

**Resumo:**

As variáveis envolvidas no processo de aquisição das habilidades terapêuticas se tornaram objeto de estudo da psicologia, visto sua importância na formação do psicólogo. O objetivo do estudo foi realizar uma revisão bibliográfica para explicitar quais seriam estas habilidades, o papel da supervisão e outras variáveis envolvidas neste processo. Concluiu-se que muito já pode ser previsto e controlado neste contexto, mas ainda são necessárias mais pesquisas na área.

**Palavras-chave:**

Habilidades Terapêuticas, Formação, Supervisão Clínica.

# FREQÜÊNCIA ALÉLICA E AUSÊNCIA DE DISTÚRBO DE SEGREGAÇÃO NO LOCUS DA Distrofia Miotônica EM INDIVÍDUOS NORMAIS

---

*Renata Camacho Miziara\**

*Claudia Emília Vieira Wiesel\*\**

*Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior\*\*\**

*Aguinaldo Luiz Simões\*\*\*\**

---

**Introdução**

Distrofia Miotônica (DM) é uma doença autossômica dominante neuromuscular progressiva causada por uma expansão anormal da repetição do trinucleotídeo CTG no gene DMPK localizado no cromossomo 19q13.3. Cromossomos normais tem até 50 repetições; o número de repetições CTG está correlacionado com o aumento da severidade da doença ou com a diminuição da idade de início dos sintomas (REDMAN et al., 1993). A incidência da doença varia muito entre diferentes populações: a alta taxa de 1: 8000 é encontrada entre indivíduos do oeste Europeu e brancos Norte Americanos (HARPER, 1990), 1:18000 em Japoneses (DAVIES et al., 1992) e é extremamente rara entre os Africanos (DADA, 1993; KRAHE et al., 1995); a performance reprodutiva de indivíduos afetados apresenta-se muito diminuída (HARPER, 1990). O número de repetições tende a aumentar quando cromossomos com mais de 50 repetições são transmitidos para os filhos. Com tal instabilidade, alelos podem alcançar formas expandidas de mil repetições em poucas gerações

---

\* Docente dos cursos de graduação em Biomedicina e Farmácia-Bioquímica do Centro Universitário de Araraquara - UNIARA e do curso de Odontologia e Farmácia-Bioquímica das Faculdades Unificadas da Fundação Educacional de Barretos.

\*\* Bióloga, doutora e especialista do laboratório de Genética-bioquímica do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

\*\*\* Docente da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

\*\*\*\* Docente do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

(NAKAGAWA et al., 1994); por outro lado, alelos com número de repetições inferior a 50 são estáveis e mostram uma taxa de mutação similar (10-5 - 10-3) a outras pequenas repetições em tandem no DNA humano (WEBER; WONG, 1993, RUBINSZTEIN et al., 1995, IMBERT et al., 1993).

Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual os alelos com número normal de repetições passam para o pool de alelos expandidos (POLANSKI; CHAKRABORTY, 1998). Ainda é duvidosa a existência de desvio meiótico na transmissão dos alelos: em famílias afetadas por DM, foi observado desvio meiótico favorecendo a transmissão dos alelos mutantes em meioses paternas (GENARELLI et al., 1994), mas também em meioses maternas (MAGGE; HUGHE, 1998); também os alelos maiores, mas ainda normais, tiveram transmissão preferencial relatada em meioses paternas (CAREY et al., 1994) e maternas (SHAW et al., 1995, CHACKRABORTY et al., 1996 e POLANSKI; CHAKRABORTY, 1998). Tal conflito nos levou a verificar a existência de distúrbio de segregação em trios (mãe-filho-suposto pai) selecionados entre pessoas normais submetidas a exames de rotina para investigação de paternidade; adicionalmente, são apresentadas estimativas de parâmetros de interesse forense que demonstram a potencialidade de uso deste locus em investigação de paternidade e/ou identificação genética.

### Material e métodos

Do total de 240 trios que procuram o serviço de Investigação de Paternidade da Clínica Civil do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 123 já foram estudados para outros marcadores (PAGOTTO et al., 1999) e cálculo de frequência alélica. Rotineiramente cada caso foi submetido a oito ou mais STRs até obter-se exclusão em dois loci ou 99,99% de probabilidade de paternidade; depois da exclusão de falsa paternidade, 182 trios foram selecionados apenas para cálculo de distúrbio de segregação.

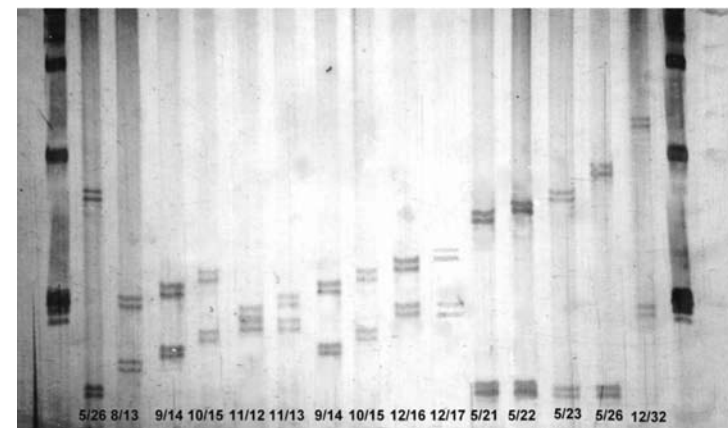
O DNA foi extraído de 300 µl de sangue total, amplificado por PCR (primers e condições), segundo a metodologia descrita por Ashizawa et al. (1993), e o produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante seguida de coloração por nitrato de prata (BASSAM et al., 1991).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado pelo teste exato usando o programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995). As proporções dos alelos segregantes foram estabelecidas por contagem direta e comparadas com um esperado de 50%.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (processo HCRP nr. 5158/98).

### Resultados

As frequências fenotípicas estão em equilíbrio ( $P=0.2653$ ). Encontramos 16 alelos (Figura 1), o menor com 5 e o maior com 32 repetições, registrando-se, pela primeira vez, a ocorrência dos alelos 23 e 32. Não encontramos, portanto, alelos expandidos, nem intermediários; entretanto, para confirmar tais achados, seria necessário o uso da técnica de Southern Blotting que não foi aplicada devido à pequena quantidade disponível de sangue.



**Figura 1:** Análise da PCR das repetições de trinucleotídeos CTG no locus DM. Produtos da reação separado em gel poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. O número abaixo de cada linha indica o tamanho da repetição (CTG)n.

Não houve desvio significativo da segregação (Tabela 1) nas meioses informativas paternas ( $n=135$ ) e nem maternas ( $n=134$ ).

**Tabela 1.** Frequência da transmissão de grandes e pequenos alelos no locus DM.

Meiose	Alelo Transmitido			Total	X <sup>2</sup> Assumindo Proporção 1:1
	Menor	Maior	Não Informativo		
Materna	62	72	48	182	0,746268
Paterna	70	65	47	182	0,185185
Total	132	137	95	364	0,931453

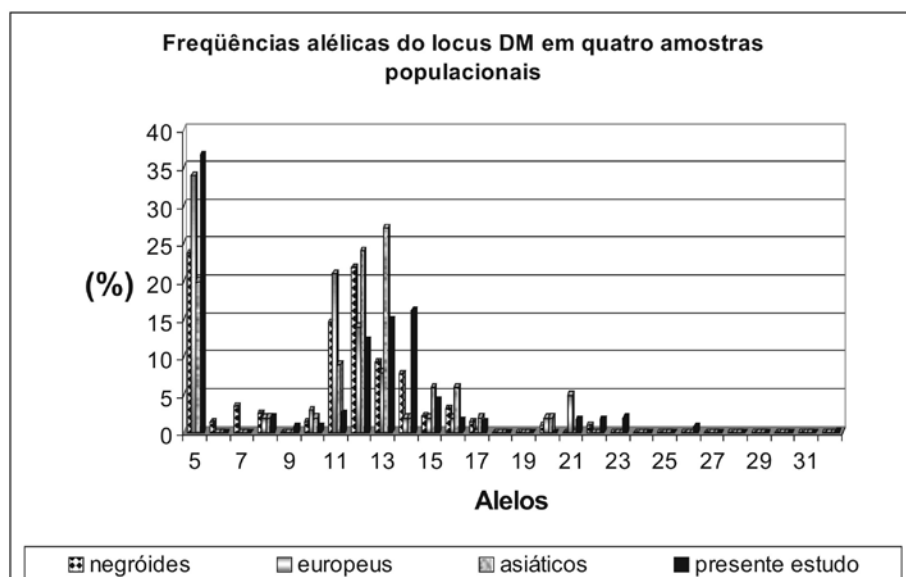
### Discussão

A caracterização dos alelos foi feita após repetição exaustiva da eletroforese das amostras comparando-as umas às outras lado a lado tornando-se possível, ao final, a construção de uma escada alélica com todos os alelos

encontrados neste locus, ficando claro os pontos em que faltam alguns alelos (6,7,18,19,20,24,25,27,28,29,30,31); a numeração foi feita após comparação com o perfil de frequências da literatura.

O estudo da variação normal deste locus em diferentes populações restringe-se a poucos levantamentos (GOLDMAN et al., 1994; ZERYLNICK et al., 1995; CHACKRABORTY et al., 1996; GOLDMAN et al., 1996) para os quais foi empregada a técnica de PCR com primers marcados radioativamente. A análise do produto amplificado por eletroforese em PAGE seguida por coloração por prata (ambientalmente mais segura, não mutagênica, nem carcinogênica) revelou-se suficiente para identificação dos alelos.

Os perfis das frequências alélicas deste locus em nossa amostra mostra semelhança com as médias Européia e Africana e diferenças com a média Asiática (Figura 2), embora contraste com elas por apresentar maior frequência dos alelos com maior número de repetições. Os valores das frequências dos alelos mais frequentes (alelos 5 e 14) são menores nas populações Africanas e Asiáticas, o que confere a estas populações uma maior heterozigose. Existe a ocorrência de picos ou modas, na distribuição da frequência alélica neste locus. Em nossa amostra há duas modas (correspondentes ao alelo 5 e 14) e até possivelmente três (alelo 23). Na média Européia e Africana há três modas (alelos 5,11,21 para a primeira e alelos 5,7,12 para a segunda), enquanto as amostras asiáticas exibem, com certeza, duas modas (alelos 5 e 13).



**Figura 2.** Comparação de frequências alélicas no locus DM em nossas amostras e outros grupos raciais.

Entre os 123 trios analisados para levantamento de frequências e estimativa de parâmetros forenses, 28 deles tiveram a paternidade excluída pelos exames de rotina feitos para tal fim; destes, 10 (35,71%) foram excluídos pelo DM, muito menos que o esperado (65,43%). Outros parâmetros de interesse forense demonstram poder elevado deste marcador, heterozigose observada (0,7970) foi significativamente igual à esperada (0,7988); Poder de Discriminação (0,9383); Conteúdo de informação do polimorfismo (0,7779), comparado com outros STRs na mesma amostra (PAGOTTO et al., 1999 e WIEZEL, 1999). A alta informatividade deste locus, bem como as facilidades metodológicas de detecção e classificação fenotípica o tornam passível de ser usado em estudos populacionais e trabalhos forenses (investigação de paternidade, identificação genética, etc.), tanto quanto o locus DRPLA já testado com sucesso para tal finalidade (PELOTTI et al., 1998).

Dos 240 trios, foram selecionados 182 com probabilidade de paternidade superior a 99,99%, nos quais foi possível analisar 219 meioses (54 meioses maternas e 51 paternas não foram informativas); não houve diferença significativa na transmissão do alelo maior em relação ao menor, o que contrasta com os estudos anteriores igualmente feitos em pessoas normais, os quais exibiram resultados conflitantes (efeito paterno na transmissão de alelos maiores (CAREY et al., 1994) e outros três concluindo pela existência de efeito materno (SHAW et al., 1995; CHACKRABORTY et al., 1996, POLANSKI et al., 1998); por outro lado, dá apoio à hipótese de HURST et al., 1995 que conclui que não há evidência de desvio meiótico de grandes alelos dentro da normalidade no locus da DM.

### Agradecimentos

Agradecemos à Maria do Carmo Tomitão Canas e Ana Lúcia Pimentel pela assistência técnica nas análises laboratoriais. Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAEPA (Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência).

### Referências:

- ASHIZAWA, T.; DUBEL, J.L.; HARATI, Y. Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. **Neurology**, n.43, p.2674-2678, 1993.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES G.; GRESSHOFF, P. Fst and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, n.196, p.80-83, 1991.

CAREY, N.; JOHNSON, K.; NOKELAINEN, P.; PELTOENE, L.; SAVONTAUS, M.L.; JUVONEN, V.; ANVRET, M.; GRANDELL, U.; CHOTAI, K.; ROBERTSON, E.; MEDDLETON-PRICE, H.; MALCOLM, S. Meiotic drive at the myotonic dystrophy locus? **Nature Genet**, n.6, p.117-18, 1994.

CHAKRABORTY, R.; STIVERS, D.N.; DEKA, R.; YU, L.M.; SHRIVER, M.D.; FERRELL, R.E. Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy locus. **Am J Hum Genet**, n.56, p.109-118, 1996.

DADA, T.O. Dystrophia myotonica in Nigerian family. **East Afr Med J**, n.50, p.213-228 1993.

DAVIES, J.; YAMAGATA, H.; SHELBORNE, P.; BUXTON, J.; OGIHARA, T.; NOKELEINEN, P.; NAGAKAWA, M.; WILIAMSON, R.; JOHNSON, K.; MIKI, T. Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese population. **J Med Genet**, n.29, p.766-769, 1992.

GENARELLI, M.; DALLAPICCOLA, B.; BAIGET, M.; MARTORELL, I.; NOVELLI, G. Meiotic drive at the myotonic dystrophy locus. **J Med Genet**, n.31, p.980, 1994.

GOLDMAN, A.; RAMSAY, M.; JENKINS, T. Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. **J Med Genet**, n.31, p.37-40, 1994.

GOLDMAN, A.; RAMSAY, M.; JENKINS, T. Ethnicity and myotonic dystrophy: a possible explanation for its absence in sub-Saharan Africa. **Am Hum Genet**, n.60, p.57-65, 1996.

HARPER, P.S. **Myotonic dystrophy**. London: Saunders, 1989.

HARPER, P.S. Myotonic dystrophy and related disorders. In: **Principal and Practice of Medical Genetics, Emey AEH and Rimoion**. Edinburgh: Churchill Livingstone, p.579-98, 1990.

HURST, G.D.D.; HURST, L.D.; BARRETT, J.A. Meiotic drive and myotonic dystrophy. **Nature Genetic**, n.10, p.132-33, 1995.

IMBERT, G.; KRETZ, C.H.; JOHNSON, K.; MANDEL, J.L. Origin of expansion mutation in myotonic dystrophy. **Nat Genet**, n.4, p.72-76, 1993.

KRAHE, R.; ECKHART, A.O.; OGUNNIYI, B.O.; OSUNTOKUN, M.J.; SICILIANO, M.J.; ASHIZAWA, T. De novo myotonic dystrophy in a Nigerian Kindred. **Am J Hum Genet**, n.56, p.1067-74, 1995.

MAGEE, A.C.; HUGHE, A.E. Segregation distortion in myotonic dystrophy. **J. Med Genet**, n.35, p.1045-6, 1998.

NAKAGAWA, M.; YAMADA, H.; HIGUCHI, I.; KAMINISHI, Y.; MIKI, T.; JOHNSON, K.; OSAME, M. A case of paternally inherited congenital myotonic dystrophy. **J Med Genet**, n.31, p.397-400, 1994.

PAGOTTO, R.C.; CANAS, M.C.T.; BRITO, R.O.A.A.; SIMÕES, A.L. Allele frequencies of the human von Willebrand factor gene (vWF) in a Brazilian population sample. **Int J Legal Med**, n.112, p.326-328, 1999.

PELOTTI, S.; MANTOVANI, V.; ESPOSTI, P.D.; D'APOTE, L.; BRAGLIANI, M.; MAIOLINI, E.; ABBONDANZA, A.; PAPPALARDO, G. The DRPLA CAG repeats in an Italian population sample: evaluation of the polymorphismo for forensic applications. **J Forensic Sci**, n.43(2), p.410-412, 1998.

POLANSKI, A.; CHAKRABORTY, R. Dynamic balance of segregation distortion and selection maintains normal allele sizes at the myotonic dystrophy locus. **Mathematical Biosciences**, n.147, p.93-112, 1998.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumencism. **J Hered**, n.86, p. 248-49, 1995.

REDMAN, J.B.; JR. FENWICK, R.G.; FU, W.H.; PIZZUTU, A.; CASKEY, C.T. Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. **J Am Assoc**, n.269, p.1960-65, 1993.

RUBINSZTEIN, D.C.; AMOS, W.; LEGGO, J.; GOODBURN, S.; JAIN, S.; LI, S.H.; MARGOLIS, R.L.; ROSS, C.A.; FERGUSON-SMITH, M.A. Microsatellite evolution evidence for directionality and variation in rate between species. **Nat Genet**, n.11, p.360-362, 1995.

SHAW, A.M.; BARNETSON, R.A.; PHILLIPS, M.F.; HARAPER, P.S.; HARLEY, H.H.G. Evidence for meiotic drive at the myotonic dystrophy locus. **J Med Genet**, n.32, p.145 A., 1995.

WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Hum Mol Genet**, n.2, p.1123-1128, 1993.

WIEZEL, C.E.V. **Freqüências e segregação alélica dos loci SCA1 (Ataxia Espinocerebelar tipo 1) e MJD (Doença de Machado – Joseph) em indivíduos normais.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ZERYLNICK, C.; TORRONI, A.; SHERMAN, S.L.; WARREN, S.T. Normal Variation at the Myotonic Dystrophy Locus in Global human Population. **Am J Hum Genet**, n.56, p.123-130, 1995.

#### **Resumo:**

A Distrofia Miotônica de Steinert (DM) é uma doença autossômica dominante neuromuscular progressiva, causada por uma expansão da repetição CTG no locus DMPK do cromossomo humano 19q13.3. O número de repetições nos alelos normais varia de 5 a 37, enquanto que nos pacientes com DM, este número é sempre superior a 50. O tamanho da expansão está correlacionado à gravidade clínica e à idade de apresentação dos sintomas da doença. Pacientes com 50 a 150 cópias da repetição apresentam a forma mínima da doença, podendo ter apenas catarata como único sintoma. Os pacientes com 100 a 1000 repetições apresentam a forma clássica e pacientes que apresentam mais de 2000 cópias possuem a forma congênita. Baseados em 182 trios (mãe-filho-suposto pai) com probabilidade de paternidade superior a 99,99%, foram estimadas freqüências gênicas e genotípicas, parâmetros de interesse forense e verificada a possibilidade de ocorrência de desvio meiótico. Fenótipos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P = 0,2653$ ); o perfil de freqüências alélicas mostrou-se semelhante ao de populações européias e africanas, mas diferentes da população Asiática. Nossos achados não confirmam a existência de desvio meiótico.

#### **Palavras-chave:**

Distrofia Miotônica, Distúrbio de Segregação, Expansão da Repetição.

## **N**ORMAS GERAIS PARA PUBLICAÇÃO

A **REVISTA UNIARA** é uma publicação do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA. É interdisciplinar e tem por finalidade divulgar textos inéditos de diferentes áreas do conhecimento. Está aberta a publicação de trabalhos científicos produzidos interna e externamente à UNIARA.

1. Os trabalhos enviados devem dirigir-se às seguintes seções da revista:  
a) artigos e ensaios, b) comunicações de pesquisa, c) resenhas e d) resumos de teses e dissertações. Devem ser enviados sempre em disquete, com arquivos e tabelas digitados em Word for Windows, acompanhados de duas cópias impressas, obedecendo aos requisitos dos itens seguintes.
2. Os artigos e ensaios poderão ser encomendados pela própria revista ou ser enviados espontaneamente pelos autores, e devem ter um mínimo de 10 mil e um máximo de 40 mil caracteres.

Os relatórios de pesquisa devem apresentar a seguinte ordem: introdução, método (sujeitos, material, procedimento), resultados e discussão. Devem ter um mínimo de 7 mil e um máximo de 20 mil caracteres.

As resenhas poderão versar sobre publicações nacionais ou estrangeiras, deverão conter no máximo 7 mil caracteres e incluir: nome do livro, cidade, editora, número de páginas, nome do autor e nome do tradutor.

3. Os originais deverão obedecer a seguinte seqüência:  
- **página de rosto** contendo: título do trabalho (conciso e direto) e os nome(s) do(s) autor(es), com seus respectivos títulos universitários, filiação acadêmica e endereço para correspondência. Os artigos, ensaios e comunicações de pesquisa deverão ser acompanhados, também, de resumo, que não devem exceder a 400 caracteres cada um e palavras-chave (palavras ou expressões que indiquem o conteúdo do artigo). Indicar o número de caracteres do texto.

- **texto:** repetir título e nome do autor;