tinham ancestralidade judaica, entre os quais haviam crianças negróides. A

manifestação da doença não se modificava conforme a origem étnica do afetado (Aronson & Volk, 1962).

Em 165 casais de judeus norte-americanos com crianças afetadas, a taxa de consangüinidade observada foi de 1,8%, apenas levemente maior do que aquela encontrada na população em geral (Aronson & Volk, 1962).

Desde sua primeira descrição, os sinais e os sintomas da DTS permanecem os mesmos, e não há tratamento disponível. A freqüência de heterozigotos da DTS (também denominados portadores) na população judaica é de 1 a cada 31 indivíduos e a incidência da doença é de 1 caso a cada 4.000 nascimentos. Outras populações com incidência similar da doença são a população franco-canadense de Quebec e a população Cajun, na Louisiana, EUA. A freqüência gênica é 10 vezes maior nessas populações em risco e a incidência da doença chega a ser 100 vezes maior, fazendo com que a maioria dos casos da DTS fossem diagnosticados nessas populações, antes do estabelecimento de programas preventivos (Petersen *et al.* 1983; Kaback *et al.*, 1993).

1.2. Aspectos bioquímicos

A DTS pertence ao grupo de doenças do armazenamento lisossômico que compreende aproximadamente 40 doenças descritas, 7 das quais encontram-se com freqüência aumentada em judeus Ashkenazitas (do hebraico *Ashkenaz*, alemão - descendentes de judeus que habitaram as regiões centro e leste européias na Idade Média). Entre essas doenças destacam-se a DTS, a doença de Gaucher, a doença de Niemann-Pick e a mucopolipidose tipo IV. Essa maior

freqüência de doenças do armazenamento lisossômico pode ser devida a deriva genética ou a existência de vantagem heterozigótica (Zlotogora *et al.*, 1988). Essas doenças se caracterizam pelo acúmulo lisossômico de substratos não metabolizados devido à ausência de enzimas lisossômicas (Kolodny, 1992).

Um dos tipos de substrato, os esfingolipídeos, têm na alteração de sua rota metabólica uma série de distúrbios associados. Alguns desses distúrbios, como a DTS, são causados por erros no metabolismo de gangliosídeos.

Os gangliosídeos são macromoléculas oligossacarídicas sintetizadas pela adição ordenada de açúcares a uma longa cadeia lipídica ramificada denominada ceramida. Eles têm ocorrência quase que exclusiva no sistema nervoso central (Okada & O'Brien, 1969). No cérebro humano, pelo menos 12 diferentes gangliosídeos já foram identificados. Sua função biológica ainda não está caracterizada, mas é possível que sejam receptores de membrana, estando envolvidos em fenômenos de reconhecimento entre células, incluindo a sinaptogênese (Gravel *et al.*, 1995).

Entre as doenças do armazenamento lisossômico, a DTS pertence a um subgrupo de doenças denominadas gangliosidoses G_{M2} , incluindo as raras formas de início juvenil e tardio da DTS, a doença de Sandhoff e a deficiência de ativador do complexo gangliosídeo G_{M2} – hexosaminidase A. Nessas doenças o material de armazenamento lisossômico é o gangliosídeo G_{M2} {N-acetilgalactosaminil-(1-4)-galactosil-[(2-3)-N-acetilneuraminil]-galactosil-(1-4)-glucosil-(1-1)-(2-N-acil)-esfingosina}, cujo acúmulo maciço (até 400 vezes) leva ao aumento de volume ou “baloneamento” de neurônios, observado em todos os doentes (O'Brien *et al.*, 1970).

Na DTS o acúmulo do gangliosídeo G_{M2} é causado pela falta de atividade ou ausência da enzima β -hexosaminidase A (Hex A), que normalmente remove a porção sacarídica terminal (hexosamina) do restante da molécula, iniciando a degradação do gangliosídeo G_{M2} (Figura 1).

Modificado de Mange & Mange, 1989

Figura 1. O gangliosídeo G_{M2} .

Dois componentes com atividade de hexosaminidase, separáveis por eletroforese em gel de amido, estão presentes nos tecidos humanos, a Hex A e a hexosaminidase B (Hex B). Em pacientes com a DTS, a atividade da Hex A está ausente no cérebro, fígado, rins, pele, culturas de fibroblastos, plasma sanguíneo e leucócitos. Conforme observado na primeira descrição da Hex A (Okada & O'Brien, 1969), a quantificação da atividade dessa enzima viria possibilitar o diagnóstico de indivíduos homozigotos e heterozigotos para a DTS.

As hexosaminidases são glicoproteínas sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático e processadas através do complexo de Golgi (Gravel *et al.*, 1995). A Hex A é um heterodímero, composto de uma cadeia α e uma cadeia β (que pode ser β -A ou β -B). A Hex B é um homodímero formado por duas cadeias β . As duas cadeias β (A e B) derivam da clivagem de uma mesma cadeia precursora (Pennybacker *et al.*, 1996).

A função da Hex A é degradar o gangliosídeo G_{M2} e uma variedade de outras moléculas mais raras contendo N-acetil-hexosaminas, no cérebro e em outros tecidos. A deficiência ou ausência da cadeia α gera deficiência ou ausência da Hex A, com conseqüente acúmulo lisossômico do gangliosídeo G_{M2} , levando à DTS. Os mecanismos patogênicos da DTS pelos quais o acúmulo gangliosídico levam à disfunção neuronal não estão totalmente esclarecidos (Gravel *et al.*, 1995).

Para hidrolisar o gangliosídeo G_{M2} , a Hex A requer a ligação de um ativador protéico de 17 kDa (Kytzia & Sandhoff, 1985; Pennybacker *et al.*, 1996). Essa proteína glicolípídica de transporte atua como co-fator substrato específico para a

enzima. Na presença da sub-unidade α da Hex A, a proteína ativadora solubiliza o gangliosídeo G_{M2} , formando com esses um complexo ternário (Yadao *et al.*, 1997) (Figura 2).

A deficiência de qualquer uma das três proteínas que participam da degradação do gangliosídeo G_{M2} (sub-unidades α e β da Hex A e proteína ativadora) levam ao armazenamento lisossômico desse, primariamente em células nervosas, causando uma das gangliosidoses G_{M2} (Mahuran, 1999). Esse grupo de doenças inclui a DTS e suas formas de início posterior, a variante AB da DTS (deficiência de ativador), a variante B1 da DTS (deficiência no sítio ativo da cadeia α) e a doença de Sandhoff (ausência da cadeia β), todas com manifestações e progressão similares (Tabela 1 e Figura 2). À exceção da forma clássica da DTS, todas as gangliosidoses G_{M2} são extremamente raras, com incidência populacional na ordem de 1 em 10.000 a 1 em 100.000 indivíduos.

Tabela 1: Variantes das gangliosidoses G_{M2} .

NOME		Hex A	Hex B	Ativador	GENE e Loci	Produto alterado ou ausente
Variante B	DTS	-	+	+	HEXA 15q23-q24	Cadeia alfa (Hex A)
Variante 0	Doença de Sandhoff	-	-	+	HEXB 5q13	Cadeia beta (Hex A e B)
Variante AB	Deficiência de ativador	+	+	-	GM2A 5q31.3-q33.1	Ativador
Variante B1	Variante pseudo AB	+	+	+	HEXA 15q23-q24	Sítio ativo da Cadeia alfa

Modificado de Thompson & Thompson, 1991

Figura 2. As gangliosidoses G_{M2} .

- **Variantes de início juvenil e tardio da DTS**

A deficiência parcial da Hex A está relacionada a formas raras e menos graves da DTS, conhecidas como forma juvenil (ou sub-aguda) e variante de início tardio (ou crônica) (Hechtman & Kaplan, 1993; Gravel *et al.*, 1995).

Ao passo que pacientes da forma clássica da DTS morrem antes dos 5 anos de idade, pacientes com a variante juvenil têm sobrevida prolongada, geralmente até os 15 anos de idade. Na variante de início tardio, os primeiros sinais da doença (degeneração cerebelar, do trato piramidal, do neurônio motor inferior e psicose em alguns casos) aparecem na segunda ou terceira década de vida (Navon *et al.*, 1986; Navon & Proia, 1989). A maior incidência dessa variante na população Ashkenazita é decorrente da alta frequência dos alelos causadores da forma clássica da DTS, possibilitando a formação de heterozigotos compostos, que apresentam produção enzimática e quadro clínico concordantes com a mutação de efeito menos grave (Navon *et al.*, 1986).

A correlação entre o nível de atividade enzimática residual e a gravidade clínica da DTS é: 0,1% da atividade normal: forma clássica; 0,5%: variante juvenil; 2 a 4%: variante de início tardio; 11% a 20%: pessoas saudáveis com baixa hexosaminidase (Conzelmann *et al.*, 1983).

A forma clássica, denominada simplesmente DTS, representa a imensa maioria dos casos. Na população judaica Ashkenazita 98% dos casos da DTS são da forma clássica.

1.3. Genética molecular

A sub-unidade alfa da Hex A é codificada pelo gene HEXA localizado em 15q23-q24 (Takeda *et al.*, 1990; Nakai *et al.*, 1991). É nesse gene apenas que se localizam as mutações causadoras da DTS.

O gene HEXA contém aproximadamente 35 kb organizados em 14 exons. A sequência codificadora tem 1.587 pb e origina uma forma precursora da Hex A, um polipeptídeo de 529 aminoácidos e peso molecular de 60.688 Da. (Myerowitz *et al.*, 1985; Proia & Soravia, 1987).

Mutações no gene HEXA podem causar deficiência ou ausência da cadeia α da Hex A. Mutações no sítio catalítico ativo da Hex A localizado no aminoácido 323 determinam a variante B1 das gangliosidoses G_{M2} (Tabela 1).

O gene HEXB, codificador da cadeia beta, localiza-se em 5q13 (Dana & Wasmuth, 1982). Mutações no gene HEXB, podem causar deficiência ou ausência da cadeia beta e das hexosaminidases A e B, levando à doença de Sandhoff (ou variante 0 das gangliosidoses G_{M2}).

O gene GM2A, codificador da proteína ativadora do complexo Hex A - gangliosídeo G_{M2} , localiza-se em 5q31.3-q33.1 (Heng *et al.*, 1993; Swallow *et al.*, 1993). Mutações que comprometam a atividade da proteína ativadora causam a rara variante AB das gangliosidoses G_{M2} (Tabela 1).

Os 529 aminoácidos da Hex A dividem-se em regiões funcionais, sendo um peptídeo sinalizador (aminoácidos 1 a 22), um pró-peptídeo (23-108) e a cadeia da Hex A (109-529). Dois carboidratos estão localizados nos sítios 157 e 225. Os sítios de 1 a 191 e 403 a 529 conferem à sub-unidade alfa sua atividade específica contra substratos sulfatados. Um sítio ativo está localizado no aminoácido 323 (Pennybaker *et al.*, 1996).

- **Mutações no gene HEXA na população Ashkenazita**

Até 1998, mais de 80 mutações no gene HEXA causadoras da DTS já haviam sido descritas (Kaplan, 1998). Embora muitas dessas mutações encontrem-se em populações específicas, a maioria delas aparece em famílias isoladas e causam a forma clássica da DTS.

Na população judaica Ashkenazita a mutação causadora da DTS mais freqüente é uma inserção de 4 pares de base (TATC) no exon 11 (InsTATC1278) do gene HEXA. Essa mutação introduz um sinal de término de tradução prematuro, 9 nucleotídeos após a inserção, resultando nesse caso numa deficiência de RNAm (Myerowitz e Costigan, 1988; Fernandes *et al.*, 1997). Aproximadamente 80% dos portadores Ashkenazitas apresentam essa mutação.

A segunda mutação mais freqüente no gene HEXA, causadora da DTS em Ashkenazitas, é a mutação pontual IVS12+1. A alteração, uma transversão G para C no primeiro nucleotídeo do íntron 12 (sítio doador de “splicing” 5'), causa um processamento de RNAm defeituoso (Arpaia *et al.*, 1988; Ohno & Suzuki, 1988). O RNAm é dificilmente detectado, apresentando transcritos anormais, com o exon 12 deletado ou com o íntron 12 incluído (Kaplan, 1998). Essa mutação foi encontrada em aproximadamente 18% dos alelos de Tay-Sachs examinados em pacientes e portadores Ashkenazitas, e em nenhum controle (não-portadores pelo método enzimático). Ela está distribuída igualmente nas populações judaicas Ashkenazitas e não-Ashkenazitas (Peleg *et al.*, 1994). Muitos casos da forma clássica da DTS em Ashkenazitas são heterozigotos para InsTATC1278 e IVS12+1.

Uma substituição de glicina por serina na posição 269 da sub-unidade α da Hex A (Gli269Ser) resulta de uma transição de guanina para adenina no último nucleotídeo (g805) do extremo 3' do exon 7, levando à variante de início tardio da DTS (Navon & Proia, 1989; Paw *et al.*, 1989). Nos casos da DTS de início tardio em Ashkenazitas, essa mutação foi sempre encontrada em heterozigotos compostos, com InsTATC1278 ou IVS12+1. A homozigose dessa mutação foi observada em pacientes não-judeus, com início tardio e manifestações clínicas menos graves (Navon *et al.*, 1990). Na população judaica Ashkenazita, essa mutação está presente em 2% dos casos da DTS. A alteração não afeta diretamente a dimerização da sub-unidade alfa, mas desestabiliza sua conformação terciária (Brown & Mahuran, 1993).

Em conjunto, as 3 principais mutações (InsTATC1278, IVS12+1 e Gli269Ser) estão presentes em 98% dos casos da DTS na população judaica Ashkenazita (Paw *et al.*, 1990; Triggs-Raine *et al.*, 1990; Grebner e Tomczak, 1991; Landels *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 1992b; Yoo *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 1994).

Uma mutação benigna (Arg247Trp) está presente em 2% dos portadores Ashkenazitas identificados através do diagnóstico enzimático, descrito adiante, em programas de triagem populacional. Uma vez que a mutação não afeta a atividade da Hex A contra o gangliosídeo G_{M2} mas sim contra o substrato artificial utilizado no diagnóstico enzimático, esses indivíduos são erroneamente diagnosticados como portadores de mutações causadoras da DTS (resultado falso-positivo). Entre não-judeus identificados como portadores pelo diagnóstico enzimático, essa

mutação está presente em 36% dos casos (Triggs-Raine *et al.*, 1995; DeMarchi *et al.*, 1996).

Além das três mutações principais em Ashkenazitas (InsTATC1278, IVS12+1 e Gli269Ser) e da mutação benigna (Arg247Trp), apenas duas outras mutações causadoras da DTS foram descritas em judeus Ashkenazitas até 1998, embora outras mutações tenham sido descritas em pacientes judeus não-Ashkenazitas (Kaplan, 1998). Uma das mutações é uma alteração pontual (Trp392) resultando num códon de parada e causando a forma infantil da DTS (Shore *et al.*, 1992). A outra mutação (Tir180His) causou a forma crônica da DTS (De Gasperi *et al.*, 1996).

Embora inicialmente se tenha suposto que a miscigenação de judeus Ashkenazitas com a população franco-canadense introduziu a DTS nessa última, a principal mutação encontrada em portadores da DTS na população franco-canadense de Quebec é diferente daquelas encontradas em Ashkenazitas. Trata-se de uma deleção de 7,6 kb, incluindo todo o exon 1 (Myerowitz & Hogikyan, 1986). Essa mutação é encontrada em mais de 80% dos alelos de casos diagnosticados em franco-canadenses, cuja frequência de heterozigotos da DTS é a mesma da população judaica Ashkenazita, isto é, aproximadamente 1 em cada 30 indivíduos (Hechtman *et al.*, 1990).

1.4. Programas preventivos da DTS

O desenvolvimento do diagnóstico pré-natal (DPN) para a DTS em 1969 (Schneck, 1970; O'Brien *et al.*, 1971) e, subseqüentemente, do teste de detecção

de heterozigotos (O'Brien *et al.*, 1970; Kaback, 1972) possibilitou o início de programas de detecção e orientação para portadores de mutações causadoras da DTS. Devido à maior incidência da doença em populações específicas e ausência de cura para a doença, esses programas passaram a ser desenvolvidos desde o início da década de 70 na população judaica dos EUA, Israel e Canadá. Nesse último país, o programa é dirigido também à população franco-canadense de Quebec. Atualmente, o teste de detecção de portadores da DTS é procedimento comum na maioria das comunidades judaicas Ashkenazitas (Kaplan, 1998).

Através dos testes de detecção de portadores, casais em risco podem ser identificados antes de terem uma criança afetada. Na sua maioria, os casais em risco optam pelo DPN, seguido de interrupção de gravidez no caso do feto ser afetado pela DTS. Apesar desse aspecto seletivo, como consequência desses programas, casais em risco passaram a ter mais filhos (Kaback *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1996). As outras opções para casais em risco incluem a abstenção reprodutiva, “correr o risco”, a adoção, a utilização de gametas de doadores testados e mais recentemente o diagnóstico pré-implantação (Fasouliotis & Schenker, 1998).

Desde que o DPN tornou-se disponível para casais em risco, e com o início desses programas preventivos a incidência da doença (aproximadamente 1 a cada 4.000 nascimentos na população em risco) foi reduzida em 90% (Kaback *et al.*, 1993).

1.4.1. Histórico e impacto dos programas preventivos

Em 1962, Myrianthopoulos afirmou que a detecção de heterozigotos (desenvolvida 8 anos depois) viria a ajudar no entendimento da genética populacional da DTS. Porém, não havia ainda uma intenção de desenvolver programas preventivos.

Em 1969, o primeiro DPN da DTS foi realizado por amniocentese e exame da atividade da Hex A numa mulher que já havia tido uma criança afetada por essa doença (Schneck, 1970). Os exames indicaram que o feto era afetado e a gravidez foi interrompida. O diagnóstico foi confirmado por biópsia de material do aborto, onde se encontrou acúmulo maciço do gangliosídeo G_{M2} incluído nos corpos citoplasmáticos característicos. O autor concluiu que, caso estudos adicionais consolidassem suas observações preliminares, o aconselhamento genético efetivo e esclarecedor para mães de crianças afetadas pela DTS estaria disponível.

Em 1971, foi realizado o monitoramento por amniocentese de 15 mulheres grávidas, de casais que já haviam tido uma criança afetada pela DTS (O'Brien *et al.*, 1971). Após exames no material de abortos e em crianças saudáveis nascidas, os autores concluíram que o DPN era viável, pois não foram encontrados erros. Sendo a doença incurável, a importância imediata do diagnóstico pré-natal era permitir a casais que já haviam gerado uma criança afetada pela DTS, evitar a recorrência da doença nos seus próximos filhos. O programa preventivo surgiu da dedução imediata dos autores:

“O diagnóstico pré-natal da DTS é limitado aos pais nos quais uma criança afetada por essa doença tenha sido diagnosticada. Num estudo de 88 famílias nas quais a doença ocorreu, 82% dos casos eram no primeiro filho. O primeiro filho afetado só pode ser detectado no exame pré-natal caso seus pais tenham sido identificados como heterozigotos antes de se reproduzirem... Para detectar no pré-natal todos os casos da DTS (e não apenas os de irmãos mais novos de afetados), será necessária triagem populacional maciça para identificação de heterozigotos, possível agora pela automação do teste de hexosaminidase A,” (O'Brien *et al.*, 1971).

O primeiro programa de orientação para portadores da DTS foi experimentado nas comunidades judaicas de Washington e Baltimore, em 2 de Maio de 1971, após 14 meses de elaboração (Kaback & Zeiger, 1972). Segundo os autores, 3 pré-requisitos possibilitaram o início do programa: (1) a incidência da doença numa população específica (judeus Ashkenazitas); (2) o desenvolvimento de um teste simples, preciso e econômico para detecção de portadores de mutações causadoras da doença; e (3) a existência de DPN (inicialmente, amniocentese no segundo trimestre) para detectar a DTS em fetos antes da 18ª semana de gestação. Até 1972, outros 8 programas foram conduzidos, totalizando cerca de 7.000 indivíduos testados. Os resultados combinados das primeiras experiências indicaram na amostra uma freqüência de portadores de 0,0316 ou aproximadamente 1 em cada 32 indivíduos. Esse valor estava próximo aos dados estimados antes dos programas preventivos, a partir da incidência populacional (Myrianthopoulos & Aronson, 1966). Atualmente, a freqüência de portadores da

DTS é estimada em 1 em cada 31 indivíduos na população judaica (Kaback *et al.*, 1993).

Mais de 50 laboratórios especializados em todo mundo realizam teste para portadores da DTS, promovidos por diversos programas preventivos (Kaback *et al.*, 1993). Entre as preocupações iniciais desses programas pioneiros, estavam a necessidade de informar e educar eficientemente a população em risco, aplicar métodos automatizados e padronizados de detecção em larga escala, possuir um aspecto econômico favorável e avaliar o impacto sobre a frequência gênica na população em risco (Kaback & Zeiger, 1972).

Na metade da década de 70, um centro de coleta de dados mundiais e de controle de qualidade dos laboratórios que realizavam teste enzimático da DTS foi fundado na Califórnia (International Tay-Sachs Disease Testing, Quality Control and Data Collection Center). Até 1992, aproximadamente 1.000.000 de pessoas já haviam sido testadas, em 57 centros especializados em diversos países. Os resultados mundiais dessa experiência de 22 anos estão apresentados na Tabela 2 (Kaback *et al.*, 1993). Mais de 1.000 casais em risco foram encontrados dentre 36.418 heterozigotos identificados. Nenhum desses casais havia tido uma criança afetada antes. Aproximadamente 62.000 pessoas são testadas anualmente, sendo 57% delas nos EUA.

Tabela 2: Resultados mundiais da detecção de heterozigotos da DTS, de 1971 a 1992.

País	Nº de testados	Portadores	Casais em risco
EUA	712.818	27.150	657
Israel	159.544	4.229	263
Canadá	55.922	2.922	57
África do Sul	11.638	1.286	36
Europa	10.927	725	21
Brasil, México	1.682	96	20
Austrália	473	10	2
TOTAL	953.004	36.418	1.056

Kaback et al., 1993

Desde 1969, quando o primeiro DPN da DTS foi realizado, até 1992, um total de 2.416 gestações em risco foram monitoradas por amniocentese ou por exame de vilo coriônico. Os resultados desses diagnósticos estão apresentados na Tabela 3. Como se pode observar, mais gravidezes foram monitoradas por indicação dos programas preventivos (1.298) do que em famílias que já tinham tido uma criança afetada (1.118). Essa transição na indicação do DPN ocorreu no decorrer dos anos com a manutenção dos programas de triagem populacional (Kaback *et al.*, 1993).

Na ausência de programas preventivos, muitos desses casais em risco teriam tido crianças afetadas, para depois buscar o DPN. Assim, torna-se claro que o objetivo e o efeito desses programas é antecipar a busca de alternativas para os casais em risco, antes que tenham uma criança afetada pela DTS.

Na Tabela 3 observa-se que aproximadamente 25% dos fetos (268/1118) de casais de portadores obrigatórios, ou seja, aqueles casais com filhos previamente afetados pela DTS, eram afetados pela mesma doença, como esperado. No entanto, a proporção é significativamente menor entre casais identificados em programas preventivos (201/1298). Isto se dá, devido a resultados falso-positivos nos testes enzimáticos, o que será discutido adiante, e também à indicação de DPN para casais com indivíduos que apresentaram resultados inconclusivos nos testes enzimáticos.

Kaback *et al.* (1993) chamam atenção para o fato que das 1.881 crianças nascidas normais, muitas poderiam nunca ter sido concebidas, como indicado por estudos demonstrando que diversos casais apresentavam abstenção reprodutiva após terem crianças afetadas (Myrianthopoulos & Aronson, 1967).

Tabela 3: Resultados mundiais do DPN da DTS, de 1962 a 1992.

	Casais em risco detectados		TOTAL
	devido a filho afetado	em programas de triagem	
Gravidezes monitoradas (DPN)	1.118	1.298	2.416
Fetos afetados	268	201	469
Interrupções de gravidez	250	201	451*
Fetos afetados não diagnosticados	2	1	3
Crianças normais	827	1.054	1.881

Kaback et al., 1993

*18 crianças afetadas nascidas (início dos anos 70) conforme previsto, devido a um diagnóstico tardio, impossibilitando a interrupção, ou por se tratarem de casais ultra-ortodoxos.

A Figura 3 mostra os resultados anuais e o declínio na incidência da DTS. Desde o desenvolvimento do DPN e dos programas de triagem populacional, a redução na incidência da doença foi maior do que 90% na população judaica. Embora os programas estivessem abertos a quaisquer indivíduos que quisessem ser examinados, o direcionamento do programa a uma população específica tem como consequência a redução na incidência, exclusivamente nessa população. Ao passo que até 1970, as crianças judias com DTS representavam 85% dos casos, atualmente há 3 ou 4 vezes mais casos sendo diagnosticados na população em geral (Kaback *et al.*, 1993).

Enquanto os primeiros programas preventivos buscavam testar indivíduos casados, o programa canadense no qual este trabalho se baseou é desenvolvido em Montreal há mais de 25 anos e está dirigido a alunos de ensino médio (Mitchell *et al.*, 1996). Entre 1972 e 1992, 14.844 estudantes judeus Ashkenazitas foram voluntariamente testados, dos quais 521 (1 em 29) eram portadores. Todos os casais que atualmente buscam DPN para a DTS em Montreal foram identificados nesse programa, ao passo que no início do programa, a motivação era sempre histórico-familiar. A incidência da doença caiu em 90%, como consequência do programa preventivo e, igualmente, de uma redução na taxa de natalidade. Esse programa é desenvolvido juntamente a um programa de triagem para a β -thalassemia, que tem resultados semelhantes. As taxas de miscigenação das populações participantes (população judaica Ashkenazita para a DTS, italianos e gregos para β -thalassemia) é de 25% (Mitchell *et al.*, 1996).

Outra abordagem à triagem de portadores é aquela desenvolvida em judeus ultra-ortodoxos em que os testes são realizados no período pré-nupcial e o resultado é utilizado confidencialmente para seleção de parceiros. Esse programa evita procedimentos anticoncepcionais que apresentam restrições religiosas e está baseado na existência de casamentos arranjados (Kleinman, 1992; Bach, 1993). Esse programa, chamado *Dor Yeshorim*, testa 8.000 participantes por ano nos EUA e Israel. Em 1993, triagem de fibrose cística foi incluída e em 1995, a doença de Canavan e a anemia de Fanconi tipo C foram incluídas. Até dezembro de 1997, 80.000 pessoas foram testadas para a DTS (Levin, 1999).

Figura 3: Incidência anual de novos casos da forma clássica da DTS nos EUA e Canadá (Kaback *et al.*, 1993).

1.4.2. O método enzimático de detecção de heterozigotos

O método enzimático de detecção de heterozigotos consiste em quantificar a hexosaminidase total e separada (A e B) do soro ou de leucócitos (Okada e O'Brien, 1969; O'Brien *et al.*, 1970; Kaback, 1972). Entre não-portadores, a Hex A compõe de metade a dois terços da atividade de hexosaminidase total (Kolodny, 1979). Nos portadores de mutações no gene HEXA espera-se uma redução na atividade da Hex A, em relação à Hex B.

A atividade de hexosaminidase pode ser medida com o uso do substrato artificial 4-metil-umbeliferil-N-acetil-glucosamina (4-MUG), detectável por fluorometria. Uma vez que a Hex B é termoestável e a Hex A é sensível ao calor, sendo inativada a 50°C, a atividade da Hex A é estimada como sendo a fração da atividade total perdida após desnaturação por calor. O resultado dessas análises depende do estabelecimento de domínios estatísticos para homozigotos normais (Hex A corresponde a 65-80% da atividade total), heterozigotos (25 a 60% de Hex A) e uma extensão inconclusiva (60 a 65% de Hex A), podendo variar em diferentes laboratórios (Hechtman & Kaplan, 1993).

Embora o diagnóstico apresente resultados inconclusivos, a sensibilidade (habilidade de detectar portadores) e a especificidade (habilidade de excluir não-portadores) são suficientes para justificar um programa de detecção baseado nesta metodologia, como tem ocorrido (Kaback *et al.*, 1993).

- **Restrições da especificidade do método enzimático**

Durante o desenvolvimento do método enzimático de detecção de heterozigotos da DTS, ficou claro que o método não fornecia conclusão confiável em casos de gravidez, diabetes, pós-natalidade, uso de pílulas anticoncepcionais, alguns medicamentos e algumas doenças neurodegenerativas, apresentando resultados falso-positivos (O'Brien & Okada, 1970; Kaback & Zeiger, 1972; Kaplan, 1998). Nesses casos estavam indicados exames de leucócitos (Kaback & Zeiger, 1972) e, atualmente, o diagnóstico molecular também oferece uma alternativa com maior especificidade (Hechtman & Kaplan, 1993).

Heterozigotos que possuem um alelo para deficiência de Hex A benigna (também denominado alelo de pseudodeficiência ou alelo com mutação benigna) não podem ser diferenciados de portadores de alelos causadores da DTS pelo teste enzimático padrão. Esses indivíduos são falso-positivos, quando testados pelo método enzimático. Mutações benignas apresentam maior probabilidade de serem encontradas em loci nos quais apenas a atividade parcial é necessária para um fenótipo normal, como é o caso do sistema da hexosaminidase (Triggs-Raine, 1995). Elas estão presentes em aproximadamente 2% dos portadores judeus e 36% dos portadores não-judeus da DTS, identificados pelo método enzimático (Triggs-Raine, 1995; DeMarchi *et al.*, 1996).

A alta incidência de indivíduos portadores de mutações benignas entre não-judeus (falso-positivos nos exames enzimáticos) explica a frequência aumentada de portadores (1/167) encontrada entre não-judeus nos programas de triagem mundiais. Essa frequência é maior do que a estimada (1/300), baseada na

incidência populacional da DTS (Kaplan, 1998). De fato, os dados corrigidos dos programas de triagem mundiais, eliminando-se os 36% de falso-positivos, indicam uma frequência de portadores de 1 em 277 entre não-judeus (Kaback *et al.*, 1993).

Quando o teste enzimático indica heterozigose ou homozigose para mutações na sub-unidade alfa da Hex A, a análise de mutações é indicada para um aconselhamento genético mais preciso e para excluir a hipótese de um alelo de pseudodeficiência, biologicamente benigno (Gravel *et al.*, 1995). O surgimento do diagnóstico molecular, como discutido adiante, veio oferecer uma metodologia capaz de aumentar o valor preditivo dos exames enzimáticos quando usados ambos os métodos diagnósticos, ou uma alternativa mais simples para esses exames, quando usado apenas diagnóstico molecular.

1.4.3. Diagnóstico molecular

Durante 20 anos os testes para portadores de mutações causadoras da DTS foram realizados através do método enzimático. Com a elucidação das principais mutações causadoras da DTS na população judaica Ashkenazita, foi sugerida a implantação de diagnóstico molecular em adição ao teste enzimático nos programas preventivos já que 3 mutações mostraram-se responsáveis por 98% dos casos da doença (Paw *et al.*, 1990; Triggs-Raine *et al.*, 1990; Grebner e Tomczak, 1991; Landels *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 1992b; Yoo *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 1994).

Visando avaliar e comparar os métodos enzimático e molecular de diagnóstico de portadores da DTS, o teste de DNA foi aplicado por Triggs-Raine *et*

al. (1990) em portadores obrigatórios, e em portadores e não-portadores identificados pelo diagnóstico enzimático. A sensibilidade e a especificidade do diagnóstico molecular justificaram sua implementação. A conclusão da pesquisa foi que a confiabilidade e “a simplicidade do teste de DNA irá permitir que seja executado em pequenos centros sem a necessidade de se manter o rigoroso controle de qualidade exigido para o exame enzimático” (Mahuran *et al.*, 1990; Triggs-Raine *et al.*, 1990), justificando a detecção de heterozigotos na população Ashkenazita através do diagnóstico molecular apenas.

A combinação dos resultados de diferentes estudos comparativos do método enzimático e do teste de DNA em Ashkenazitas está esquematizada na Tabela 4.

Visando determinar a especificidade do diagnóstico molecular, diversos trabalhos analisaram dados de portadores obrigatórios. Os trabalhos combinados, indicaram que a frequência das três principais mutações, entre 176 portadores obrigatórios nessa população foi 98% (173/176) (Triggs-Raine *et al.*, 1990; Landels *et al.*, 1990; Kaback *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 1994).

Contrastando com esse dado, observa-se na Tabela 4, que a frequência das três principais mutações, entre 565 portadores detectados pelo método enzimático foi 90% (511/565). Os dados obtidos a partir de portadores obrigatórios estão mais próximos do valor real, uma vez que os cerca de 10% de mutações não identificadas na Tabela 4, incluem:

- 1) Mutações benignas (positivas no teste enzimático) ~2% (Triggs-Raine *et al.*, 1995).
- 2) Mutações (não-benignas) além das 3 principais ~2% (3/129) (Gravel *et al.*, 1995).
- 3) Falso-positivos do teste enzimático (Kaback *et al.*, 1993).

Tabela 4: Análise da presença das 3 principais mutações causadoras da DTS entre portadores, não-portadores e indivíduos com resultado inconclusivo identificados pelo teste enzimático.

Referência	Método enzimático	Classificação pelo				
		Análise de DNA				Não detectada
		InsTATC1278	IVS12+1	Gli269Ser		
Fernandes <i>et al.</i> , 1992b *	Não-portador	49	2			
	Inconclusivo	1	1			
	Portador	28	22	4	1	1
Triggs-Raine <i>et al.</i> , 1990 **	Não-portador	152	1			
	Portador	216	140	32	5	39
Paw <i>et al.</i> , 1990 **	Portador	139	114	14	4	7
Grebner & Tomczak, 1991 **	Portador	122	89	21	5	7
Yoo <i>et al.</i> , 1993 ***	Inconclusivo	36	2			
	Portador	34	29	4	1	
Landels <i>et al.</i> , 1991**	Portador	26	23	3		
Frequência relativa das mutações			0,742	0,137	0,028	0,095

Modificado de Fernandes et al., 1992b

* exame sorológico; ** exame no soro e em leucócitos; *** exame em leucócitos

Em relação à sensibilidade do método enzimático, a coletânea de trabalhos apresentados na Tabela 4 mostra que foram encontrados 3 portadores de mutações causadoras da DTS, erroneamente diagnosticados como não-portadores, ou seja, falso-negativos pelo método enzimático. Assim, nenhum dos

métodos apresenta sensibilidade de 100%, já que ficou demonstrado que existiam casos de falso-negativos no método enzimático por razões desconhecidas (Fernandes *et al.*, 1992b) e no método molecular, devido a mutações raras ou não identificadas, além das 3 principais descritas. Os dados apresentados indicam sensibilidade de 98% no diagnóstico molecular, similar à do diagnóstico enzimático. Em relação à especificidade, enquanto o método molecular não fornece resultados falso-positivos, o método enzimático pode apresentar diferentes valores conforme as condições da amostra, variando entre 92 e 98%.

Os programas preventivos procuram favorecer a sensibilidade dos testes e considerar como portadores indivíduos diagnosticados enzimaticamente como tal, mas sem mutação identificada (Kaback *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1993).

A melhor estratégia de detecção é provavelmente uma combinação do método enzimático e molecular (Fernandes *et al.*, 1992b; Triggs-Raine *et al.*, 1992). De fato, o diagnóstico molecular foi adicionalmente instituído em muitos programas preventivos da DTS (Yoo *et al.*, 1993).

A frequência relativa das mutações nas populações judaicas Ashkenazitas variaram pouco em diferentes regiões geográficas. Frequências similares foram encontradas em Montreal, Toronto, Boston, Filadélfia, Los Angeles, Nova York e Reino Unido (Fernandes *et al.*, 1992b e Tabela 4). Em conjunto, os dados dos diferentes estudos colaborativos indicaram uma proporção entre as mutações identificadas de 82% - InsTATC1278, 15% - IVS12+1 e 3% - G269S (Tabela 4).

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a necessidade e a aceitação de um programa de orientação para portadores de mutações causadoras da DTS na população judaica brasileira.

Para atingir este objetivo foi determinada a frequência das 3 principais mutações do gene HEXA numa amostra da população judaica brasileira, formada por alunos de 3^o ano do ensino médio de escolas judaicas. Avaliou-se a taxa de participação voluntária na pesquisa, e as respostas dos formulários de consentimento preenchidos pelos participantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Um programa de detecção e orientação de portadores da DTS foi apresentado para escolas judaicas brasileiras e outras instituições comunitárias.

Os participantes foram principalmente alunos de escolas judaicas e o projeto teve 5 fases principais: (1) apresentação do programa para a diretoria das escolas judaicas (2) agendamento das atividades nas escolas participantes; (3) palestras sobre a DTS para alunos de 3º ano do ensino médio; (4) sessões de coleta de DNA por raspagem de mucosa bucal nos voluntários e; (5) realização dos exames e envio de resultados.

O contato com as escolas foi estabelecido através de uma visita e uma carta de apresentação do projeto de pesquisa. Para as escolas o projeto requisitou uma aula do período letivo, uma sala para as sessões de coleta e a participação do orientador educacional.

3.1.1. Palestras

Para cada escola, uma ou duas palestras foram ministradas a cada ano, conforme o número de salas de 3º ano. Procurou-se apresentar as palestras após os alunos aprenderem “Genética” na disciplina de Biologia.

As palestras tiveram duração de aproximadamente uma hora. Os orientadores educacionais das escolas foram solicitados a acompanhar as

apresentações. O conteúdo da palestra foi uma introdução sobre mecanismos de herança genética, principalmente a herança recessiva e uma apresentação da DTS, seus aspectos clínicos, populacionais e preventivos. Ao final da palestra foi oferecida aos alunos a possibilidade de se testarem quanto à presença de mutações causadoras da DTS. Para tal, formulários de consentimento numerados foram distribuídos para todos os alunos presentes (ANEXO).

3.1.2. Coleta

Aproximadamente uma semana após a palestra, as sessões de coleta ocorreram nas escolas. Os alunos que desejaram participar foram solicitados a comparecer aos pares e esclarecer dúvidas. Os formulários foram recebidos e o endereço foi verificado.

A coleta foi feita raspando-se a mucosa bucal durante alguns segundos com um cotonete. O cotonete foi mergulhado em 600 µl de NaOH 50 mM contidos num tubo eppendorf de 1 ml. A parte do cotonete que ficava para fora era cortada com uma tesoura esterilizada em álcool, o tubo era fechado e numerado com a senha do formulário daquele aluno.

3.2. Preparo das amostras

Após a coleta e o recebimento dos formulários preenchidos pelos alunos e pelos pais, procedeu-se à extração de DNA e análise de mutações das amostras numeradas, no laboratório.

3.2.1. Protocolo de extração de DNA de mucosa bucal (Richards *et al.*, 1993)

1. Adicionar 600 µl de NaOH 50 mM a um eppendorf de 1,5 ml e inserir o cotonete com o esfregaço de mucosa bucal, vedando o eppendorf com parafilme;
2. Passar 30 segundos no vórtex;
3. Aquecer a 95°C por 5 minutos;
4. Retirar o cotonete e adicionar 60 µl de Tris 1 M pH 8,0; passar novamente no vórtex por 30 segundos;
5. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm e transferir o sobrenadante para um tubo novo;
6. Estocar a -20°C.

3.2.2. Método de análise das mutações (Triggs-Raine *et al.*, 1990)

Após a extração de DNA as seqüências desejadas do exon 11, do íntron 12 e do exon 7 foram amplificadas separadamente pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Triggs-Raine *et al.*, 1992). As misturas de reação para PCR tiveram 25 µl de volume total, contendo 5 µl do DNA extraído; 100 µM de cada um dos quatro dNTPs; 1,25 unidades da enzima Taq polimerase (Amersham Pharmacia); 50 ng de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores; 2,5 µl de tampão

para Taq 10x (Amersham Pharmacia); água até um volume final de 25 µl. Em seguida, as amostras foram submetidas aos seguintes programas:

Mutações InsTATC1278 e IVS12+1: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 5 minutos.

Mutação Gli269Ser: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos.

O método de detecção da mutação InsTATC1278 consistiu em aplicar o produto da PCR diretamente num gel de poliacrilamida 12%, TBE 1 X a 100 V pelo período de uma hora. Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/ml e visualizado sob luz ultravioleta, a fim de observar a formação de bandas heterodúplex, decorrentes da inserção de 4 pb, identificando a mutação (Triggs-Raine *et al.*, 1992).

Para as mutações IVS12+1 e Gli269Ser todo produto de PCR foi digerido a 37°C durante 2 horas por 2 unidades das enzimas de restrição *Dde* I e *EcoR* II, respectivamente.

Após a digestão, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, TBE 1 X a 100 V pelo período de uma hora. Em cada série de géis aplicou-se um controle positivo (portador da mutação), obtido do centro de testes israelense e do Hospital Monte Sinai (NY, EUA), e um controle negativo, cuja reação de PCR foi realizada com 5 µl de água destilada ao invés de DNA. Após a

corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/ml e visualizado num transiluminador ultravioleta.

A transversão G→C da mutação IVS12+1 cria um sítio de restrição para a enzima *Dde* I, originando uma banda de 85 pb. Na presença da mutação Gli269Ser, uma banda de 52 pb origina-se da perda de um sítio de restrição da enzima *EcoR* II, causada pela transição G→A.

Após o padrão de bandas ser observado e fotografado, o DNA foi classificado como portador de mutação (resultado positivo) ou normal (resultado negativo). No caso de resultado positivo, o teste foi realizado uma segunda vez.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (GIBCO) e a estratégia de detecção das mutações estão esquematizados a seguir. A linha central em cada estratégia representa o segmento de DNA amplificado. Os oligonucleotídeos estão representados pelas setas horizontais e descritos abaixo de cada estratégia. As setas verticais indicam a posição dos sítios de restrição utilizados para clivar os produtos amplificados. As setas entre parênteses indicam a presença do sítio para IVS12+1 e a ausência para Gli269Ser. Os fragmentos resultantes da digestão estão expressos em pares de base (pb) sobre cada linha.

Estratégia para análise de *InsTATC1278* (éxon 11):

A: 5' –AGCCAGACACAATCATACAG–3'

B: 5' –AGGGGTTCCACTACGTAGAA–3'

Tamanho total: 169/173 pb (heterodúplex)

Estratégia para análise de IVS12+1 (íntron 12):

C: 5' –TGAGCAGAAGGCTCTGGTGA-3'

D: 5' –TTGGGTCTCTAAGGGAGAACTCCT-3'

Tamanho total: 151 pb

Estratégia para análise de Gli269Ser (exon 7):

E: 5' –TACAACCCTGTCACCCACAT-3'

F: 5' –TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT-3'

Tamanho total: 167 pb

3.3. Envio de resultados

Na preparação dos envelopes com os resultados, o nome dos portadores encontrados permaneceu desconhecido. A confidencialidade foi mantida uma vez que um pesquisador teve acesso a senha e ao resultado dos exames. As folhas com a apresentação dos resultados por escrito foram dobradas e numeradas, de modo que o resultado não estivesse mais aparente.

Uma segunda pessoa teve acesso a senha e ao nome dos participantes, endereçando e numerando os envelopes. Toda a numeração foi checada duas vezes para se confirmar o procedimento.

Os resultados foram então colocados nos respectivos envelopes e lacrados. Eles foram remetidos pelo correio, para o endereço residencial fornecido pelos participantes.

Uma planilha de computador foi gerada com os dados dos formulários, identificados apenas pela senha, para análise estatística. Posteriormente gerou-se uma planilha daquelas senhas identificadas como positivas e uma planilha de pais que tinham mais do que um filho na amostra.

3.4. Análise estatística

Os testes de hipótese utilizados na análise dos resultados foram realizados através do teste de qui-quadrado, quando não havia comparação com amostras de outros trabalhos.

A significância dos resultados apresentada na discussão (valores P), onde se comparou as frequências de amostras, foi obtida através do teste exato de Fisher. As diferenças entre duas amostras foram consideradas não-significativas quando $P > 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Apresentação do programa a diferentes entidades comunitárias

Um programa preventivo da DTS foi apresentado como projeto de pesquisa a algumas entidades comunitárias judaicas. As principais entidades contatadas foram o Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), o clube “A Hebraica” de São Paulo, a Congregação Israelita Paulista (CIP), a Federação Israelita do Estado de São Paulo (FISESP), uma sinagoga de orientação ortodoxa e um movimento juvenil.

Os resultados foram variados. Algumas entidades de fato não quiseram participar. Uma palestra no clube “A Hebraica” teve apenas 3 ouvintes. O HIAE aprovou o projeto para triagem em recém-nascidos, mas esta opção foi descartada devido a restrições éticas. A Federação Israelita preparou uma carta de aprovação do projeto e nos forneceu uma lista das escolas judaicas de São Paulo.

No início de 1998, as 4 escolas judaicas de São Paulo com ensino médio foram contatadas. Uma dessas escolas tem orientação ortodoxa e manifestou interesse em participar do programa apenas para os alunos assistirem a apresentação, mas sem a coleta. Posteriormente, essa escola não foi mais contatada.

Os colégios de São Paulo que participaram desta pesquisa foram os colégios Bialik, Peretz e Renascença.

No início do ano de 1999, os principais colégios judaicos do Rio de Janeiro foram contatados. Dentre 5 colégios, 2 possuíam orientação ortodoxa e não foram solicitados a participar. Um dos 3 colégios restantes não respondeu à solicitação de participação e também foi excluído da amostragem. Em 1998 esse colégio possuía apenas 8 alunos no 3º ano do ensino médio.

Os colégios do Rio de Janeiro que participaram da pesquisa foram os colégios Liessin e Eliezer Steinbarg. O principal colégio judaico de Porto Alegre foi contatado mas não quis participar da pesquisa.

4.2. Taxa de participação nas escolas

A cada ano, as escolas participantes receberam palestras conforme o número de salas de 3º ano do ensino médio, sempre uma ou duas. Foram realizados 13 ciclos de palestras, seguidas de sessões de coletas, nas três escolas de São Paulo (1998, 1999 e 2000) e duas do Rio de Janeiro (1999 e 2000).

Embora o programa fosse direcionado apenas a alunos de 3º ano, em 2000, os alunos de 2º ano do colégio Liessin participaram do programa, por iniciativa da escola.

A participação dos alunos no programa foi definida como sendo a entrega do formulário de consentimento preenchido e a retirada de amostra de mucosa bucal para o exame de mutações.

Alguns alunos esqueciam o formulário de consentimento no dia da coleta. Eles recebiam um novo formulário e tinham a amostra recolhida, mas os exames

só eram realizados após o recebimento do novo formulário preenchido, que geralmente era enviado pela escola, na semana seguinte. Entre esses alunos, alguns não enviaram seus formulários, apesar de haverem tido amostra coletada. O material da coleta destes alunos não foi processado e eles foram considerados como não participantes.

No total, 581 alunos assistiram as palestras e receberam o formulário de consentimento. Os alunos compareceram à coleta em 82% dos casos (478/581). Destes, 16% (74/478) não enviaram seus formulários de consentimento preenchidos. Assim, a taxa de participação dos alunos no programa foi de 70% (404/581).

A Tabela 5 apresenta os resultados da participação por escola, nos anos de 1998, 1999 e 2000.

Os testes de independência (χ^2) indicaram não haver significância estatística nas variações da taxa de participação por escola (Tabela 6), por ano (Tabela 7) e por estado (Tabela 8), cujos resultados apresentaram respectivamente probabilidades (P) de 0,52; 0,22 e 0,71.

Tabela 5: Taxas de participação dos alunos e número de coletas efetuadas.

	Assistiram	Participaram	Taxa de participação	Coletas
Bialik 98	41	21	51%	27
Bialik 99	48	36	75%	37
Bialik 2000	43	25	58%	37
Peretz 98	31	20	65%	20
Peretz 99	43	37	86%	41
Peretz 2000	37	30	81%	30
Renascença 98	39	26	67%	31
Renascença 99	27	23	85%	27
Renascença 2000	57	40	70%	45
Eliezer 99	35	24	69%	27
Eliezer 2000	49	38	78%	47
Liessin 99	36	26	72%	32
Liessin 2000	95	58	61%	77
TOTAL	581	404	70%	478

Tabela 6: Participação dos alunos por escola.

	Assistiram	Participaram	Taxa de participação
Bialik	132	82	62%
Peretz	111	87	78%
Renascença	123	89	72%
Liessin	131	84	64%
Eliezer	84	62	74%

Tabela 7: Participação dos alunos por ano.

	Assistiram	Participaram	Taxa de participação
1998	111	67	60%
1999	189	146	77%
2000	281	191	68%

Tabela 8: Participação dos alunos por estado.

	Assistiram	Participaram	Taxa de participação
São Paulo	366	258	70%
Rio de Janeiro	215	146	68%

4.3. Estatísticas dos formulários

Em 1998, alguns alunos maiores de 18 anos realizaram o teste sem o consentimento dos pais, mas posteriormente solicitou-se a todos que tivessem os formulários preenchidos por pelo menos um dos pais.

4.3.1. Questionário aos alunos

a) Conhecimento prévio da existência da doença

Dos 404 alunos que responderam aos formulários, 23% (93) afirmaram conhecer a DTS antes da palestra. A maioria deles (55%) adquiriu esse conhecimento por intermédio de professores. Outros declararam tomar conhecimento do assunto através dos pais (12%), parentes (11%), livros (5%) e fontes diversas (17%).

O conhecimento da existência da doença teve evidente aumento durante o período da pesquisa, sendo de 8% (5/67) em 1998, 21% (30/146) em 1999 e 30% (58/191) em 2000. Esse aumento deu-se devido à transmissão da informação pelos professores. Enquanto em 1998 apenas um dentre 5 alunos (20%) afirmou ter obtido o conhecimento por intermédio de um professor, este número aumentou para 18 dentre 28 alunos (64%) de São Paulo em 1999, e 32 dentre 58 alunos (55%) em 2000.

b) Familiaridade

A presença de familiares na amostra foi identificada por uma pergunta no questionário. No ano 2000, 70% dos alunos afirmaram não ter primos, nem irmãos possivelmente amostrados. Quando perguntados, especificamente, se possuíam irmãos com a mesma idade, ou com um a dois anos menos, que tivessem estudado nos colégios amostrados, 17% (32/191) dos alunos disseram que sim.

Uma busca nos dados foi realizada a partir de sobrenomes iguais encontrando-se 9 pares de irmãos, 3 pares de gêmeos e um trio de irmãos (incluindo um par de gêmeos). A impossibilidade de se encontrar mais pares de irmãos pode vir da presença de meio-irmãos, com sobrenomes diferentes, da participação de apenas um dos irmãos de um par, e de erros de digitação dos nomes.

Os alunos possuíam em média 1,45 irmãos. A idade média dos irmãos quando o formulário foi entregue era de 17 anos, variando entre 1 e 35 anos. Os alunos de 3º ano possuem, na sua maioria, 16 ou 17 anos.

c) Outras informações

Para avaliar como os alunos se identificam quanto a serem ou não Ashkenazitas, foi perguntado aos alunos nos anos de 1999 e 2000 se eles eram Ashkenazitas, Sefaraditas ou misturados. As respostas foram: 62% Ashkenazitas, 27% misturados e 7% Sefaraditas. Outros 3% não responderam a essa questão.

Visando avaliar se os participantes estavam satisfeitos em receber o resultado pelo correio, foi perguntado aos alunos se, caso o resultado fosse positivo, gostariam de receber o resultado por telefone ou se preferiam, como era o caso neste exame, receber o resultado pelo correio apenas. Essa questão foi acrescentada aos formulários de 1999 e 2000 e 91% dos alunos (308/337) afirmaram desejar receber o resultado pelo correio apenas. Só 1% (4/307) dos alunos disseram preferir o resultado pelo telefone. Os outros participantes afirmaram desejar os resultados de ambas formas (2%), indiferentes (3%) ou não responderam (3%).

Em 1999 e 2000 foi adicionado ao formulário um espaço para que os alunos eventualmente escrevessem seus comentários. Dos 33 (dentre 337) alunos que o fizeram, 24 fizeram observações quanto à importância ou o interesse do trabalho, ou parabenizando a iniciativa. Os outros comentários foram variados, nenhum foi depreciativo.

Dos alunos participantes, 59% (238/403) eram mulheres. Essa maior participação feminina é significativa ($P=0,0003$). Não se analisou se isso foi reflexo de maior interesse delas ou da sua maior presença nas escolas amostradas, o que poderá ser verificado pela obtenção de uma lista de alunos das escolas.

d) Estimativa da fração Ashkenazita da amostra

Os países de origem dos pais e avós dos alunos participantes, estão apresentados na Tabela 10. Essa informação nem sempre foi fornecida, principalmente no caso dos pais, razão pela qual há ligeiro excesso de avós com países de origem identificados. Visando estimar quantos cromossomos de origem Ashkenazita os alunos da amostra possuem, procurou-se identificar os avós de alunos como Ashkenazitas ou não-Ashkenazitas. Para tal, perguntou-se aos pais, se eles possuíam pais (avós dos alunos) ou avós de origem Ashkenazita. Em 26% dos casos, os pais negaram ancestralidade Ashkenazita. Nos 74% restantes, os países de origem dos avós foram associados a origem Ashkenazita ou não (etnia indefinida) conforme a definição operativa, indicada na Tabela 10 (comunicação verbal, Sergio Dellapergola, 2000). A classificação étnica dos avós como Ashkenazitas, não-Ashkenazitas e etnia indefinida está sumariada na Tabela 11.

A proporção de Ashkenazitas naqueles avós de etnia indefinível (na sua maioria brasileiros) é igual ou ligeiramente maior aos de etnia conhecida, pois as imigrações mais antigas eram provenientes de países Ashkenazitas, em sua maior parte (Ratner, 1977; Decol, 1999). Ao se aplicar a mesma proporção de Ashkenazitas/não-Ashkenazitas aos avós de etnia indefinível, obtém-se uma estimativa da proporção de Ashkenazitas de 65,4%.

Tabela 10: Países de origens informados de avós e pais de alunos.

	Avós		Pais	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Brasil **	492	34%	526	81%
Polônia *	373	26%	4	1%
Romênia *	85	6%	9	1%
Rússia *	58	4%	1	0%
Egito ***	57	4%	30	5%
Alemanha *	55	4%	1	0%
Argentina **	41	3%	15	2%
Líbano ***	30	2%	7	1%
Síria ***	25	2%	0	0%
Hungria *	24	2%	1	0%
Áustria *	22	2%	0	0%
Lituânia *	20	1%	1	0%
Portugal **	16	1%	4	1%
Turquia ***	15	1%	2	0%
Ucrânia *	13	1%	0	0%
Marrocos ***	11	1%	1	0%
Grécia ***	10	1%	1	0%
Israel/Palestina **	10	1%	24	4%
Itália *	10	1%	4	1%
Outros (23 países)	62	4%	17	3%
TOTAL	1.429	100%	648	100%

* países associados a origem Ashkenazita; ** países de etnia indefinida; *** países associados a origem não-Ashkenazita

Tabela 11. Classificação étnica dos avós de alunos.

	<i>N</i>	%
Avós não-Ashkenazitas	364	26%
Avós Ashkenazitas	688	48%
Etnia indefinida	377	26%

4.3.2. Questionário aos pais

Em 69% dos casos (277/404), ambos os pais responderam os formulários. Em 29% dos casos (117/404), apenas um dos pais preencheu o formulário. Os 2% (10/404) restantes formavam um conjunto de dados preenchidos mas não assinados, podendo ter sido preenchidos pelo filho ou pelo cônjuge. As informações destes foram computadas nas estatísticas apresentadas. As porcentagens de formulários respondidos por ambos pai e mãe aumentou no decorrer do programa, ficando em 60% em 1998, 64% em 1999 e 75% no ano 2000.

As respostas dos 13 pais que tinham mais que um filho na amostra foram consideradas apenas uma vez, a partir do formulário do primeiro filho participante.

Cerca de 62% (407/655) dos pais desconhecia a existência da DTS. Entre os 242 indivíduos que já conheciam a doença, 23% eram profissionais da área médica. O restante tomou conhecimento a partir de amigos (19%), de jornais, revistas ou livros (19%), do programa preventivo anterior realizado no Hospital Israelita Albert Einstein (8%), de parentes brasileiros (7%), de parentes estrangeiros (2%), de médicos (2%), de amigos com histórico familiar (1%), de histórico familiar (1%) e outros (8%).

No ano 2000 foi questionada a data de nascimento dos pais. A média de idade dos pais foi de 48 anos, variando entre 36 e 73 anos.

Quando perguntados se já haviam feito o teste para saber se são portadores da DTS, apenas 2% (11/651) dos pais disseram que sim. Os locais de teste eram: Hospital Israelita Albert Einstein: 4; Israel: 2; EUA: 1; colégio Liessin: 1

(professora da escola e mãe de aluno participante); laboratório particular (Lavoisier): 1; sem resposta: 2.

Dentre 658 pais de alunos, 562 (85%) afirmaram não ter pais ou irmãos morando em Israel, EUA e Canadá, principais países onde programas de triagem para a DTS são desenvolvidos.

Quanto à qualificação do programa, os pais dos alunos participantes consideraram o programa imprescindível em 25% dos casos, muito importante em 42%; importante em 28%; e pouco importante em 1%. Os restantes 3% não responderam a essa pergunta.

4.4. Análise de mutações no gene HEXA

A análise de DNA dos 404 alunos participantes detectou 8 portadores de mutações no gene HEXA (7 InsTATC1278 e 1 IVS12+1), indicando conjuntamente uma frequência de portadores na amostra de 1 em cada 51 alunos. Todos os resultados positivos foram confirmados numa repetição do teste a partir do material coletado.

Ao se considerar a fração Ashkenazita como sendo 65,4% dos participantes, a frequência corrigida na amostra revelou ser de 1 portador em cada 33 alunos Ashkenazitas. Os dados estão de acordo com a hipótese de que não há uma diferença significativa na frequência dessas mutações entre as populações judaicas brasileira e norte-americana ($P > 0,05$).

A visualização da presença ou ausência de mutações no gene HEXA conforme as estratégias de detecção (3.2.2) pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4. Visualização dos resultados das estratégias de identificação de mutações causadoras da DTS, na população judaica Ashkenazita: **(a)** Resultados da estratégia de detecção da mutação InsTATC1278. **(b)** Resultados da estratégia de detecção da mutação IVS12+1 **(c)** Resultados da estratégia de detecção da mutação Gli269Ser. Colunas indicadas por asterisco (*): heterozigotos. Colunas indicadas pelo sinal de mais (+): controles positivos. Colunas indicadas pelo sinal de menos (-): controles negativos (sem DNA). Os tamanhos dos fragmentos (em pb) estão indicados ao lado de cada foto. As bandas criadas pelas mutações estão identificadas por uma seta.

4.5. Resultados dos questionários de portadores

Os portadores informaram ter no total 14 irmãos. Em um dos casos, a mãe do aluno afirmou que teve duas irmãs afetadas pela DTS e já tinha feito exame para DTS no laboratório Lavoisier, em São Paulo. O participante tem dois irmãos amostrados, sendo um irmão gêmeo, todos na mesma escola. Observou-se por intermédio das senhas (sem quebra de confidencialidade) que os irmãos não eram portadores.

Em outra instância, dois portadores que estudavam no mesmo colégio eram irmãos gêmeos, pois as datas de nascimento dos pais e outras informações eram idênticas nos dois formulários.

Quanto à origem, 7 dos oito portadores identificaram-se como Ashkenazitas e um afirmou ser misturado. Quando informados, os países de origem dos avós foram Polônia e Brasil, com 8 ocorrências cada, Lituânia e Egito, 2 instâncias cada e Alemanha, Áustria, Rússia e EUA com uma ocorrência cada.

4.6. Retorno de famílias e participantes diversos

Dos 8 portadores encontrados, 3 entraram em contato com o laboratório para repetir o exame ou testar familiares.

Além dos alunos regulares das escolas judaicas, 31 indivíduos (judeus e não-judeus) realizaram o teste para mutações causadoras da DTS. As motivações foram variadas, incluindo professores das escolas visitadas, indivíduos para os quais o teste foi oferecido, o irmão e a mãe de um aluno portador, o irmão de um

aluno cujo pai já tinha feito o exame com resultado positivo, e ouvintes de uma palestra no clube “A Hebraica”.

Apenas a mãe do aluno portador teve resultado positivo. A mutação encontrada foi a mesma do filho: InsTATC1278.

5. DISCUSSÃO

5.1. Freqüência de portadores

Uma das condições necessárias para o estabelecimento dos programas preventivos da DTS é a elevada freqüência de portadores na população judaica em relação a outras populações (Kaback & Zeiger, 1972; Kaback *et al.*, 1993; Jorde *et al.*, 1994). Para verificar se essa alta freqüência também é observada na população judaica brasileira, os dados obtidos neste estudo foram comparados com aqueles de outras populações judaicas.

Os dados de uma amostra de 91.217 participantes do programa preventivo da DTS na população judaica da Califórnia indicaram uma freqüência de heterozigotos para a DTS de 1 em cada 30 indivíduos (Kaback *et al.*, 1993). A freqüência encontrada neste trabalho, de 1 em cada 51 alunos, não é significativamente diferente da freqüência acima ($P=0,16$).

Ao se corrigir os dados do programa californiano, excluindo-se os 2% de portadores de mutações benignas, obtêm-se uma freqüência de portadores da DTS na população judaica de 1 em cada 31 indivíduos, ainda mais próxima daquela encontrada neste estudo, que também excluiu portadores de mutações benignas. Os dados de diversos outros programas preventivos da DTS indicaram freqüências semelhantes (Buchalter *et al.*, 1983; Petersen *et al.*, 1983; Bach *et al.*, 1992; Kaback *et al.*, 1993; Mitchell *et al.* 1996).

Das 8 mutações encontradas neste estudo, 7 (87,5%) foram InsTATC1278 e 1 (12,5%) foi IVS12+1. A freqüência encontrada está muito próxima daquela

descrita em diversos programas de triagem, onde essas mutações estavam presentes em 82% e 15% dos portadores, respectivamente (Paw *et al.*, 1990; Triggs-Raine *et al.*, 1990; Grebner & Tomczak, 1991; Landels *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 1992b; Kaback *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1993; Peleg *et al.*, 1994).

Quando considerada apenas a fração Ashkenazita da população judaica norte-americana, Petersen *et al.* (1983) encontraram em 27.648 indivíduos uma frequência de heterozigotos da DTS de 1 em cada 29 indivíduos. Esses autores demonstraram que os Ashkenazitas provenientes de diferentes regiões européias apresentam frequências de portadores variadas. Assim, um padrão de imigração diferencial entre Brasil e Estados Unidos poderia ter levado a diferentes frequências de portadores. No entanto, isso não se verificou. A fração Ashkenazita dos alunos de escolas judaicas participantes desta pesquisa, estimada a partir dos países de nascimento dos avós, foi de 65,4%. Se considerarmos apenas a fração Ashkenazita da amostra deste estudo, a frequência de portadores é de 1 em cada 33 indivíduos (8/264), muito próxima à frequência citada ($P=0,87$).

Porém, alguns cuidados devem ser tomados ao se considerar a fração Ashkenazita da população. A identificação dos alunos como Ashkenazitas foi estimada indiretamente, a partir da informação obtida nos formulários de consentimento. A população Ashkenazita em geral também não está definida por limites precisos, sendo que a frequência de casais judeus mistos (Ashkenazitas e não-Ashkenazitas) aumentou nas últimas décadas, tornando mais difícil a distinção entre sub-populações judaicas (Dellapergola, 1992). Assim, deve-se considerar a frequência de portadores entre os alunos Ashkenazitas com reservas. Embora na literatura se considere a doença especialmente freqüente em judeus

Ashkenazitas, a frequência de portadores não se altera muito quando se considera toda a população judaica. Isto ocorre devido a maior representatividade da fração Ashkenazita (ao redor de 70%) e do aumento na incidência corresponder a um aumento exponencial da frequência gênica, ou seja, enquanto a incidência da DTS em Ashkenazitas é quase 10 vezes maior, a frequência gênica é apenas 3 vezes maior (Petersen *et al.*, 1983).

Quando a frequência de portadores foi separada por Estado, encontramos 7 portadores em São Paulo dentre 258 participantes e 1 portador no Rio de Janeiro, dentre 146 participantes. A diferença entre a frequência de portadores nos Estados não é significativa ($P=0,27$).

Para os cálculos da frequência de portadores em amostras dos programas de triagem mundiais, exclui-se da contagem aqueles indivíduos cuja motivação ao teste tenha sido a presença de afetados na família, ou parentes identificados como portadores. Uma vez que esses indivíduos têm maior probabilidade de serem portadores, se incluídos eles poderiam elevar significativamente a frequência de portadores estimada. Neste estudo, considerou-se todos os alunos participantes da pesquisa como sendo motivados pela palestra. Porém, um dos portadores teve tios afetados e pode ter sido motivado a participar devido à presença da mutação na família. Quando os indivíduos com familiares sabidamente portadores ou afetados são retirados da amostra, a frequência de portadores é de 1 em 57 (7/402), não se alterando significativamente em relação a frequência de 1 em 30 apresentada acima ($P=0,09$), embora estivesse mais próxima ao limite de significância adotado.

Numa tentativa de se extrapolar a frequência de portadores encontrada nas escolas para a população judaica brasileira em geral, deve-se considerar os fatores que poderiam alterar esta frequência na amostra: taxas de miscigenação diferentes (estudantes em escolas judaicas poderiam pertencer a famílias com taxas de miscigenação maiores ou menores); proporção de Ashkenazitas/não-Ashkenazitas diferentes; presença de alunos não-judeus na amostra; e flutuações ao acaso devidas ao tamanho amostral. Apesar dessas possibilidades, a amostra obtida foi bem representativa da população judaica em geral pois a grande maioria dos alunos são judeus, a proporção de Ashkenazitas (65%) é similar (Rattner, 1977; Goodman, 1979; Decol 1999), e a amostra foi suficientemente grande para possibilitar comparações significativas. A escassez de dados em relação à população em geral dificulta as tentativas de comparação. De fato, uma dificuldade primária no estudo de populações judaicas é a disponibilidade e a qualidade dos dados demográficos (Dellapergola, 1992).

Existe ainda a possibilidade dos componentes da amostra apresentarem maior familialidade entre si, pois algumas famílias podem colocar seus filhos preferencialmente em escolas comunitárias, ao passo que outras não. Nesse caso, a familialidade seria maior na amostra, mas é independente das famílias possuírem ou não mutações no gene HEXA e portanto não terá efeito na frequência de portadores.

Porém, entre os portadores encontrou-se dois pares de gêmeos, sendo um par de portadores e um par portador/não-portador. Para excluir a possibilidade de que a presença destes gêmeos levou a uma variação ao acaso na frequência de portadores, analisou-se a significância dos resultados, caso apenas o membro

não-portador de cada irmandade fosse considerado. A frequência de portadores da amostra (6 em 390), deliberadamente em seu limite mínimo, não se alteraria significativamente em relação a frequência de 1 em 30 do programa californiano ($P=0,06$).

Assim, mesmo quando diferentes possibilidades de flutuações na frequência de heterozigotos são consideradas, os dados obtidos não diferem significativamente daqueles descritos para outras populações judaicas estudadas. Considerando-se a população de alunos das principais escolas judaicas brasileiras, a frequência de portadores de 1 em cada 51 alunos validaria um programa preventivo para a DTS nesta população, já que a alta frequência de portadores da doença numa população específica é uma das condições necessárias para o estabelecimento deste (Jorde *et al.*, 1994, Kaback *et al.*, 1993).

5.2. O Diagnóstico Molecular

Nesta pesquisa, optou-se por realizar os exames para portadores de mutações causadoras da DTS utilizando o diagnóstico molecular apenas. Tal ocorreu devido à disponibilidade de um exame mais simples do que o método enzimático de detecção de portadores, corroborando a previsão de Triggs-Raine *et al.* (1990), de que pequenos centros poderiam passar a realizar os testes de detecção de portadores, por não necessitarem do rigoroso controle de qualidade necessário para o teste enzimático. O baixo custo de se estabelecer no laboratório o método de diagnóstico molecular favoreceu muito esta pesquisa.

Outra vantagem do diagnóstico molecular foi a possibilidade de extração de DNA por raspagem de mucosa bucal, método praticamente não-invasivo que simplifica a coleta e extração de DNA. Uma vez que não era necessária a punção para remoção de sangue dos participantes, esse procedimento pode ter influído positivamente na taxa de participação dos alunos. Esse mesmo fato foi observado numa experiência de triagem para portadores da DTS em Porto Alegre, descrita adiante, na qual os testes foram realizados em secreção lacrimal (Buchalter *et al.*, 1983; Buchalter *et al.*, 1984).

O diagnóstico molecular apresenta alta especificidade, não fornecendo resultados inconclusivos ou falso-positivos. Nas escolas, uma das principais preocupações é a não-estigmatização de portadores. Assim, justifica-se a opção por um método com maior especificidade. Já os programas preventivos da DTS em geral, procuram favorecer a sensibilidade, utilizando o diagnóstico enzimático e considerando resultados inconclusivos como sendo positivos (Kaback & Zeiger, 1972; Kaback *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1993).

A única restrição encontrada do diagnóstico molecular da DTS no Brasil é a possibilidade de se confundir a mutação Gli269Ser com uma mutação encontrada em pacientes de descendência portuguesa, IVS7+1 G→C (Hechtman & Kaplan, 1993). Ambas mutações alteram o sítio para a enzima de restrição *EcoR* II. A mutação IVS7+1 G→C já foi detectada em três pacientes de origem portuguesa (Fernandes *et al.*, 1992a; Ribeiro *et al.*, 1995) e em 4 pacientes brasileiros (Rozenberg *et al.*, manuscrito em preparação). Como alguns alunos indicaram ter ancestrais portugueses de origem não-Ashkenazita, uma eventual presença da

mutação Gli269Ser deverá excluir a possibilidade de tratar-se de IVS7+1 G→C. Esta confirmação poderá ser feita através da utilização da enzima *Alu* I que cria um sítio de restrição exclusivo para IVS7+1 G→C.

Até o presente, mais de 80 mutações causadoras da DTS já foram descritas. Embora a maioria esteja confinada a poucas famílias, a triagem de portadores é atualmente recomendada para todos os casais em que um dos membros é descendente de indivíduos das populações em risco (Kaplan, 1998). Para cônjuges de portadores, o diagnóstico molecular apenas é insuficiente, já que um índice de falso-negativos de 1 a 2% é esperado (Landels, 1991). Nesses casos está indicado o exame por ambos métodos, para aumentar a sensibilidade do teste (Yoo *et al.*, 1993; Akerman *et al.*, 1997). Caso apenas o diagnóstico enzimático seja positivo, deve-se excluir a possibilidade da mutação benigna Arg247Trp.

Neste trabalho, foi sugerido aos alunos portadores que testassem seus parceiros independentemente da origem deles. Quando os alunos participantes deste programa piloto estiverem em idade reprodutiva e sugerirem a seus cônjuges que se submetam ao teste, eles poderão buscar diversos laboratórios, pois tanto o diagnóstico enzimático, recomendado nesses casos, como o molecular são realizados por laboratórios no Brasil.

Atualmente no Brasil, mais da metade das novas famílias envolvendo um parceiro judeu, são miscigenadas (Della Pergola, 1992; Decol, 1999). Ainda que a alta taxa de miscigenação diminua a incidência da doença na população judaica, não é suficiente para igualar o impacto na incidência que os programas

preventivos obtêm nos EUA, cujas taxas de miscigenação são similares (Della Pergola, 1992).

De um ponto de vista financeiro, diversos estudos foram realizados demonstrando que a triagem de portadores para a DTS pelo método de diagnóstico enzimático é eficiente (Kaback & Ziegler, 1972; Kaback *et al.*, 1993). O diagnóstico molecular reforça essa consideração, pois é mais simples (Triggs-Raine *et al.*, 1990; DeMarchi *et al.*, 1996). O mesmo balanço econômico favorável não foi encontrado em pelo menos um estudo de triagem populacional de fibrose cística (Rowley *et al.*, 1998). Nesse caso, o custo de um programa de detecção de casais em risco por triagem de heterozigotos na população em geral excederia em aproximadamente 75% o custo do tratamento da doença. O alto custo do teste de DNA (US\$150) foi crítico para essa consideração. Esse exame molecular detecta 70 mutações descritas causadoras de fibrose cística, com sensibilidade de 85% para caucasianos (Rowley *et al.*, 1998). Em contraste, o teste de DNA para mutações causadoras da DTS na população judaica Ashkenazita tem sensibilidade de 98%, detectando apenas 3 mutações. Na maioria dos programas nos EUA o custo da análise enzimática para detecção de portadores da DTS é de US\$20 a US\$75 dependendo se o substrato para o teste é soro ou leucócitos (Kaback *et al.*, 1993). No Canadá e em Israel os testes são financiados pelo governo.

No entanto, a análise financeira deve ser encarada como um indicador de necessidades e não significa que um programa preventivo só deve ser implementado caso seja econômico (Rowley *et al.*, 1998).

No presente estudo, o método de análise molecular mostrou-se rápido e eficiente, quando aplicado rotineiramente a várias amostras. O custo do material

didático e laboratorial para a análise molecular é inferior a U\$10,00 por teste, sem incluir o custo dos equipamentos já existentes no laboratório (centrífugas, geladeira, banhos e termociclador) e da mão de obra.

5.3. Uma abordagem não-alarmista da DTS no Brasil

A população judaica brasileira foi contada em 86.416 indivíduos no censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 1991. O congresso judaico mundial estima em 130.000 a população judaica brasileira. Entre essas estimativas, os demógrafos Decol (1999) e Dellapergola (2000) estimam a população judaica brasileira em 100.000 indivíduos.

Numa população de 100.000 indivíduos com uma incidência da DTS estimada em 1 em cada 4.000 nascimentos, espera-se 25 casos por geração, ou aproximadamente 1 caso por ano. Durante o desenvolvimento desta pesquisa não se tomou conhecimento de nenhum caso atual da doença em judeus, embora nas escolas judaicas três famílias relataram histórico da DTS. Por outro lado, quatro crianças afetadas pela DTS de origem não-judaica foram testadas quanto à presença das 3 mutações causadoras da DTS em Ashkenazitas. Todas apresentaram resultado negativo. Esses pacientes apresentaram mutações descritas na população portuguesa. Dos 22 casos da DTS relatados no Brasil, 2 foram em judeus, 9 em pacientes de etnia não informada e 11 em não-judeus (Rosemberg & Lefèvre, 1970; Schmidt *et al.*, 1981; Coelho *et al.*, 1997; Rozenberg *et al.*, manuscrito em preparação).

No Brasil, dois outros programas de triagem de portadores da DTS na população judaica foram iniciados, sendo um em Porto Alegre e o outro em São Paulo. Os resultados estão descritos a seguir.

Em 1980 um programa de triagem populacional da DTS foi iniciado junto à população judaica Ashkenazita de Porto Alegre, estimada em 14.000 indivíduos na época (Buchalter *et al.*, 1983). O programa teve uma fase de divulgação de um ano, com participação da mídia local. A federação judaica enviou uma mala direta para 2.100 famílias, pôsteres foram afixados em instituições comunitárias e palestras foram ministradas para grupos de mães e estudantes universitários. As análises enzimáticas foram feitas em secreção lacrimal e resultados positivos foram confirmados em leucócitos. O programa teve 298 participantes, a maioria (70%) era solteira. Todos eram brasileiros natos, assim como 69% de seus pais e 7,6% de seus avós. Foram encontrados 7 portadores, revelando uma frequência de portadores de 1 em 42, similar à frequência de 1 em 51 encontrada neste estudo ($P=0,79$). Um dos portadores era de origem Sefaradita e os outros, Ashkenazita.

Segundo os autores, o programa mostrou-se eficiente. Aproximadamente 2,1% da população judaica de Porto Alegre foi submetida ao teste, representando um parte significativa da população em idade reprodutiva. O envolvimento de lideranças comunitárias e o uso de lágrimas como fonte de enzima foram de especial importância. O modelo foi considerado como podendo ser estendido a outras comunidades judaicas brasileiras, porém foi descontinuado.

Schmidt *et al.* (1981) realizaram uma experiência de triagem neo-natal da DTS na população brasileira, sem ligação com a experiência de Porto Alegre. O

programa estava inserido num projeto amplo de detecção de erros inatos do metabolismo em maternidades e em 56 centros de saúde em São Paulo. Entre 23 crianças e 174 adultos testados (judeus e não-judeus), foram encontrados um menino não-judeu e 11 adultos (10 judeus e 1 não-judeu) heterozigotos. Foram observados ainda, 7 casos de crianças afetadas, das quais 2 eram judias. Entre os 5 afetados não-judeus, 4 eram negros e 1 era branco. Os autores justificaram a triagem em toda a população (e não apenas em judeus) devido a: uma freqüência de portadores (1/141) maior do que a encontrada na população em geral dos EUA; a mistura racial freqüente no Brasil; e ainda à existência de cristãos-novos na população formadora do país. No entanto, atualmente sabe-se que a freqüência de 1/141 na população em geral foi uma super-estimativa pois, devido as limitações do teste enzimático, incluiu mutações benignas. A freqüência corrigida para a população em geral, em se considerando que 36% das mutações são benignas, seria de 1 em cada 220 indivíduos. Essa freqüência pode ser ainda menor devido à baixa especificidade de se testar grávidas, não justificando o direcionamento do programa à toda população. Essa experiência acompanhou um desacordo por parte da comunidade científica, devido a uma abordagem considerada alarmista.

Segundo Levin (1999), uma restrição ética aos programas preventivos é que embora a comunidade judaica tenha aceito e apoiado programas de triagem genética, o acúmulo de dados científicos e de divulgação na mídia das “doenças genéticas judaicas” causou desconforto nessa população. Na comunidade judaica, o autor sugere entre outros que: os programas devem ser projetados para benefício das comunidades e não como pesquisa apenas, as lideranças

comunitárias devem estar envolvidas, e a tentativa de motivação dos participantes não deve gerar ansiedade para sensibilizar os membros da população.

Nesse sentido, entende-se que a divulgação dos resultados desta pesquisa deve estar acompanhada de esclarecimentos tranquilizadores, sobre como uma alta frequência de portadores (1 em cada 31 indivíduos) traduz-se numa doença rara, sendo este fato uma ocorrência normal. Durante a divulgação deste estudo, evitou-se abordar a questão de modo alarmista. Não foram utilizados pôsteres, nem divulgação na mídia não especializada. O programa foi restrito a instituições onde pudessem ocorrer sessões educativas. Nas escolas judaicas, especificou-se que a DTS é rara, e ocorre numa população pequena.

Embora a população judaica brasileira seja a 8ª maior do mundo, deve-se ter em vista que ela é cerca de 50 vezes menor que a dos EUA. O programa preventivo deve ser discreto e proporcional a uma população de aproximadamente 100.000 indivíduos.

Os 2 programas prévios de triagem da DTS no Brasil parecem ter acabado por perda do interesse por parte dos organizadores (comunicação pessoal, Benjamim Schmidt, 1998; Moacir Wajner, 2000).

Neste contexto, uma das vantagens do desenvolvimento do projeto nas escolas em caráter permanente seria a possibilidade de estabelecer uma rotina anual e um patamar mínimo no número de participantes, evitando alguns dos fatores que levaram experiências prévias no Brasil a serem descontinuadas. Atualmente, com uma maior popularização da genética através do projeto genoma, a opinião pública pode estar mais esclarecida e aberta ao tema, fato do qual programas anteriores podem não ter sido beneficiados.

Na hipótese de se continuar este projeto, as escolas judaicas de Belo Horizonte, Curitiba, Recife e Salvador poderiam ser incluídas. No entanto, São Paulo e Rio de Janeiro devem manter-se como foco principal, dado que a distribuição da população judaica brasileira é de 50% em São Paulo, 30% no Rio de Janeiro, 9% no Rio Grande do Sul e 11% em outros estados (IBGE, 1991).

5.4. O modelo preventivo canadense e a taxa de participação

O programa de triagem em alunos do último ano do ensino médio de escolas de Quebec, cuja população judaica Ashkenazita também está estimada em 100.000 indivíduos, nos serviu de modelo. Assim como ocorreu no Brasil, algumas experiências de triagem no Canadá foram descontinuadas (Zeesman *et al.*, 1984; Mitchell *et al.*, 1996). A falta de sucesso desses primeiros programas de triagem feitos no Canadá foi resolvida através do direcionamento às escolas de ensino médio, obtendo uma taxa de participação de 67%.

Embora não tivesse sido objetivo deste estudo concentrar o programa apenas nas escolas judaicas, tal ocorreu devido a baixa receptividade em outras instituições comunitárias (sinagoga, movimento juvenil e jornal comunitário), boa receptividade das diretorias das escolas, alta taxa de participação dos alunos (70%) e extensão do projeto às escolas do Rio de Janeiro.

As altas taxas de participação nestes programas direcionados ao ensino médio podem ser favorecidas pela facilidade dos indivíduos em se testar, uma vez que a coleta é realizada na própria escola e as pessoas não precisam se deslocar até os centros de coleta.

Neste estudo, a taxa de participação de 70% dos ouvintes das palestras não se modificou significativamente durante os três anos nos quais este estudo se desenvolveu. No entanto, o número absoluto de participantes aumentou no decorrer dos anos de 1998, 1999 e 2000, sendo de 67, 146 e 191 respectivamente, devido a um aumento no número de escolas participantes e de ouvintes em cada escola. Nenhuma escola interrompeu sua participação durante esta pesquisa. Quanto à importância que os pais atribuíram ao programa, a maioria dos pais dos alunos julgaram o programa importante, muito importante ou imprescindível. Obviamente aqueles que não consentiram na participação do filho podem ter outra opinião, mas os resultados demonstraram boa aceitação, na maior parte dos casos.

A taxa de participação dos alunos neste estudo e a boa aceitação do projeto nas escolas judaicas, viabilizam o estabelecimento de um programa preventivo, como o apresentado aqui. Outras condições necessárias para o desenvolvimento deste programa estão discutidas adiante.

No Canadá, o programa preventivo foi realizado no ensino médio de todas as escolas (e não apenas nas judaicas) devido a maior incidência da DTS na população franco-canadense, atingido 89% dos estudantes de ensino médio. No entanto, como no Brasil apenas parte da população judaica estuda em escolas comunitárias, idealmente deveria ser desenvolvido um trabalho paralelo junto aos médicos que atendem esta população e em outras instituições comunitárias, para que os indivíduos interessados possam realizar o teste. Os aspectos éticos envolvidos nesses casos devem ser contemplados.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram ainda que os programas preventivos de outros países têm pouco impacto sobre a população judaica brasileira. Apenas 15% dos pais possuem parentes vivendo em países nos quais esses programas são desenvolvidos. Dos 11 pais (2%) de alunos que já haviam se testado para a DTS, nenhum afirmou ter sido motivado por um parente estrangeiro. Assim, estes dados indicam que a eficiência dos programas de outros países não diminui a necessidade de um programa no Brasil.

5.5. Aspectos éticos da triagem genética

A ética é a ciência da moral. Por sua vez, a moral é a parte da filosofia que trata dos costumes e dos deveres do homem. A triagem genética é a busca sistemática numa população específica, por pessoas de determinados genótipos. Diversos aspectos éticos surgem ao se projetar programas de triagem genética: risco de estigmatização de portadores, identificação de falsa-paternidade, indução à participação, custos e ansiedade gerada. Ao se dirigir a triagem a populações específicas, aspectos culturais, históricos, religiosos e sociais adicionam-se aos aspectos éticos (Levin, 1999). A discussão dos aspectos éticos surge devido a incerteza sobre como se proceder e modifica-se conforme circunstâncias culturais.

Na execução deste trabalho obteve-se a aprovação das diretorias das escolas judaicas e dos alunos e pais de alunos através do formulário de consentimento. Obteve-se ainda a aprovação do comitê de ética do Hospital Israelita Albert Einstein, da Federação Israelita do Estado de São Paulo (FISESP) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Em suma, os pré-requisitos para o estabelecimento de um programa de triagem populacional são: (1) a participação de lideranças comunitárias, (2) uma equipe treinada, (3) métodos laboratoriais precisos, com controle de qualidade e verificação de eficiência, (4) confidencialidade dos resultados, (5) participação voluntária e igual acesso da população aos programas, (6) consentimento por escrito, (7) explicação eficiente e não alarmista sobre a triagem, (8) aconselhamento genético profissional, (9) sistema de auto-avaliação dos programas e (10) a contemplação de aspectos éticos (Kaback & Zeiger, 1972; Hechtman & Kaplan, 1993; Kaback *et al.*, 1993; Jorde *et al.*, 1994; Kaplan 1998; Levin, 1999).

Um exemplo do risco de não se contemplar aspectos éticos é o que levou ao fracasso as tentativas iniciais de se estabelecer um programa preventivo da anemia falciforme nos EUA (Bowman, 1991; Kaback *et al.*, 1993; Mange & Mange, 1989). Tal ocorreu devido à obrigatoriedade legal do teste para a população negra dos EUA (antes mesmo da existência de DPN); à falta de confidencialidade dos resultados (com conseqüente cancelamento de planos de saúde), e à confusão entre portadores e afetados.

Esses aspectos foram levados em consideração ao se projetar o presente estudo. A utilização do diagnóstico molecular correspondeu à necessidade de precisão uma vez que é um método sensível, sem risco de apresentar resultados falso-positivos. A apresentação dos resultados dos testes aos alunos foi feita de maneira totalmente confidencial, pelo correio. Os portadores encontrados neste estudo permaneceram anônimos e não foram contatados por telefone como ocorre em outros programas. O risco de quebra de confidencialidade aparece

principalmente em programas de triagem para populações pequenas. As respostas de uma das questões dos formulários de consentimento indicou que a maioria dos alunos neste estudo (94%) optaria receber os resultados pelo correio, caso pudessem optar entre isto e um contato telefônico.

O fardo psicológico de um indivíduo saber que é portador de determinado gene recessivo pode ser considerável. Embora a incidência de ansiedade ou diminuição de auto-estima entre portadores da DTS de escolas canadenses foi considerada baixa, ainda é maior do que o risco de se produzir uma criança afetada. Justifica-se portanto a preocupação de se procurar minimizar a ansiedade gerada, sem comprometer a eficiência do programa.

Embora os seres humanos sejam universalmente heterozigotos para diversos genes potencialmente prejudiciais, uma eventual “preocupação” dos portadores advém da transição de uma percepção de uma suscetibilidade mais geral, a possíveis conseqüências de uma doença específica (Levin, 1999).

Desta forma, um aconselhamento tranquilizador foi apresentado aos alunos antecipadamente. Ao final das palestras, os possíveis resultados dos exames eram discutidos. Foi explicado que todas as pessoas carregam mutações causadoras de doenças recessivas e que a presença delas não prejudica a saúde dos heterozigotos. Aos eventuais portadores era sugerido que guardassem a informação sem constrangimento e que buscassem testar futuros parceiros antes de terem filhos. Salientava-se que apenas os casais formados por dois portadores deveriam buscar orientação médica e quais as possibilidades que seriam apresentadas durante um aconselhamento genético. Na apresentação do resultado positivo apresentado aos portadores (ANEXO) sugeriu-se que eles

procurassem os pesquisadores caso desejassem. Tal ocorreu em três ocasiões, dentre 8 resultados positivos enviados. Estes três participantes solicitaram retestagem e receberam aconselhamento tranquilizador. Os novos testes confirmaram os resultados.

- **Impacto de programas preventivos no ensino médio**

O fato do casamento e da reprodução não serem preocupações imediatas para alunos de ensino médio poderia reduzir a ansiedade dos participantes. Por outro lado, estes portadores deverão guardar a informação por mais tempo. Assim, não parece existir uma idade ideal para a realização do teste de portadores da DTS, pois em todas as fases, um ou outro tipo de desconforto é inevitável. No entanto, a proximidade com o período reprodutivo é desejável (Levin, 1999).

Inicialmente, este trabalho pretendia analisar a frequência das mutações causadoras da DTS em recém-nascidos do Hospital Israelita Albert Einstein. Porém esta opção mostrou-se indesejável porque as crianças não poderiam optar pela participação, os portadores só utilizariam a informação após um longo período, os pais é quem iriam eventualmente transmitir essa informação, e haveria o risco de se detectar uma criança afetada sem nenhum benefício para essa ou para os pais. Assim, favoreceu-se a opção pelo modelo canadense de triagem no ensino médio.

Neste estudo, apenas alunos de terceiro ano participaram (≥ 16 anos), pois além de serem os mais velhos do ensino médio, têm maior conhecimento de

genética devido ao currículo escolar e aos exames de vestibular. O artigo 5º do código civil da legislação brasileira dispõe que a partir dos 16 anos, os jovens deixam de ser absolutamente incapazes de exercer pessoalmente os atos da vida civil, refletindo a maior capacidade de opção dos alunos. Ainda assim, os aspectos éticos de se testar adolescentes são complexos.

O fato de alunos de ensino médio serem capazes de decidir responsabilmente a cerca de realizarem ou não o teste para portadores da DTS é questionável. Zeesman *et al.* (1984) avaliaram o impacto do programa preventivo realizado com alunos de 3º ano de colegiais canadenses, através de questionários enviados a participantes, 8 anos depois dos testes. Os dados da pesquisa indicaram que os canadenses triados no ensino médio tiveram atitudes positivas em relação a triagem genética, mesmo após um longo período, e que os alunos fizeram uso apropriado do resultado do teste. Dentre os portadores, 95% (36/38) acreditavam ser melhor obter essa informação antes do casamento. A “preocupação” inicial dos portadores com o resultado do exame pareceu dissipar-se com o tempo. Os participantes em geral mostraram-se satisfeitos em ter feito o teste e aprovariam outros eventuais testes genéticos. A maioria dos portadores (92%) e dos não-portadores (95%) afirmaram não considerar o teste no ensino médio como sendo prematuro.

Embora na população judaica brasileira não tenham sido feitos testes específicos após o envio de resultados aos alunos, a experiência nas escolas brasileiras também mostrou-se positiva. Aqueles poucos alunos que indicaram insegurança ou que não estavam presentes na palestra foram desencorajados a participar. Seria interessante no futuro, obter-se informações de quais opções

foram efetivamente adotadas pelos portadores comparadas a um grupo controle, quantos tiveram parceiros testados, se chegaram a formar casais em risco e quais as alternativas tomadas.

Inicialmente esperava-se analisar as informações dos alunos que não queriam participar, através da obtenção dos seus formulários preenchidos. Posteriormente, ficou claro que apenas os alunos que queriam participar devolveram os formulários, e todos desejaram conhecer o resultado de seu exame. Assim, não foi possível analisar quais foram as razões que levaram os alunos a não participar.

Num programa desenvolvido em escolas existe também o risco de que os alunos nunca venham a se casar ou se reproduzir, ou até mesmo venham a esquecer seu genótipo, resultando em esforço redundante. Por outro lado, os alunos portadores podem alertar outros membros da família. Durante as palestras, foi explicado aos alunos o mecanismo de herança recessivo e, mais especificamente, que a chance do irmão de um portador ser portador é aproximadamente 50%. Na apresentação do resultado, a transmissão do mesmo à família é considerada opção do portador. Pelo menos três dos oito portadores encontrados (38%) compartilharam esta informação com a família. Alguns dos familiares vieram submeter-se ao teste.

5.6. Aspecto legal da triagem no Brasil

No Brasil, poderia se considerar uma restrição ética ao programa a ilegalidade da interrupção de gravidez na legislação, salvo casos excepcionais, em

contraste com a legislação permissiva de outros países onde os programas são desenvolvidos. Dois aspectos podem ser destacados aqui. O primeiro é que o problema não surge com o início do programa preventivo, pois os casais em risco existem independentemente destes programas. Um casal com uma criança afetada que deseje ter mais filhos precisa de livre escolha de alternativas.

Um segundo aspecto é que o diagnóstico pré-natal seguido de interrupção de gravidez de fetos afetados não é a única opção de casais em risco, embora seja a opção mais adotada por esses casais em outros países (Kaback *et al.*, 1993) Outras opções são a abstenção reprodutiva, a adoção, “correr o risco”, a recepção de gametas doados, e o diagnóstico pré-implantação.

5.7. Inclusão de outras doenças no programa preventivo da DTS

A DTS foi a primeira doença genética para a qual um programa preventivo foi instituído. Essa experiência serviu de modelo para prevenção de outras doenças genéticas (Kaback, 1972; Blitzer & McDowell, 1992; Yoo *et al.*, 1993; Kaplan, 1998).

Alguns programas de triagem para DTS passaram a incluir testes para outras doenças, principalmente a doença de Gaucher e Fibrose Cística. A tendência entre os membros da população Ashkenazita foi optar pelo teste para todas as condições (Kronn, 1998).

A doença de Canavan, uma leucodistrofia infantil, neurodegenerativa, de herança autossômica recessiva, também ocorre principalmente na população judaica Ashkenazita. Nessa população, a frequência de portadores da doença de

Canavan é de 1 em cada 49 indivíduos (Elpeleg *et al.*, 1994; Kaul *et al.*, 1994). Três mutações são responsáveis por 99% dos casos da doença em Ashkenazitas (Kaul *et al.*, 1994). A natureza fatal da doença (na infância), a ausência de tratamento ou cura e um quadro clínico ominoso, fazem da doença de Canavan a melhor candidata a um programa preventivo nos moldes daquele aplicado a DTS (Ostrer *et al.*, 1998).

Na continuidade de um programa de triagem da DTS nas escolas judaicas, seria desejável se avaliar a inclusão da doença de Canavan. As triagens para as doenças de Gaucher e Fibrose Cística são eticamente mais questionáveis devido à existência de tratamento, à sobrevida prolongada dos afetados e à heterogenidade clínica. Esses fatores aliados ao fato dos alunos serem adolescentes tornam controversa a inclusão dessas doenças num programa de triagem voltado ao ensino médio.

Uma discussão abrangente da utilização das amostras de DNA dos programas preventivos da DTS para estudo de outras doenças, foi realizada por Ostrer *et al.* (1998) e Wadman (1998). Esses autores estabelecem limites mas favorecem esta possibilidade, desde que as amostras permaneçam anônimas e os resultados não estigmatizem a população em risco.

5.8. Perspectivas futuras dos programas preventivos

Uma vez que em decorrência da triagem populacional para a DTS, os casais de portadores passam a ter mais filhos, na sua maioria heterozigotos, poderia se considerar que esses programas aumentam a frequência das mutações

causadoras da DTS na população judaica. No entanto, o impacto na frequência gênica é mínimo, pois as doenças recessivas são passadas pelas gerações basicamente através de casais portador/não-portador. O efeito a longo prazo é de apenas reduzir levemente a taxa de remoção do gene da população (Motulsky *et al.*, 1971; Kaback *et al.*, 1993; Beiguelman & Krieger, 1999).

A experiência de diversos programas de triagem da DTS mostrou que o principal efeito desses é antecipar o DPN para casais em risco. De outra forma, esses casais só buscariam essa opção após o nascimento de uma criança afetada. No entanto, de um ponto de vista ético, programas preventivos baseados na existência do DPN da doença, cuja principal opção dos casais em risco seja a interrupção de gravidez de fetos afetados podem ser controvertidos, e devem ser vistos como uma alternativa temporária, até o surgimento de tratamento ou cura para a doença (Kaback *et al.*, 1993).

A perspectiva mais promissora no tratamento das gangliosidoses é um inibidor da biossíntese de glicosfingolipídeos (gangliosídeo G_{M2}), a N-butil-deoxinojirimicina (*N*-(*n*-butil)-1,5-dideoxi-1,5-imino-D-glucitol) (NB-DNJ), atualmente em triagem clínica para o tratamento da doença de Gaucher, tipo 1 (Platt *et al.*, 1997; Jeyakumar *et al.*, 1999). Testado nos modelos animais da DTS, essa substância, capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, preveniu o acúmulo do gangliosídeo G_{M2} , com o número de neurônios com acúmulo e a quantidade de gangliosídeo armazenada em cada célula, reduzida. A administração foi via oral. Em modelos animais da doença de Sandhoff, mais próximos da DTS em humanos, o aumento na expectativa de vida foi de 40%. Essa terapia requer no entanto atividade enzimática residual, no caso da DTS, presente apenas nas

variantes de início juvenil e tardio. Conforme essas terapias se tornarem acessíveis, poderá ser necessário direcionar o tratamento conforme o genótipo do indivíduo encerrando análise molecular e triagem populacional.

Esses achados não devem alterar, por enquanto, as abordagens preventivas. Embora tenha sido proposto que os programas de triagem populacional fossem uma abordagem intermediária até o desenvolvimento de um tratamento para a doença (Kaback *et al.*, 1993), as pesquisas de tratamento vêm fortalecendo a necessidade de triagem, uma vez que a terapia gênica intra-uterina (Zanjani & Anderson, 1999), ou o tratamento no período pré-sintomático (até 4 meses de vida) deverão ser necessários (Jeyakumar *et al.*, 1999). Desta forma, não se justificaria adiar o início de um programa preventivo no Brasil, devido aos avanços na pesquisa de tratamento.

6. CONCLUSÕES

- 1) A frequência de portadores das principais mutações causadoras da doença de Tay-Sachs (DTS) na população de alunos das escolas judaicas brasileiras estudadas foi de um 1/51.
- 2) A frequência estimada de portadores da DTS na população judaica Ashkenazita brasileira foi de 1/33.
- 3) A taxa de participação voluntária num programa piloto de triagem populacional da DTS no ensino médio foi de 70% (1998 a 2000).
- 4) O diagnóstico molecular da DTS permite o estabelecimento do teste de detecção de portadores num laboratório de biologia molecular a um custo significativamente inferior ao de um diagnóstico enzimático.

Assim, conclui-se que, desde que sejam contemplados os diversos aspectos éticos envolvidos, é viável o desenvolvimento de um programa preventivo da DTS no Brasil.

7. RESUMO

A doença de Tay-Sachs (DTS) é uma doença neurodegenerativa, de herança autossômica recessiva, que se manifesta a partir do sexto mês de vida. Crianças afetadas desenvolvem degeneração física e mental intensa, levando à morte até os 5 anos de idade. Não há atualmente cura ou tratamento disponível.

Na população judaica, 1 em cada 31 indivíduos é portador da DTS, e a incidência da doença (aproximadamente 1 em cada 4.000 nascimentos) é cerca de 100 vezes maior nesta do que em outras populações.

O advento do diagnóstico pré-natal para a DTS e o concomitante desenvolvimento de programas de detecção e orientação de heterozigotos da DTS em populações de judeus Ashkenazitas, iniciados em massa desde 1970, levaram a uma diminuição de 90% da incidência da doença nesta população. Estes programas são realizados em Israel, EUA e no Canadá, na população franco-canadense.

Três mutações no gene HEXA, codificador da sub-unidade α da enzima hexosaminidase A, são responsáveis por 98% dos casos da DTS na população judaica Ashkenazita. Esse fato possibilita a utilização de um teste de DNA para a identificação de portadores da DTS nesta população.

Segundo o censo do IBGE de 1991, a população judaica no Brasil é de 86.416 indivíduos. Este trabalho visou analisar a necessidade e a aceitação de um programa de detecção e orientação de portadores da DTS nesta população. Em particular, procurou-se (1) estabelecer a freqüência das 3 principais mutações

causadoras da DTS na população judaica brasileira; (2) avaliar a reação de indivíduos desta população à proposta de um programa de triagem de portadores da DTS, com o objetivo de orientação para casais em risco de terem crianças afetadas.

Este estudo foi realizado em escolas judaicas de ensino médio, em São Paulo e no Rio de Janeiro, seguindo o modelo canadense. Dentre 581 alunos (≥ 16 anos) que assistiram palestras informativas, 404 participaram da pesquisa, indicando uma taxa de participação de 70%. De acordo com os dados dos formulários de consentimento, aproximadamente 65% dos cromossomos analisados eram de origem judaica Ashkenazita.

A análise das 3 mutações comuns no gene HEXA nestes 404 indivíduos detectou 8 portadores da DTS (7 da mutação InsTATC1278 e 1 de IVS12+1). Assim, a frequência de portadores na amostra foi de 1 em cada 51 indivíduos. Considerando somente os cromossomos de origem judaica Ashkenazita, nossos dados indicam que a frequência de portadores da DTS na amostra é de 1 em cada 33 indivíduos. As frequências encontradas são equivalentes àquelas descritas em outras populações judaicas ($P > 0,05$).

Baseando-se nestes dados, conclui-se que justifica-se a implementação de um programa de identificação e orientação de portadores da DTS na população judaica brasileira. A contemplação dos diversos aspectos éticos envolvidos são parte essencial deste programa.

8. ABSTRACT

Tay-Sachs disease (TSD) is an autosomal recessive disease of lysosome storage characterized by progressive nervous degeneration. Children affected by TSD manifest first symptoms around 6 months and die before 5 years of age. TSD is caused by mutations in the HEXA gene, coding for the α subunit of the hexosaminidase A enzyme. In the absence of the enzyme, its substrate, G_{M2} ganglioside, accumulates in the neurons of the central nervous cortex. Late onset TSD (chronic form) is a rare variant phenotype with appearance of first symptoms during the second or third decade of life.

In the Ashkenazi Jewish population, 1 in every 31 individuals is a TSD carrier. The disease incidence (1 in every 4,000 newborns) is 100 times higher in this population.

The advent of pre-natal diagnosis for TSD and the development of preventive screening programs massively adopted by Ashkenazi Jewish populations led to a 90% decrease in the disease incidence in this group.

Three mutations in the HEXA gene are responsible for 98% of the disease incidence in Ashkenazi Jews. This led to the establishment of a DNA test for detection of TSD carriers in this population.

The Brazilian Ashkenazi Jewish population is around 100,000 individuals. This work aimed to establish the need and the acceptance of a screening program for this population. Specifically, it established the frequency of the 3 most common

TSD mutations in a sample of the brazilian jewish population and evaluated the reaction of the community to the offer of a preventive program.

This work was undertaken in jewish senior high-school students, in São Paulo and Rio de Janeiro, following the canadian preventive model. From 581 students (≥ 16 years old) that attended educational sessions, 404 volunteered to the test, indicating a 70% participation rate. According to the data of the consent form, approximately 65% of the chromosomes were associated to Ashkenazi jewish ancestry.

The molecular analysis of the 3 most common mutations in the HEXA gene from the 404 participants detected 8 carriers (7 of InsTATC1278 and 1 of IVS12+1), thus indicating a carrier frequency of 1/51. In the Ashkenazi fraction, the estimated carrier frequency is 1 in 33 individuals. Both frequencies are similar to those described for other jewish communities ($P > 0,05$).

Based in this findings, it was concluded that the implementation of a screening program for TSD in the brazilian jewish population is feasible. The ethical aspects involved are an essential part of such a program.

9. ANEXO

Formulário de consentimento para participação no projeto de
orientação para portadores da
DOENÇA DE TAY-SACHS

Introdução:

A doença de Tay-Sachs é uma doença hereditária causada por uma deficiência enzimática. Um bebê afetado pela doença de Tay-Sachs desenvolve-se normalmente nos primeiros meses de vida e então passa a apresentar atraso no desenvolvimento físico e mental, devido a uma degeneração neurológica progressiva, que leva à morte do afetado entre os 2 e os 5 anos de idade. Entre os principais sinais da doença estão surdez, cegueira, demência e atraso no desenvolvimento psicomotor. Não há atualmente cura e nem tratamento disponível.

A doença de Tay-Sachs é apenas uma dentre diversas doenças genéticas recessivas. Estas doenças tendem a se acumular em populações específicas. No caso da doença de Tay-Sachs as populações mais atingidas são principalmente a população judaica Ashkenazi e a população franco-canadense de Quebec.

Uma criança pode ser afetada pela doença de Tay-Sachs somente se ambos, pai e mãe, forem portadores (heterozigotos) do gene para a doença.

Os portadores do gene da doença de Tay-Sachs são indivíduos normais e não apresentam nenhum sinal ou sintoma da doença.

Na população judaica, 1 em cada 31 indivíduos é portador da doença de Tay-Sachs. Embora a frequência de portadores seja alta, a doença é rara, pois uma criança afetada só pode nascer caso tanto o pai quanto a mãe sejam portadores do gene e ambos transmitam o gene à criança, o que ocorre com probabilidade de 25%. A incidência da doença é de 1 em cada 4.000 nascimentos nas populações em risco.

A doença de Tay-Sachs não tem cura, mas pode ser evitada. Para isto, programas de detecção e orientação de portadores foram estabelecidos em Israel, EUA, Canada e outros países, para alertar os portadores e possibilitar aos casais de portadores que evitem ter filhos afetados, e tenham filhos normais. Desde o surgimento do diagnóstico pré-natal da doença e do início dos programas de triagem, **a incidência da doença foi reduzida em mais do que 90% nestes países.**

Através do conhecimento de sua condição, um portador pode evitar de diversas formas que seus filhos tenham risco de serem afetados pela doença de Tay-Sachs, conforme explicado adiante.

Descrição do projeto:

Este projeto está destinado a todos os alunos de 3º ano do ensino médio das escolas judaicas, e consiste em apresentar uma palestra sobre a doença de Tay-Sachs e possibilitar aos alunos que façam um teste para saberem se são portadores do gene da doença de Tay-Sachs. Após ter assistido à apresentação feita em sala de aula, se o aluno deseja participar e conhecer o resultado de seu teste, basta completar o questionário abaixo e solicitar a um de seus pais que completem e assinem o questionário dirigido aos pais. É necessário o consentimento do pai ou da mãe para a participação.

O teste é feito sobre uma amostra de esfregaço da mucosa bucal. Não são realizadas punções e não há necessidade de se retirar sangue para a realização do teste. Os resultados são confidenciais e apenas o indivíduo testado terá conhecimento do resultado de seu teste. Este resultado será enviado ao aluno pelo correio, no endereço fornecido.

Benefícios:

Conforme explicado aos alunos em aula, um eventual portador da doença pode, através deste projeto, ter conhecimento de que é portador e evitar, no futuro, que seus filhos possam ser afetados pela doença de Tay-Sachs. Voltamos a enfatizar que os portadores do gene da doença são indivíduos perfeitamente normais que portam uma mutação silenciosa e não apresentam qualquer sintoma da doença. Aos portadores da doença é sugerido que busquem aconselhamento genético de seu médico ao decidirem ter filhos.

Um portador do gene da doença de Tay-Sachs correrá risco de gerar uma criança afetada apenas se seu parceiro também for portador do gene. Um casal de portadores tem um risco de 25% de que uma gravidez resulte em uma criança afetada. O casal de portadores pode evitar ter uma criança afetada pela doença de Tay-Sachs de várias formas, tais como a realização de diagnóstico pré-natal, a adoção, a doação de gametas, e o diagnóstico pré-implantação; ou simplesmente correr o risco.

A participação nesta pesquisa é voluntária e pode ser interrompida a qualquer momento, sem que isso prejudique a atividade escolar do aluno.

Os dados desta pesquisa constituirão uma tese de mestrado. Não serão utilizados nomes uma vez que os resultados dos testes são confidenciais. Os pesquisadores podem ser contatados no Laboratório de Genética Molecular, pelo telefone (0xx11) 38187476, ou diretamente no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sala 350.

RESULTADOS POSSÍVEIS DO TESTE:

modelo

RESULTADO NEGATIVO DO EXAME DE DETECÇÃO DE PORTADORES DE MUTAÇÕES CAUSADORAS DA DOENÇA DE TAY-SACHS

Você não é portador de nenhuma das 3 principais mutações causadoras da doença de Tay-Sachs na população judaica Ashkenazi.

Estas mutações são responsáveis por cerca de 98% dos casos da doença de Tay-Sachs nessa população. Assim sendo, o risco de uma criança que você venha futuramente a ter, nascer afetada pela doença de Tay-Sachs é **desprezível**.

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Lygia da Veiga Pereira, PhD
Instituto de Biociências - USP
Tel: (0xx11) 38187476
e-mail: lpereira@usp.br

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Roberto Rozenberg
Instituto de Biociências - USP
Tel: (0xx11) 38187476
e-mail: robertorozenberg@hotmail.com

modelo

RESULTADO POSITIVO DO EXAME DE DETECÇÃO DE PORTADORES DO GENE DA DOENÇA DE TAY-SACHS

Você é portador do gene da doença de Tay-Sachs (nome da mutação).

Conforme já lhe foi explicado, **isso não acarreta qualquer problema ou risco para sua saúde.**

No entanto, é aconselhável que quando decidir ter filhos, você procure aconselhamento genético de seu médico.

Este aconselhamento consistirá em testar seu(sua) futuro(a) parceiro(a) quanto à presença do gene da doença de Tay-Sachs. Caso seu parceiro não seja portador, não há risco de seus filhos apresentarem a doença. Caso seu parceiro também seja portador, vocês deverão considerar algumas opções, para evitarem ter filhos afetados pela doença, conforme orientação médica.

Estamos à sua inteira disposição para quaisquer dúvidas que você deseje esclarecer, através do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Biociências da USP, pelo telefone abaixo.

Caso seus pais, irmãos ou parentes desejem submeter-se ao teste, estaremos à disposição para a realização gratuita deste em nosso laboratório até Agosto de 2000, uma vez que eles também podem possuir o gene para a doença.

Informamos também que o serviço de aconselhamento genético do IB-USP está à sua disposição para a realização gratuita de aconselhamento genético, no presente ou no futuro.

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Lygia da Veiga Pereira, PhD
Instituto de Biociências – USP
Tel: (0xx11) 38187476
e-mail: lpereira@usp.br

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Roberto Rozenberg
Instituto de Biociências - USP
Tel: (0xx11) 38187476
e-mail: robertorozenberg@hotmail.com

Questionário: (dirigido ao aluno)

1) Antes desta exposição e da aula que você assistiu, você tinha conhecimento da existência da doença de Tay-Sachs?

☐ Sim ☐ Não

2) Em caso afirmativo, através de que ou quem você ficou sabendo sobre a doença, antes da aula apresentada?

- ☐ Meus pais
☐ outros parentes que moram no Brasil
☐ parentes que não moram no Brasil
☐ livros
☐ professores
☐ outros. Se possível especifique qual a fonte: _____

3) Você possui irmãos ou primos de 1º grau, com a mesma idade, com um ou dois anos a mais que você, que estudem em colégios judaicos? (indique quantos em caso positivo, certifique-se que eles(as) tenham a mesma idade, um ou dois anos a mais do que você e estudem no Renascença, Bialik, Peretz, Liessin (RJ) ou Eliezer Steinberg (RJ))

☐ Sim, ____ irmãos. ☐ Sim, ____ primos de primeiro grau. ☐ Não

4) Em caso afirmativo, em que escola estuda e qual a idade de seu primo/irmão?

5) Você deseja participar desta pesquisa?

☐ Sim ☐ Não

6) Você deseja saber o resultado do teste?

☐ Sim ☐ Não

7) Quantos irmãos você possui, e qual a idade deles?

8) Você é:

☐ Ashkenazi ☐ Sefaradi ☐ Misturado

9) Você gostaria de receber o resultado do exame por telefone, ou prefere, como é o caso neste exame, receber o resultado pelo correio apenas?

10) Qual o país de nascimento de seu:

Pai: _____

Avô paterno: _____

Avó paterna: _____

Mãe: _____

Avô materno: _____

Avó materna: _____

Nome: _____

Colégio: _____

Classe: _____

Endereço: _____

CEP:

--	--	--	--	--

 –

--	--	--	--

Cidade / Estado: _____

Data de nascimento: _____

Cidade de nascimento: _____

Data: __/__/00

Assinatura: _____

Caso deseje fazer algum comentário, sugestão ou crítica utilize o espaço abaixo:

Questionário destinado aos pais:

Caso um dos dois esteja ausente, preencher apenas os dados daquele presente. É necessária a assinatura de pelo menos um dos dois para que possamos realizar o teste. Caso não deseje responder a algum dos itens, deixe a lacuna correspondente em branco.

Questionário destinado ao pai:

1) O Sr. tinha conhecimento da existência da doença de Tay-Sachs?

☐ Sim ☐ Não

2) Em caso afirmativo qual a fonte deste conhecimento?

☐ Parente estrangeiro. Caso possível favor especificar o país onde mora seu parente: _____

☐ Amigos

☐ Livros

☐ Eu trabalho na área médica

☐ Programa preventivo realizado no Brasil (anos 80)

☐ Outros. Se possível especifique qual a fonte: _____

3) Data e local de nascimento: _____

4) O Sr. possui pais ou avós de origem Ashkenazi?

☐ Sim ☐ Não

5) País de origem de seu pai (avô paterno do(a) aluno(a)) _____

6) País de origem de sua mãe (avó paterna do(a) aluno(a)) _____

7) O Sr. já realizou teste para portadores da doença de Tay-Sachs?

☐ Não ☐ Sim. Aonde? _____

8) O Sr. possui pais ou irmãos vivendo em Israel, EUA ou Canadá?

☐ Não ☐ Sim

9) Na sua opinião, como se qualifica este programa preventivo?

- ☐ negativo
- ☐ insignificante
- ☐ pouco importante
- ☐ importante
- ☐ muito importante
- ☐ imprescindível

10) Caso deseje fazer algum comentário adicional, utilize o espaço abaixo:

11) Eu concordo que meu(minha) filho(a) participe nesta pesquisa.

Data: __/__/00

Assinatura:

Questionário destinado à mãe:

1) A Sra. tinha conhecimento da existência da doença de Tay-Sachs?

☐ Sim ☐ Não

2) Em caso afirmativo qual a fonte deste conhecimento?

☐ Parente estrangeiro. Caso possível favor especificar o país onde mora seu parente: _____

☐ Parente brasileiro

☐ Amigos

☐ Eu trabalho na área médica

☐ Programa preventivo no Brasil (década de 80)

☐ Outros. Se possível especificar qual: _____

3) Data e local de

nascimento: _____

4) A Sra. possui pais ou avós de origem Ashkenazi?

☐ Sim ☐ Não

5) País de nascimento de seu pai (avô materno do(a) aluno(a)) _____

6) País de nascimento de sua mãe (avó materna do(a) aluno(a)) _____

7) A Sra. já realizou teste para portadores da doença de Tay-Sachs?

☐ Não ☐ Sim. Aonde? _____

8) A Sra. possui pais ou irmãos vivendo em Israel, EUA ou Canadá?

☐ Não ☐ Sim

9) Na sua opinião, qual a importância deste programa preventivo?

- ☐ negativo
- ☐ insignificante
- ☐ pouco importante
- ☐ importante
- ☐ muito importante
- ☐ imprescindível

10) Caso deseje fazer algum comentário adicional, utilize o espaço abaixo:

11) Eu concordo que meu(minha) filho(a) participe nesta pesquisa.

Data: __/__/00

Assinatura:

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerman BR; Natowicz MR; Kaback MM; Loyer M; Campeau E; Gravel RA. Novel mutations and DNA-based screening in non-jewish carriers of Tay-Sachs disease. *Am j Hum Genet*, **60**: 1099-1106, 1997.

Aronson, MA; Volk BW. Genetic and demografic considerations concerning Tay-Sachs disease. Em: *Cerebral Sphingolipidoses: A Symposium on Tay-Sachs disease and allied disorders*. Academic Press Inc, NY, 375-394, 1962.

Arpaia E, Dumbrille-Ross A, Maler T, Neote K, Tropak M, Troxel C, Stirling JL, Pitts JS, Bapat B, Lamhonwah AM, Mahuran DJ, Schuster SM, Clarke JTR, Lowden JA, Gravel RA. Identification of an altered splice site in Ashkenazi Tay-Sachs disease. *Nature*, **333**: 85-86, 1988.

Bach G, Zlotogora J, Ziegler M. Lysosomal storage disorders among jews. *Genetic Diversity among Jews*, Oxford University Press, New York, 301-304, 1992.

Beiguelman B, Krieger H. Efeito da prevenção de doenças genéticas sobre as frequências gênicas. *Genetics and Molecular Biology*, **22** (Encarte), 1999.

Blitzer MG, McDowell GA. Tay-Sachs disease as a model for screening inborn errors. *Clin Lab Med*, **12**: 463-480, 1992.

Bowman, J. Prenatal screening for hemoglobinopathies. *Am J Hum Genet*, **48**: 433-438, 1991.

Brown CA, Mahuran DJ: Beta-hexosaminidase isozymes from cells cotransfected with alpha and beta cDNA constructs: analysis of the alpha-subunit missense mutation associated with the adult form of Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet*, **5**: 497-508, 1993.

Buchalter MS, Wannmacher CMD, Wajner M. Tay-Sachs disease: screening and prevention program in Porto Alegre. *Rev Brasil Genet* **VI**, **3**: 539-547, 1983.

Buchalter MS, Wannmacher CMD, Wajner M. Tay-Sachs disease heterozygote detection in Brazil: comparison between tears and leukocytes as β -hexosaminidase A source. *J Inher Dis*, **7**: 35-37, 1984.

Chakravarti A, Chakraborty R. Elevated frequency of Tay-Sachs disease among Ashkenazic jews unlikely by genetic drift alone. *Am J Hum Genet*, **30**: 256-261, 1978.

Chase GA, McKusick VA. Founder effect in Tay-Sachs disease. *Amer J Hum Genet*, **24**: 339-340, 1972.

Chavani C, Jendoubi M. Biology and potential strategies for the treatment of G_{M2} gangliosidoses. *Mol Med Today*, **4**: 159-165, 1998.

Clarke JT, Skomorowski MA, Zuker S. Tay-Sachs disease carrier screening: follow-up of a case-finding approach. *Am J Med Genet*, **34**: 601-605, 1989.

Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*, **156**: 650-654, 1997.

Conzelmann E, Kytzia H-J, Navon R, Sandhoff K. Ganglioside G_{M2} N-acetyl-beta-D-hexosaminidase activity in cultured fibroblasts of late-infantile and adult G_{M2} gangliosidosis patients and of healthy probands with low hexosaminidase level. *Am J Hum Genet*, **35**: 900-913, 1983.

Dana S & Wasmuth JJ. Selective linkage disruption in human-Chinese hamster cell hybrids: deletion mapping of the leuS, hexB, emtB, and chr genes on human chromosome 5. *Molec Cell Biol*, **2**: 1220-1228, 1982.

Decol RD. Imigrações urbanas para o Brasil: o caso dos judeus. Tese de doutorado, Depto de Sociologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1999.

DellaPergola S. Major demographic trends of world jewry: the last hundred years. *Genetic Diversity Among Ashkenazi Jews*, Oxford University Press, New York, 3-30, 1992.

DellaPergola S. World jewish population. Em: *American Jewish Year Book*, 2000, ed. David Singer e Ruth Seldin, NY, 2000.

De Gasperi R, Gama Sosa MA, Battistini S, Yeretsian J, Raghavan S, Zelnik N, Leshinski E, Kolodny EH. Late-onset G_{M2} gangliosidosis: Ashkenazi jewish family with an exon 5 mutation (Tyr180→His) in the Hex A α -chain gene. *Neurology*, **47**: 547-552, 1996.

DeMarchi JM, Caskey CT, Richards CS. Population-specific screening by mutation analysis for diseases frequent in Ashkenazi jews. *Human Mutation*, **8**: 116-125, 1996.

Elpeleg ON, Anikster Y, Barash V, Branski D, Shaag A. The frequency of the C854 mutation in the aspartoacylase gene in Ashkenazi jews in Israel. *Am J Hum Genet*, **55**: 287-288, 1994.

Fausouliotis SJ, Schenker JG. Pre-implantation genetic diagnosis principles and ethics. *Human Reproduction*, **13**: 2238-2245, 1998.

Fernandes M, Boulay B, Hechtman P, Kaplan F, Strasberg P. Five novel HEXA mutations in non-jewish Tay-Sachs disease (TSD) patients. *Am J Hum Genet* **51**, A656, 1992a.

Fernandes MJG, Kaplan F, Clow CL, Hechtman P, Scriver CR. Specificity and sensitivity of hexosaminidase assays and DNA analysis for the detection of Tay-Sachs disease gene carriers among Ashkenazic jews. *Genetic Epidemiology*, **9**: 169-175, 1992b.

Fernandes MJG, Hechtman P, Boulay B, Kaplan F. A chronic G_{M2} gangliosidosis variant with a HEXA splicing defect: quantitation of HEXA mRNAs in normal and mutant fibroblasts. *Eur J Hum Genet*, **5**: 129-136, 1997.

Goodman R. A perspective on genetic diseases among the jewish people. *Genetic Diversity Among Jews*, Raven Press, New York, 1-17, 1979.

Gravel RA, Clarke JT, Kaback MM, Mahuran D, Sandhoff K, Suzuki K. The G_{M2} gangliosidosis. Em: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DV (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed., New York: McGraw-Hill, 2839-2879, 1995.

Guidoti JE, Mignon A, Haase G, Caillaud C, McDonell N, Kahn A, Poenaru L. Adenoviral gene therapy of the Tay-Sachs disease in hexosaminidase A-deficient knock-out mice. *Hum Mol Genet*, **8**: 831-838, 1999.

Hechtman P, Kaplan F, Bayleran J, Boulay B, Andermann E, de Braekeleer M, Melancon S, Lambert M, Potier M, Gagne R, Kolodny E, Clow C, Capua A, Prevost C, Scriver C. More than one mutant allele causes infantile Tay-Sachs disease in French-Canadians. *Am J Hum Genet*, **47**: 815-822, 1990.

Hechtman P, Kaplan F. Tay-Sachs disease screening and diagnosis: evolving technologies. *DNA and Cell Biology*, **8**: 651-665, 1993.

Heng HH, Xie B, Shi XM, Tsui LC, Mahuran DJ. Refined mapping of the G_{M2} activator protein (GM2A) locus to 5q31.3-q33.1, distal to the spinal muscular atrophy locus. *Genomics*, **18**:429-31, 1993.

Jeyakumar M, Butters TD, Cortina-Borja M, Hunnam V, Proia RL, Perry VH, Dwek RA, Platt FM. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Nat Acad Sci*, **96**: 6388-6393, 1999.

Jorde LB. Genetic Diseases in the Ashkenazi population: evolutionary considerations. *Genetic Diversity Among Jews*, Oxford University Press, New York, 305-318, 1992.

Jorde LB, Carey JC, White RL. Genetic screening, genetic diagnosis and gene therapy. Em: *Medical Genetics*. Mosby-Year Book, Inc., 210-216, 1994.

Kaback MM. Thermal fractionation of serum hexosaminidases: applications to heterozygote detection and diagnosis of Tay-Sachs disease. *Methods Enzymol*, **28**: 862-867, 1972.

Kaback MM, Zeiger RS. Heterozygote detection in Tay-Sachs disease: a prototype community screening program for the prevention of recessive genetic disorders. Em: Volk BW, Aronson SM, eds. *Sphingolipids, Sphingolipidosis and Allied disorders: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Nova York, NY: Plenum Press Inc. **19**: 613-632, 1972.

Kaback MM, Lim-Steele J, Dabholkar D, Brown D, Levy N, Zeiger K. Tay-Sachs disease – carrier screening, prenatal diagnosis, and the molecular era – an international perspective, 1970 to 1993. *J Am Med Assoc*, **270**: 2307-2315, 1993.

Kaplan, F. Tay-Sachs disease carrier screening: A model for prevention of genetic disease. *Genetic Testing*, **4**: 271-292, 1998.

Kaufman M, Grishpun-Cohen J, Karpati M, Peleg L, Goldman B, Akstein E, Adam A, Navon R. Tay-Sachs disease and HEXA mutations among moroccan jews. *Hum Mutation*, **10**: 295-300, 1997.

Kaul R, Gao GP, Aloya M, Balamurugan K, Petrosky A, Michals K, Matalon R. Canavan disease: mutations among Jewish and non-Jewish patients. *Am J Hum Genet*, **55**: 34-41, 1994.

Kolodny EH. Tay-Sachs disease. *Genetic Diseases Among Ashkenazi Jews*. Goodman and Motulsky, Raven Press, New York, 217-229, 1979.

Kolodny EH. Carrier testing for lysosomal diseases: problems and prospects. *Genetic Diversity Among Ashkenazi Jews*. Oxford University Press, New York, 333-345, 1992.

Kolter T, Sandhoff K. Glycosphingolipid degradation and animal models of G_{M2} gangliosidoses. *J Inherit Metab Dis*, **21**: 548-563, 1998.

Kleinman M. An alternative program for the prevention of Tay-Sachs disease. *Genetic Diversity Among Ashkenazi Jews*. Oxford University Press, New York, 346-348, 1992.

Kronn D, Jansen V, Ostrer H. Carrier Screening for cystic fibrosis, Gaucher disease, and Tay-Sachs disease in the Ashkenazi Jewish population: the first 1000

cases at New York University Medical Center, New York, NY. Arch Intern Med, **158**: 777-781, 1998.

Landels EC, Ellis IH, Fensom AH, Green PM, Bobrow M. Frequency of the Tay-Sachs disease splice and insertion mutations in the UK Ashkenazi Jewish population. J Med Genet, **28**: 177-180, 1991.

Levin, M. Screening Jews and Genes: A consideration of the ethics of genetic screening within the jewish community: challenges and responses. Genetic Testing, **3**: 207-213, 1999.

Mange AP, Mange EJ. Inborn errors of metabolism. Em: Genetics: Human Aspects. Sinauer Associated Inc, 314-317/511-512, 1989.

Mitchell JJ, Capua A, Clow C, Scriver CR. Twenty-year outcome analysis of genetic screening programs for Tay-Sachs and β -Thalassemia disease carriers in high schools. Am J Hum Genet, **59**: 793-798, 1996.

Motulsky AG, Fraser GR, Felsenstein J. Public health and long-term genetic implications of intrauterine diagnosis and selective abortion. Birth Defects, **5**: 22-32, 1971.

Myerowitz R, Piekarz R, Neufeld EF, Shows TB, Suzuki K. Human beta-hexosaminidase alpha chain: coding sequence and homology with the beta chain. Proc Natl Acad Sci, **82**: 7830-7834, 1985.

Myerowitz R, Hogikyan ND. Different mutations in Ashkenazi jewish and non-jewish french canadians with Tay-Sachs disease. Science, **232**: 1646-1648, 1986.

Myerowitz R, Costigan FC. The major defect in Ashkenazi jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J Biol Chem*, **263**: 18587-18589, 1988.

Myrianthopoulos NC. Some epidemiologic and genetic aspects of Tay-Sachs disease. Em: Aronson, MA; Volk BW, eds. *Cerebral Sphingolipidoses: A Symposium on Tay-Sachs disease and allied disorders*. Academic Press Inc NY, 359-374, 1962.

Myrianthopoulos NC, Aronson SM. Population dynamics of Tay-Sachs disease, I: Reproductive fitness and selection. *Am J Hum Genet*, **18**: 313-325, 1966.

Myrianthopoulos NC, Aronson SM. Reproductive fitness and selection. Em: Aronson, MA; Volk BW, eds. *Tay-Sachs disease and inborn errors of sphingolipids metabolism*. Nova York, NY: Pergamon Press Ltd, 1967.

Nakai H, Byers MG, Nowak NJ, Shows TB. Assignment of beta-hexosaminidase A alpha-subunit to human chromosomal region 15q23-q24. *Cytogenet Cell Genet*, **56**: 164, 1991.

Navon R, Argov Z, Frisch A. Hexosaminidase a deficiency in adults. *Am J Med Genet*, **24**: 179-196, 1986.

Navon R, Proia RL. The mutations in Ashkenazi jews with adult G_{M2} gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. *Science*, **243**: 1471-1474, 1989.

Navon R, Kolodny EH, Mitsumoto H, Thomas GH, Proia RL. Ashkenazi jewish and non-jewish adult G_{M2} gangliosidosis patients share a common genetic defect. *Am J Hum Genet*, **46**: 817-821, 1990.

Navon R, Proia LP. Tay-Sachs disease mutations in Moroccan Jews: deletion of a phenylalanine in the α -subunit of β -hexosaminidase. *Am J Hum Genet*, **48**: 412-419, 1991.

O'Brien JS, Okada S, Chen A, Fillerup DL. Tay-Sachs disease: detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. *N Engl J Med*, **283**: 15-20, 1970.

O'Brien, JS, Okada S, Fillerup DL, Veath ML, Adornato BT, Brenner PH, Leroy JG. Tay-Sachs disease: prenatal diagnosis. *Science*, **172**: 61-64, 1971.

Ohno K, Suzuki K. A splicing defect due to an exon-intron junctional mutation results in abnormal beta-hexosaminidase alpha chain mRNAs in Ashkenazi jewish patients with Tay-Sachs disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **153**: 463-469, 1988.

Okada S, O'Brien JS. Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetyl-hexosaminidase component. *Science*, **165**: 698-700, 1969.

Ostrer H, Scheuermann RH, Picker LJ. Benefits and dangers of genetic tests. *Nature*, **392**: 14, 1998.

Paw BH, Kaback MM, Neufeld EF. Molecular basis of adult-onset and chronic G_{M2} gangliosidoses in patients of Ashkenazi jewish origin: substitution of serine for glycine at position 269 of the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *Proc Nat Acad Sci*, **86**: 2413-2417, 1989.

Peleg L, Goldman B. Detection of Tay-Sachs disease carriers among individuals with thermolabile Hexosaminidase B. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **32**: 65-69, 1994.

Peleg L , Karpati M, Gazit E, Raas-Rothschild A, Goldman B. Mutations of the hexosaminidase A gene in Ashkenazi and non-Ashkenazi jews. *Bioc Medicine and Metab biology*, **52**: 22-26, 1994.

Pelleg L, Frisch A, Goldman B, Karpaty M, Narinsky R, Bronstein S, Frydman M. Lower frequency of Gaucher disease carriers among Tay-Sachs disease carriers. *Eur J Hum Genet*, **6**: 185-186, 1998.

Pennybaker M, Liessem B, Moczall H, Tifft CJ, Sandhoff K, Proia RL. Identification of domains in human beta-hexosaminidase that determine substrate specificity. *J Biol Chem*, **271**: 17377-82, 1996.

Petersen GM, Rotter JI, Cantor RM, Field LL, Greenwald S, Lim JST, Roy C, Schoenfeld V, Lowden JA, Kaback MM. The Tay-Sachs disease gene in North American jewish populations: geographic variations and origins. *Am J Hum Genet*, **35**: 1258-1269, 1983.

Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Toensend MJ, Perry VH, Proia RL, Winchester B, Dwek RA, Butters TD. Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-Butyldeoxynojirimycin. *Science*, **276**: 428-431, 1997.

Proia RL, Soravia E. Organization of the gene encoding the human beta-hexosaminidase alpha-chain. *J Biol Chem*, **262**: 5677-5681, 1987.

Rattner H. Tradição e mudança: a comunidade judaica em São Paulo, Ed. Ática, 1977.

Ribeiro MG, Pinto R, Miranda MCS, Suzuki K. Tay-Sachs disease : intron 7 splice junction mutation in two Portuguese patients. *Bioch et Biophys Acta*, **1270**: 44-51, 1995.

Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt David, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from bucal brushes/swabs. *Hum Mol Genet*, **2**: 159-163, 1993.

Rosemberg S, Lefèvre AB. Doença de Tay-Sachs em criança de raça negra. *Arq Neuro-Psiquiat*, **28**: 376-384, 1970.

Sachs B. A family form of idiocy, generally fatal, associated with early blindness (amaurotic family idiocy). *J Nervous Mental Disease* **23**: 475-479, 1887.

Sachs B. On arrested cerebral development, with special reference to its cortical pathology. *J Nervous Mental Disease* **14**: 541-553, 1896.

Schmidt JS, Diamant AJ, Krynski S, Kamei ME, Rodrigues MM, Takata S. Detección de errores congénitos del metabolismo en San Pablo, Brasil. *Bol Méd Hosp Infant Méx*, **38**: 217-229, 1981.

Schneck L, Valenti C, Amsterdam D, Friedland M, Adachi M, Volk, BW. Prenatal diagnosis of Tay-Sachs disease. *Lancet*, **1**: 582-583, 1970.

Shore S, Tomczak J, Grebner EE, Myerowitz R. An unusual genotype in an Ashkenazi jewish patient with Tay-Sachs disease. *Hum Mutat*, **1**: 486-490, 1992.

Slome, D. The genetic basis of amaurotic family idiocy. *J Genet*, **27**: 363-376, 1933.

Swallow DM, Islam I, Fox MF, Povey S, Klima H, Schepers U, Sandhoff K. Regional localization of the gene coding for the G_{M2} activator protein (GM2A) to chromosome 5q32-33 and confirmation of the assignment of GM2AP to chromosome 3. *Ann Hum Genet*, **57**: 187-193, 1993.

Takeda K, Nakai H, Hagiwara H, Tada K, Shows TB, Byers MG, Myerowitz R. Fine assignment of beta-hexosaminidase A alpha-subunit on 15q23-q24 by high resolution in situ hybridization. *Tohoku J Exp Med*, **160**: 203-211, 1990.

Tay W. Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant. *Transactions Ophthalmological Society, UK* **1**: 55-57, 1881.

Terry RD, Korey SR. Membranous cytoplasmic granules in infantile amaurotic idiocy. *Nature*, **188**: 1000-1002, 1960.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. A base molecular e bioquímica das doenças genéticas em: *Genética Médica*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 190-191, 1991.

Triggs-Raine B, Feingenbaum ASJ, Natowicz MR, Skomorowski MA, Schuster SM, Clarke JTR, Mahuran DJ, Kolodny EH, Gravel RA. Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi jews. A comparison of DNA-based and enzyme-based tests. *New Eng J Med* 323: 6-12, 1990.

Triggs-Raine B, Richard M, Wasel N, Prence E, Natowicz MR. Mutational analyses of Tay-Sachs disease: studies on Tay-Sachs carriers of french canadian background living in New England. *Am J Hum Genet*, **56**: 870-879, 1995.

Wadman M. 'Group debate' urged for gene studies. *Nature* **391**: 314, 1998.

Wagener D, Cavalli-Sforza LL, Barakat R. Ethnic variation of genetic disease: role of drift for recessive lethal genes. *Am J Hum Genet*, **30**: 262-270, 1978.

Yadao F, Hechtman P, Kaplan F. Formation of a ternary complex between G_{M2} activator protein, G_{M2} ganglioside and hexosaminidase A. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1340**: 45-52, 1997.

Yokoyama S. Role of genetic drift in the high frequency of Tay-Sachs disease among Ashkenazic Jews. *Ann Hum Genet*, **43**: 133, 1979.

Yoo H, Astrin KH, Desnick RJ. Comparison of enzyme and DNA analysis in a Tay-Sachs disease carrier screening program. *J Korean Med Sci*, **8**: 84-91, 1993.

Zanjani ED, Anderson WF. Prospects for in utero human gene therapy. *Science*, **285**: 2084-2087, 1999.

Zeesman S, Clow CL, Cartier L, Scriver CR. A private view of heterozygosity: eight-year follow-up study of the Tay-Sachs gene detected by high school screening in Montreal. *Am J Med Genet*, **18**: 769-778, 1984.

Zlotogora J, Zeigler M, Bach G. Selection in favor of lysosomal storage disorders? *Am J Hum Genet* **42**: 271-273, 1988.