

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO CAUSADORA  
DE DISTONIA RESPONSIVA À L-DOPA (SÍNDROME DE  
SEGAWA) EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA**

**CAROLINA PEREIRA DE SOUZA**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

**IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO CAUSADORA  
DE DISTONIA RESPONSIVA À L-DOPA (SÍNDROME DE  
SEGAWA) EM UMA FAMÍLIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Carolina Pereira de Souza

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Ribeiro Valadares

Fevereiro de 2007

## SUMÁRIO

<b>Item</b>	<b>Página</b>
Agradecimentos	4
Resumo	5
Introdução	6
Artigo	15
<i>Resumo</i>	16
<i>Introdução</i>	17
<i>Materiais e Métodos</i>	19
<i>Resultados</i>	21
<i>Discussão</i>	22
<i>Agradecimentos</i>	24
<i>Referências</i>	24
<i>Legendas das Figuras</i>	27
<i>Figuras</i>	28
Comentários	29
Referências Bibliográficas	31

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico esta conquista em primeiro lugar a Deus, por sempre guiar meus passos; aos pacientes e a equipe médica que participaram do trabalho; aos meus pais e irmãs, que sempre me incentivaram e me deram apoio incondicional; aos meus amigos e familiares, que sempre estiveram ao meu lado; ao meu marido que é meu porto seguro nos momentos mais difíceis; à Ana Lúcia, que me recebeu de braços abertos no laboratório, mesmo eu tendo caído de pára-quadras lá; a todos os meus amigos do LGAH, por tudo que me ensinaram e por toda ajuda que me deram. Muito obrigada!

## RESUMO

A distonia responsiva à dopa (DRD), também conhecida como síndrome de Segawa ou distonia progressiva hereditária com variação diurna (HPD), é caracterizada clinicamente por distúrbios de postura e locomoção com acentuada variação diurna, ocorrência simultânea ou tardia de parkinsonismo e por resposta excelente ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. Durante a infância, a DRD pode se apresentar com fenótipo semelhante ao da paralisia cerebral atípica e, por isso, cerca de 24% dos pacientes com DRD são erroneamente diagnosticados com paralisia cerebral. Já foram identificadas mais de 85 mutações no gene GCH1, que codifica a enzima guanosina trifosfato ciclodiolase 1 (GTPCH1), responsáveis pelo fenótipo da DRD. No nosso estudo, investigamos uma família com distonia responsiva à dopa autossômica dominante. O projeto teve como objetivo principal estudar os fenótipos e genótipos dos integrantes da família em questão, a fim de identificar a mutação causadora da DRD. Foram realizadas análises moleculares dos indivíduos doentes e normais por meio do DNA extraído das amostras de sangue. Utilizando a técnica de Polimorfismo de Conformação Unifilamentar (SSCP), identificamos qual dos seis éxons do gene GCH1 apresentava alguma alteração entre o fragmento amplificado do paciente e do indivíduo normal. Em seguida, por meio do seqüenciamento deste fragmento identificamos a inserção de uma adenina no quinto íntron (IVS5+5insA) que, devido à interferência no processamento do pré-mRNA, impede a remoção de parte do íntron inserindo um códon de terminação prematuro na proteína.

## INTRODUÇÃO

A distonia responsiva à dopa (DRD), também conhecida como síndrome de Segawa ou distonia progressiva hereditária com variação diurna (HPD), foi descrita por Segawa e colaboradores em 1971. É caracterizada clinicamente por distúrbios de postura e locomoção com acentuada variação diurna, ocorrência simultânea ou tardia de parkinsonismo e por excelente resposta ao tratamento com baixas doses de L-Dopa.

Na maioria dos casos, as manifestações clínicas têm início na infância com distonia, mais freqüentemente nos membros inferiores. Em cerca de 75% dos casos, ocorre agravamento dos sintomas no transcorrer do dia. Apesar de menos comum, o surgimento da doença pode ocorrer também na adolescência e até mesmo na fase adulta. Em geral, os sinais e sintomas são menos acentuados em pacientes nos quais a doença surge tardiamente (Müller et al., 2002). Durante a infância, a DRD pode se apresentar com fenótipo semelhante ao da paralisia cerebral atípica e, por isso, cerca de 24% dos pacientes com DRD são erroneamente diagnosticados com paralisia cerebral; já na idade adulta, parkinsonismo pode ser o principal ou o único sintoma (Jan, 2004).

A síndrome de Segawa é uma doença rara e sua ocorrência é de um caso em cada dois milhões de indivíduos (Nygaard, 1993). No entanto, essa taxa é provavelmente subestimada por pelo menos duas razões. A primeira é que a doença tem sido mais reconhecida somente nos últimos dez anos e ainda não é corretamente diagnosticada, como já foi apresentado anteriormente. E a segunda é que muitos pacientes são oligossintomáticos e por isso não procuram assistência médica (Bianca & Bianca, 2005).

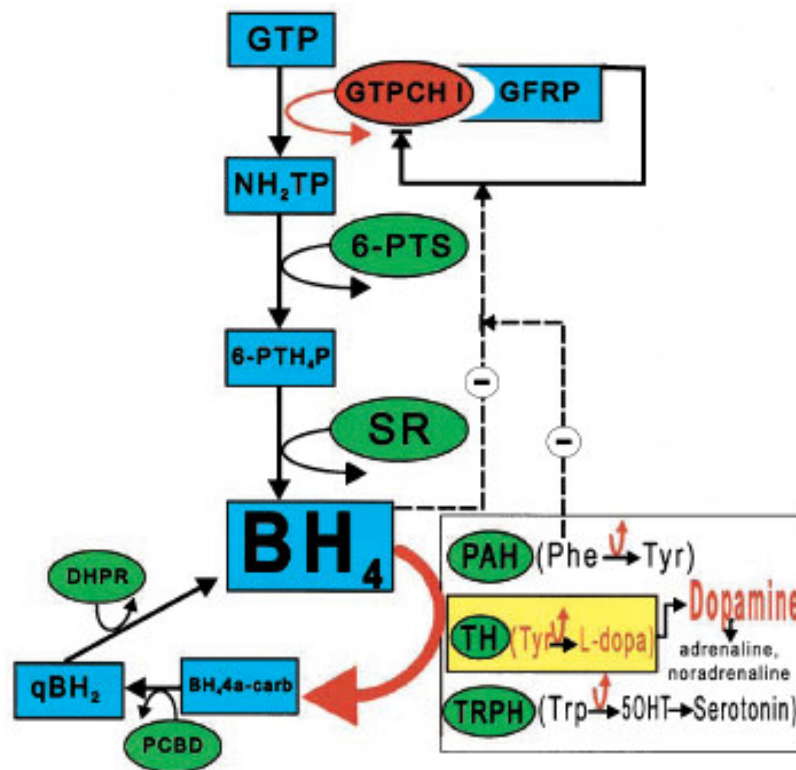
A DRD pode ser herdada como característica autossômica dominante ou recessiva, dependendo de qual for o gene mutado (heterogeneidade de *locus*). A forma recessiva é causada por uma mutação no gene da tirosina hidroxilase, que é a monooxigenase que catalisa a conversão tetrahydrobiopterina-dependente de L-Tirosina em L-Dopa (de Lonlay et al., 2000). Este gene, localizado no cromossomo 11p15.5, é composto de 14 éxons e foi seqüenciado por Lüdecke e colaboradores em 1995. A forma dominante é causada principalmente por mutações no gene GCH1, que codifica a guanossina trifosfato ciclohidrolase 1 (GTPCH1). Localizado no cromossomo 14q22.1-q22.2 (Ichinose et al., 1994), o gene GCH1 é composto de 6 éxons, ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e seu transcrito possui 750 pb. A GTPCH1 é uma enzima reguladora da síntese de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (**Figura 1**) que, por sua vez, é cofator essencial para as hidroxilases que convertem os aminoácidos fenilalanina, triptofano, e tirosina em, respectivamente, tirosina, serotonina e L-Dopa ou dopamina (Müller et al., 2002).

Neste projeto, trabalhamos com a doença herdada de forma autossômica dominante, a qual possui reduzida penetrância e expressividade altamente variável. O fenótipo vai desde simples dor no pé ao final do dia até completa incapacidade de caminhar devido à impossibilidade de apoiar os pés, entortados pela distonia, no chão. Estima-se que mulheres são de duas a quatro vezes mais afetadas do que os homens (Ichinose et al., 1994). Baseado nos estudos de uma família numerosa, a penetrância da doença foi dada como aproximadamente 30%, quando considerados os sintomas de maior expressão. Porém, se fossem considerados também os sintomas de menor expressão, a penetrância passaria a ser de 42% a 62% (Nygaard et al., 1990). Outras estimativas de penetrância são de 15% em homens e 45% em mulheres (Nygaard et al., 1993a). Levando em consideração sinais e sintomas sutis, a penetrância pode ser bem



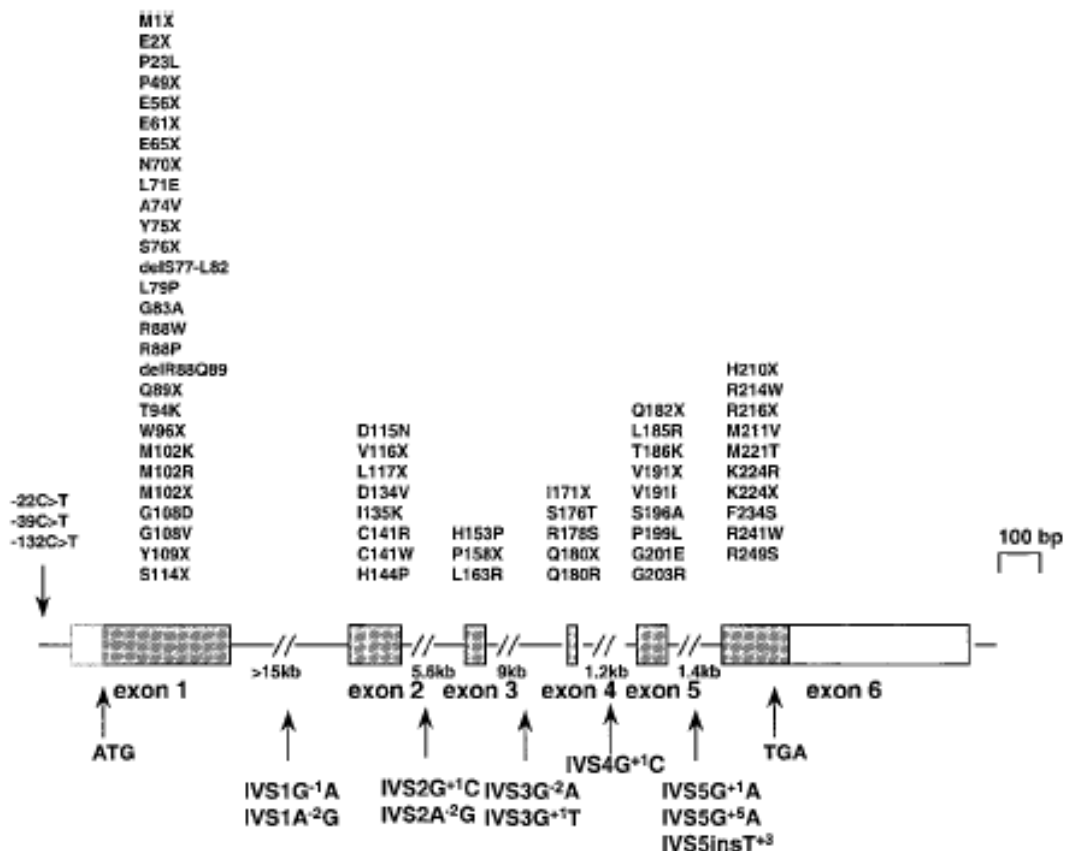
próxima de 100% em mulheres e 60% em homens. Esses números são baseados em estudos clínicos e moleculares em cinco famílias com DRD não-relacionadas (Steinberger et al., 1998).

Mutações em outros genes que codificam componentes da via da biopterina, que não o GCH1, também podem causar DRD. Em um estudo realizado por Steinberg e colaboradores em 2004, detectou-se uma mutação no gene que codifica a enzima sepiapterina redutase (SR), que converte 6-piruvil-tetrahydropterina (PTP) a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (**Figura 1**). O gene é composto de três éxons, ocupando aproximadamente 4kb do DNA genômico no cromossomo 2p13 (Ohye et al., 1998).



**Figura 1.** Via da Pteridina. *GTP*: Guanosina trifosfato, *GTPCH1*: GTP ciclohidrolase 1, *NH<sub>2</sub>TP*: Dihidroneopterina trifosfato, *6-PTS*: 6-piruvil tetrahydropterina sintase, *6-PTH<sub>4</sub>P*: 6-Piruvil tetrahydropterina, *SR*: Sepiapterina redutase, *BH<sub>4</sub>*: Tetrahydrobiopterina, *BH<sub>4</sub>a-carb*: Tetrahydrobiopterina-4a-carbinolamina, *PCBD*: Pterina-4a carbinolamina desidratase, *qBH<sub>2</sub>*: Quinoide dihydrobiopterina, *DHPR*: Dihidropteridina reductase, *PAH*: Fenilalanina hidroxilase, *GFRP*: proteína regulatória do feedback da GTP ciclohidrolase I, *TH*: Tirosinahidroxilase, *TRPH*: Triptofanohidroxilase, *Phe*: Fenilalanina, *Tyr*: Tirosina, *Trp*: Triptofano, *5OHT*: 5-OH-Triptofano (Retirado de Müller et al., 2002).

Até hoje, mais de 85 mutações do gene GCH1 foram descritas (Furukawa, 2003) (**Figura 2**), sendo a maioria delas localizadas na região codificadora e algumas nos íntrons (Hirano et al., 1995). Foram encontradas anormalidades em todos os seis éxons do gene e nos sítios de recomposição intrônica. Porém, aproximadamente 40-50% dos pacientes possuem mutações desconhecidas (Furukawa, 2003).



**Figura 2.** Algumas das mutações no gene GCH1 que causam a DRD autossômica dominante. (Retirado de Blau et al., 2001)

Foram identificadas três desordens neurometabólicas, clinicamente diferentes, decorrentes de mutações no gene GCH1: (1) distonia responsiva à L-Dopa (autossômica dominante), que é caracterizada por distonia na infância clinicamente responsiva ao tratamento com baixas doses de L-Dopa; (2) hiperfenilalaninemia por deficiência de BH<sub>4</sub> (autossômica recessiva), que aparece nos primeiros seis meses de vida com grave

desordem neurológica; e mais recentemente, (3) mutações heterozigotas compostas do gene GCH1, que causam desordens neurológicas de gravidade intermediária em relação às desordens descritas acima (Hahn et al., 2001).

Mutações no gene GCH1 resultam em reduzida atividade da enzima GTPCH1 e, portanto, em reduzida síntese de BH<sub>4</sub>. Esta por sua vez, possui maior afinidade com a tirosina hidroxilase dentre as monooxigenases. Por isso, uma deficiência parcial de BH<sub>4</sub> reduz seletivamente a síntese de dopamina, sem afetar significativamente as reações das outras duas monooxigenases, triptofano e fenilalanina hidroxilases (Bianca & Bianca, 2005). Além de seu papel como cofator, a BH<sub>4</sub> também parece aumentar a liberação de dopamina nas sinapses neurais quando em altas concentrações (Koshimura et al., 1994). Por isso, níveis reduzidos de BH<sub>4</sub> devem afetar também a quantidade de dopamina nos núcleos da base e, conseqüentemente, a variação diurna dos sintomas na DRD parece ser diretamente correlacionada com a quantidade de BH<sub>4</sub> disponível. Enquanto as atividades diurnas requerem dopamina e, portanto, reduzem o nível de BH<sub>4</sub>, mesmo baixas quantidades de GTPCH1 são suficientes para, pelo menos parcialmente, repor o BH<sub>4</sub> durante o período noturno (Müller et al., 2002).

Estudos mostraram que a atividade da GTPCH1 é reduzida em mais de 50% nos portadores da mutação em heterozigose (Ichinose et al., 1994), sendo os níveis de dopamina estriatal reduzido a menos de 20% do normal (Jan, 2004). Isto sugere que a causa da reduzida síntese da dopamina e do distúrbio resultante, a DRD, não seja uma haploinsuficiência, e sim, provavelmente, um efeito dominante negativo. O polipeptídeo mutante deve formar heterodecâmeros não funcionais com as subunidades selvagens (Müller et al., 2002). Experimentos de co-transfecção com cDNA de GCH1 selvagem e mutado dão suporte a esta hipótese (Hirano & Ueno, 1999). Por outro lado, a formação de

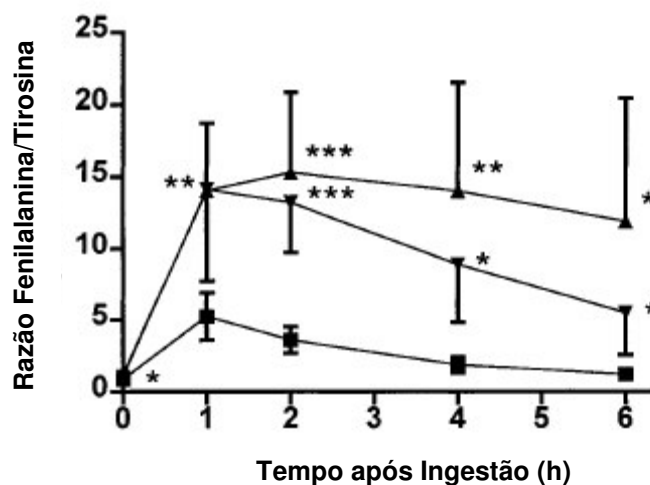
heterodécâmeros da GTPCH1 não pôde ser demonstrada para duas mutações, R88W e R184H (Suzuki et al., 1999). Em ambos os casos, as subunidades aberrantes não foram capazes de interagir com as subunidades do tipo selvagem. De qualquer forma, são necessários experimentos adicionais para demonstrar diretamente a falha na formação de heterodécâmeros nestes casos (Müller et al., 2002).

Mutações no gene GCH1 devem também exercer efeito dominante negativo no nível transcricional. Por exemplo, há evidência de que os níveis relativos do mRNA mutante de GCH1 contribuem para a variação enzimática (Hirano et al., 1996). Além disso, sob condições fisiológicas, variantes de recomposição do gene GCH1, normalmente existentes, devem estar envolvidos na regulação da expressão do gene. Das três espécies de cDNAs de GCH1 do fígado humano, uma codifica o transcrito completo e as outras duas codificam isoformas inativas (Gütlich et al., 1994). Pode ser que a razão entre a quantidade de transcrito completo e de transcritos de recomposições alternativas determinem a quantidade de subunidades funcionais de GTPCH1 sintetizadas (Müller et al., 2002).

A reduzida penetrância da DRD e a ocorrência menos comum da doença em homens do que em mulheres portadores da mutação podem ser explicados por níveis fisiologicamente mais baixos da enzima nas mulheres se comparado aos homens. Experimentos realizados em camundongos por Shimoji e colaboradores em 1999 mostraram que os níveis de mRNA de GCH1 no cérebro das fêmeas são mais baixos do que no dos machos, o que dá suporte a esta hipótese. Devido a este nível basal mais baixo, é mais provável que a atividade da GTPCH1 seja reduzida abaixo do nível crítico nas mulheres do que nos homens (Müller et al., 2002).

O diagnóstico de DRD é essencialmente clínico, baseado na história clínica e na resposta ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. Entretanto, devido à penetrância e expressividade variáveis da doença, existem portadores assintomáticos ou oligossintomáticos. Nesses casos, a análise mutacional do gene GCH1 é uma das formas de se diagnosticar a DRD. Alterações de seqüência do gene têm sido encontradas por meio da análise de polimorfismo de conformação unifilamentar (SSCP) em cerca de 50% a 60% dos casos identificados clinicamente (Hagenah et al., 2005). Recentemente, uma deleção heterozigota que não era detectável por métodos de seqüenciamento convencionais foi identificada por transferência de Southern (Furukawa et al., 2000). Além disso, Hagenah e colaboradores desenvolveram em 2000 uma técnica de PCR quantitativo que, juntamente com um método de seqüenciamento, permitiu a identificação de mutações em mais de 85% dos pacientes.

A investigação bioquímica mais informativa em pacientes com DRD é a medida dos níveis de pterinas (neopterina e biopterina), e metabólitos neurotransmissores HVA e 5HIAA no líquido cérebro espinhal (LCR) (Blau et al., 2001). Quando o LCR não está disponível, um teste com admissão oral de fenilalanina é freqüentemente utilizado (100 mg/kg) (Hyland et al., 1997). Este teste é baseado no fato de que, devido à deficiência parcial de BH<sub>4</sub> no fígado, sob condições de sobrecarga, a fenilalanina hidroxilase não consegue converter fenilalanina em tirosina a uma taxa normal (Blau et al., 2001). Perfis de fenilalanina e tirosina contidas no plasma e proporções de fenilalanina/tirosina são anormais durante as 6 horas subseqüentes à admissão. Apesar deste teste conseguir diferenciar entre portadores da doença assintomáticos e sintomáticos (**Figura 3**) (Hyland et al., 1999), podem ocorrer resultados falso-positivos (Blau et al., 2001). Já o diagnóstico enzimático de DRD é limitado pelo fato de que a enzima GTPCH1 não é expressa em vários tipos de célula, incluindo células sangüíneas e fibroblastos (Blau et al., 2001).



**Figura 3.** Proporções dos níveis de fenilalanina/tirosina no plasma após ingestão de fenilalanina (100 mg/kg). Os dados mostram a média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA com análises *post hoc* utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,001$  na comparação dos portadores da mutação no gene, sintomáticos e assintomáticos, com o grupo controle. ■, Controle; ▲, sintomáticos; ▼, assintomáticos. (Retirado de Hyland et al., 1999).

O tratamento da DRD é feito com a ingestão oral de doses relativamente baixas de L-Dopa (60 mg/dia), sendo que todos os sintomas apresentam melhora significativa com o tratamento. O curso natural da doença é progressivo nos primeiros anos até um determinado momento, quando então, se estabiliza (Hwang et al., 2001). Isto sugere que a dose requerida de L-Dopa para controle dos sintomas não deve ser constante ao longo do tratamento. Experimentos de Hwang e colaboradores em 2001 mostraram a existência de uma correlação inversa entre a dose diária de L-Dopa e a duração do tratamento. Uma possível explicação para o fato é que a conversão de dopamina deve diminuir com a idade. Conseqüentemente, uma vez que o grau da deficiência de dopamina estriatal estabiliza, a necessidade de L-Dopa deve diminuir. Foi observada também uma discinesia L-Dopa-induzida de gravidade moderada em 20% dos pacientes em tratamento (Hwang et al., 2001). Porém, esta discinesia pôde ser facilmente controlada pela redução da dose de L-Dopa, sem nenhuma deterioração motora concomitante, e, portanto, sua presença pôde

ser considerada simplesmente como um indicativo de superdosagem (Hwang et al., 2001).

O presente trabalho estudou uma família com distonia responsiva à dopa, autossômica dominante, sendo a probanda uma jovem diagnosticada aos 13 anos de idade. O objetivo principal foi identificar a mutação responsável pela doença na família. Os resultados obtidos e a metodologia utilizada são apresentados no artigo a seguir, onde são discutidas também possíveis explicações para a herança dominante observada.

**Nova mutação no íntron 5 do gene GCH1 causa Distonia Responsiva à Dopa  
(Síndrome de Segawa) em família brasileira**

Carolina P. Souza<sup>1</sup>, Eugênia R. Valadares<sup>2</sup>, Luís R. Oliveira<sup>3</sup>, Ana L. B. Godard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Animal e Humana, Instituto de Ciências Biológicas,  
Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>2</sup>Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade  
Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup>Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais

Palavras-chave: DRD, Síndrome de Segawa, gene GCH1, GTP ciclohidrolase, distonia  
responsiva à dopa, distonia progressiva hereditária com variação diurna, efeito dominante  
negativo.

Corresponding author:

Ana L. B. Godard

Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Genética Animal e Humana, Instituto de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627, sala E3 248 – Pampulha

Belo Horizonte – MG – Brasil

CEP: 31270-901

E-mail: [brunialti@icb.ufmg.br](mailto:brunialti@icb.ufmg.br)

Fone: +55-31-3499-2594



**Resumo** A distonia responsiva à dopa (DRD), também conhecida como síndrome de Segawa ou distonia progressiva hereditária com variação diurna (HPD), é caracterizada clinicamente por distúrbios de postura e locomoção com acentuada variação diurna, ocorrência simultânea ou tardia de parkinsonismo e por resposta excelente ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. O diagnóstico de DRD é essencialmente clínico, baseado na história clínica e na resposta ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. Entretanto, devido à penetrância e expressividade variáveis da doença, existem portadores assintomáticos ou oligossintomáticos. Nesses casos, a análise mutacional do gene GCH1 é uma das formas de se diagnosticar a DRD. Este gene é composto de seis éxons e seu transcrito completo codifica a guanosina trifosfato ciclohidrolase 1 (GTPCH1), uma enzima reguladora da síntese de BH<sub>4</sub>. Neste trabalho, investigamos uma família portadora de DRD com herança autossômica dominante com o objetivo de identificar a mutação causadora da doença. A probanda, filha de casal sadio não consanguíneo, tinha o diagnóstico errôneo de paralisia cerebral espástica, sendo que na família materna havia vários casos de pessoas com marcha na ponta dos pés, incapacidade de marcha, parkinsonismo, rigidez de membros e câimbras. Utilizando as técnicas de polimorfismo de conformação unifilamentar (SSCP) e seqüenciamento para analisar o DNA extraído de amostras de sangue, identificamos uma mutação no gene GCH1, IVS5+5insA, que, por codificar peptídeos truncados, impediria a formação da enzima ativa. De nosso conhecimento, este trabalho representa o primeiro caso de identificação de mutação causadora de DRD no Brasil.

## Introdução

A distonia responsiva à dopa (DRD), também conhecida como síndrome de Segawa ou distonia progressiva hereditária com variação diurna (HPD), foi descrita por Segawa e colaboradores em 1971. É caracterizada clinicamente por distúrbios de postura e locomoção com acentuada variação diurna, ocorrência simultânea ou tardia de parkinsonismo e por resposta excelente ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. Na maioria dos casos, as manifestações clínicas têm início na infância com distonia, mais frequentemente nos membros inferiores (Van Hove et al., 2006). Nestes casos, a DRD pode se apresentar com fenótipo semelhante ao da paralisia cerebral atípica e, por isso, cerca de 24% dos pacientes com DRD são erroneamente diagnosticados com paralisia cerebral (Jan, 2004). Já na idade adulta, parkinsonismo pode ser o principal ou o único sintoma. A síndrome de Segawa é uma doença rara e sua ocorrência é de um caso em cada dois milhões de indivíduos (Nygaard, 1993). No entanto, essa taxa é provavelmente subestimada por pelo menos duas razões. A primeira é que a doença tem sido mais reconhecida somente nos últimos dez anos e ainda não é corretamente diagnosticada, como já foi apresentado anteriormente. E a segunda é que muitos pacientes são oligossintomáticos e não procuram assistência médica (Bianca & Bianca, 2005).

A DRD pode ser herdada como característica autossômica dominante ou recessiva, dependendo de qual for o gene mutado (heterogeneidade de *locus*). A forma recessiva é causada por mutação no gene da tirosina hidroxilase, que é a monooxigenase que catalisa a conversão tetrahydrobiopterina-dependente de L-Tirosina em L-Dopa (de Lonlay et al., 2000). Neste trabalho, demos ênfase à forma dominante, causada principalmente por mutações no gene GCH1, que codifica a proteína guanosina trifosfato ciclodrolase 1

(GTPCH1) e está localizado no cromossomo 14q22.1-q22.2. A doença herdada desta forma possui reduzida penetrância, expressividade altamente variável e estima-se que mulheres são de 2 a 4 vezes mais afetadas do que homens (Ichinose et al., 1994 ). O gene GCH1 é composto de 6 éxons, ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e já foram descritas pelo menos seis variantes de recomposição que diferem em sua extremidade 3'(Togari et al., 1992; Golderer et al., 2001; e Hwu et al., 2003). Somente o transcrito completo possui atividade enzimática (Gütlich et al., 1994). A proteína GTPCH1 é uma enzima reguladora da síntese de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), que é cofator essencial para as hidroxilases que convertem os aminoácidos fenilalanina, triptofano, e tirosina em, respectivamente, tirosina, serotonina e L-Dopa (Müller et al., 2002).

O diagnóstico de DRD é essencialmente clínico, baseado na história clínica e na resposta ao tratamento com baixas doses de L-Dopa. Entretanto, devido à baixa penetrância da doença, existem portadores assintomáticos. Nesses casos, a análise mutacional do gene GCH1 é uma das formas de se diagnosticar a DRD. Alterações de sequência do gene têm sido encontradas por meio da análise de polimorfismo de conformação unifilamentar (SSCP) em cerca de 50% a 60% dos casos identificados clinicamente (Hagenah et al., 2005). Recentemente, uma deleção em heterozigose que não era detectável por métodos de sequenciamento convencionais foi identificada por transferência de Southern (Furukawa et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi investigar uma família portadora de DRD autossômica dominante com a finalidade de identificar a mutação causadora da doença.

## **Materiais e Métodos**

### *Pacientes*

Foram estudados 14 indivíduos de uma mesma família brasileira, sendo a probanda uma jovem diagnosticada aos 13 anos de idade. Trata-se de filha de casal sadio não consanguíneo, com diagnóstico errôneo de paralisia cerebral espástica. Havia história na família materna de vários casos de pessoas com marcha na ponta dos pés, com incapacidade de marcha, parkinsonismo, rigidez de membros e câimbras. Sabe-se que sua gestação e parto não tiveram intercorrências. Seus sintomas iniciaram-se por volta de um ano de idade com distonia do pé esquerdo, evoluindo progressivamente com espasticidade de todo o membro inferior esquerdo e depois também do direito. Foi submetida à tendectomia tibial posterior esquerda aos dez anos de idade. Aos 13 anos não conseguia caminhar mais que um quarteirão e relatava falta de equilíbrio quase constante, embora relatasse diminuição da espasticidade com o repouso. A paciente já havia sido submetida à eletromiografia, tomografia cerebral e ressonância magnética do encéfalo, todos sem alterações, e o diagnóstico firmado erroneamente por vários neurologistas era de diplegia espástica, sendo indicado apenas tratamento fisioterápico. Ao exame objetivo mostrava distonia de ambos os membros inferiores, discreta distonia axial, pés chatos, hiperreflexia muscular e presença de sinal de Babinski. Apresentou remissão total dos sintomas clínicos logo após o início do tratamento com L-Dopa (30 mg 2 vezes ao dia, via oral) sendo, então, estabelecido o diagnóstico de DRD. Foi indicado o mesmo tratamento para todos os afetados sintomáticos na família.

Os participantes da pesquisa assinaram “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” onde autorizavam a coleta de 10 ml de sangue para a extração do DNA. O

projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número CAAE - 0428.0.203.000-05 em 15 de fevereiro de 2006.

### *Análise Molecular*

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico segundo protocolo no qual se utiliza Proteinase K (20mg/ml) e tampão de lise (Tris HCl 10 mM pH8,0; EDTA 2 mM pH8,2 e SDS 10%). Em seguida, foi lavado em etanol 70% e diluído em solução de TE (Miller et al., 1988). A concentração do DNA extraído foi quantificada por espectrofotometria de massa sob comprimento de onda de 260 nm.

Os éxons do gene GCH1, incluindo as junções de recomposição, foram amplificados a partir do DNA genômico extraído utilizando-se as condições de PCR e os *primers* já descritos (Ichinose et al., 1995). Para a identificação do fragmento mutado, procedeu-se à análise de SSCP utilizando-se os produtos de amplificação dos indivíduos da família e de um indivíduo controle. Com o fragmento que apresentou migrações diferentes no gel entre esses dois grupos analisados, procedeu-se, então, o seqüenciamento para identificar a mutação causadora da doença. O seqüenciamento foi feito com os mesmos *primers* utilizados na amplificação inicial, num sistema MegaBACE 1000® Amersham-Pharmacia Biotech utilizando *kits* para seqüenciamento DYEnamic ET® Terminator da mesma companhia, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras foram seqüenciadas tanto no sentido direto quanto no reverso. As seqüências obtidas foram primeiramente convertidas no formato de arquivo ab1, através do programa Chromas ([www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)), e em seguida analisadas utilizando o

programa CodonCode Aligner ([www.codoncode.com/aligner](http://www.codoncode.com/aligner)). O fragmento contendo o éxon um foi diretamente seqüenciado devido ao seu tamanho de 502 pb ser grande demais para a técnica de SSCP.

## Resultados

Na **Figura 1** está representado o heredograma da família. Nele, é possível observar o padrão de herança autossômica dominante da doença. O padrão de migração dos fragmentos no gel de SSCP não apresentou diferenças entre os indivíduos estudados e o controle, exceto para o éxon cinco. Na **Figura 2** é possível observar que os indivíduos VI-1, IV-27, III-7 e V-10 apresentam o mesmo padrão de migração do indivíduo controle, e portanto provavelmente não possuem a mutação. Os demais indivíduos apresentam uma banda a mais e, portanto, são portadores da mutação.

O seqüenciamento direto do fragmento contendo o éxon um não apresentou nenhuma mutação. Já o seqüenciamento do fragmento contendo o éxon cinco apresentou uma inserção heterozigota de uma adenina na região intrônica que separa os éxons cinco e seis, IVS5+5insA. A **Figura 3** mostra os cromatogramas obtidos do seqüenciamento do éxon cinco dos indivíduos com e sem a mutação. O cromatograma do indivíduo normal apresenta apenas duas adeninas. Já no cromatograma do indivíduo portador da mutação, observa-se uma sobreposição de duas leituras diferentes após a inserção de uma terceira adenina: a de um alelo normal e a de um alelo mutado.

## Discussão

Mais de 85 mutações do gene GCH1 foram descritas ([www.bh4.org/biomdb.summary.html](http://www.bh4.org/biomdb.summary.html)), sendo a maioria delas localizadas na região codificadora. Foram encontradas anormalidades em todos os seis éxons do gene e nos sítios de recomposição intrônica (Nishiyama et al., 2000). Neste trabalho, identificamos uma nova mutação no quinto íntron do gene GCH1, IVS5+5insA, como causadora da DRD em uma família brasileira. A inserção provavelmente causa uma alteração no processamento do pré-mRNA, evitando que este íntron, ou pelo menos parte dele, seja removido. Como logo no início do íntron há um códon de terminação, sua permanência no mRNA mensageiro resultará em um peptídeo truncado, sem o sexto éxon. A enzima GTPCH1 é composta por dez monômeros idênticos, de 250 aminoácidos, codificados pelo gene GCH1. O homodecâmero é formado por cinco dímeros organizados em uma estrutura de anel que tem o aspecto de dois pentâmeros alinhados face a face (Nar et al. 1995). A **Figura 4** apresenta um esquema que mostra a relação entre os éxons do gene GCH1 e a parte estrutural do peptídeo que eles codificam. O trabalho de Swick e Kapatos, publicado em 2006, mostrou que os dímeros se associam em um decâmero por meio da interação entre o b1 de um monômero com o b4 de outro monômero, integrante do dímero adjacente. Além disso, eles também concluíram através de experimentos que h6 serviria para estabilizar o decâmero. Com base na **Figura 4**, é possível inferir que o peptídeo truncado é deficiente da  $\alpha$ -hélice h6 e das folhas  $\beta$  b3 e b4, correspondentes ao éxon seis. Esta deficiência impediria a formação do decâmero através da interação dos dímeros, pois como apresentado anteriormente, esta interação se dá entre os segmentos b1 e b4 dos monômeros. Análises

bioquímicas mostraram que somente o decâmero GTPCH1 possui atividade enzimática (Yim & Brown 1976), fato que é explicado por estudos estruturais que indicam a existência de dez sítios ativos formados na interface de três monômeros separados, localizados em dímeros adjacentes (Nar et al., 1995). Portanto, conclui-se que o produto codificado pelo gene mutado não apresentaria atividade enzimática. Outro fato que apóia esta hipótese é que o peptídeo truncado não codificaria um dos aminoácidos que compõem o sítio ativo, a Cys 212 (Auerbach et al., 2000).

Muitas doenças que são causadas por um erro inato de metabolismo apresentam forma de herança recessiva, uma vez que metade da atividade enzimática é suficiente para produzir ou metabolizar determinada substância (Suzuki et al., 1999). Na DRD esta haplosuficiência não é observada e estima-se que a atividade da enzima GTPCH1 no cérebro de pacientes com DRD é reduzida à cerca de 20% daquela observada em indivíduos normais (Suzuki et al., 1999), gerando distúrbio de herança dominante. Uma hipótese que surgiu inicialmente para explicar a razão deste fato observado foi a possibilidade da interação dos peptídeos mutantes com os normais formando um heterodecâmero não funcional, ou seja, o peptídeo mutante exerceria um efeito dominante negativo sobre o selvagem (Hirano & Ueno, 1999). Eles conseguiram demonstrar este efeito para algumas mutações em experimentos de co-transfecção com cDNA de GCH1 selvagem e mutado. No entanto, foram descritas mutações que codificam peptídeos aparentemente incapazes de interagir com peptídeos selvagens (Suzuki et al., 1999). Experimentos realizados por Hwu e colaboradores em 2003 indicaram que a presença de uma das isoformas do transcrito do GCH1, o mRNA tipo II (que não possui atividade enzimática), contribui para a regulação do gene reduzindo a atividade basal da proteína por meio do efeito dominante negativo. Portanto, outra hipótese possível seria a de que nos pacientes com DRD, como a quantidade



de proteína funcional (tipo I) é reduzida, há aumento da razão mRNA Tipo II / mRNA Tipo I, resultando em maior probabilidade de formação de heterodecâmeros não-funcionais entre estas duas isoformas (Hirano et al., 1997). Uma vez que o peptídeo codificado pelo alelo portador da mutação descrita aqui seria incapaz de formar heterodecâmeros pelos motivos já citados, a segunda hipótese seria mais adequada para explicar a haploinsuficiência do alelo normal.

Os presentes dados indicam que a mutação IVS5+5insA no gene GCH1 é a causa da DRD em uma família brasileira, pois esta mutação provavelmente impede a formação da enzima GTPCH1 por codificar um peptídeo truncado que seria incapaz de formar o decâmero correspondente à proteína funcional. Além disso, a enzima mutante seria deficiente de um dos aminoácidos integrantes do seu sítio ativo.

**Agradecimentos** Agradecemos a todos os membros da família que participaram da pesquisa. Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

## **Referências**

- Auerbach G, Herrmann A, Bracher A, Bader G, Gütllich M, Fischer M, Neukammi M, Garrido-Franco M, Richardson J, Nar H, Huber R, Bacher A (2000) Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13567-13572
- Bianca S, Bianca M (2005) A new deletion in dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency gene – Segawa disease. *J Neural Transm* 1435-1463
- De Lonlay P, Nassogne MC, van Gennip AH, van Cruchten AC, Billatte de Villemeur T, Cretz M, Stoll C, Launay JM, Steenberger-Spante GC, van den Heuvel LP, Wevers RA, Saudubray JM, Abeling NG (2000) Tyrosine hydroxylase deficiency unresponsive to L-Dopa treatment with unusual clinical and biochemical presentation. *J Inher Metab Dis* 23:819-825

- Furukawa Y, Guttman M, Sparagana SP, Trugman JM, Hyland K, Wyatt P, Lang AE, Rouleau GA, Shimadzu M, Kish SJ (2000) Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene. *Ann Neurol* 47:517-520
- Golderer G, Werner ER, Heufler C, Strohmaier W, Gröbner P, Werner-Felmayer G (2001) GTP cyclohydrolase I mRNA: novel splice variants in the slime mould *Physarum polycephalum* and in human monocytes (THP-1) indicate conservation of mRNA processing. *Biochem J* 355:499–507
- Gütlich M, Jaeger E, Rucknagel KP, Werner T, Rodl W, Ziegler I, Bacher A (1994) Human GTP cyclohydrolase 1: only one out of three cDNA isoforms gives rise to the active enzyme. *Biochem J* 302:215-221
- Hagenah J, Saunders-Pullman R, Hedrich K, Kabakci K, Habermann K, Wiegers K, Mohrmann K, Lohnau T, Raymond D, Vieregge P, Nygaard T, Ozelius LJ, Bressman SB, Klein C (2005) High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology* 64:908-911
- Hirano M, Imaiso Y, Ueno S (1997) Differential Splicing of the GTP Cyclohydrolase I RNA in Dopa-Responsive Dystonia. *Biochem Biophys Res Commun* 234:316-319
- Hirano M, Ueno S. (1999) Mutant GTP cyclohydrolase I in autosomal dominant dystonia and recessive hyperphenylalaninemia. *Neurology* 52:182–184
- Hwu WL, Yeh HY, Fang SW, Chiang HS, Chiou YW, Lee YM (2003) Regulation of GTP cyclohydrolase I by alternative splicing in mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306:937-942.
- Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, Fujita K, Nagatsu T (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 8(3):236-242
- Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y, Hori T, Blau N, Burlina A, Rouse B, Matalon R, Fujita K, Nagatsu T (1995) Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem* 270(17):10062-10071
- Jan MM (2004) Misdiagnoses in children with dopa-responsive dystonia. *Pediatr Neurol* 31(4):298-303
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215
- Müller U, Steinberger D, Topka H (2002) Mutations of GCHI in dopa-responsive dystonia. *J Neural Transm* 109:321-328
- Nar H, Huber R, Meining W, Schmid C, Weinkauff S, Bacher A (1995) Atomic structure of GTP cyclohydrolase 1. *Structure* 3,459–466.
- Nygaard TG (1993) Dopa-responsive dystonia. Delineation of the clinical syndrome and clues to pathogenesis. *Adv Neurol* 60:577-585
- Nishiyama N, Yukishita S, Hagiwara H, Kakimoto S, Nomura Y, Segawa M (2000) Gene mutation in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD), strictly defined dopa-responsive dystonia. *Brain Dev* 22:S102–S106

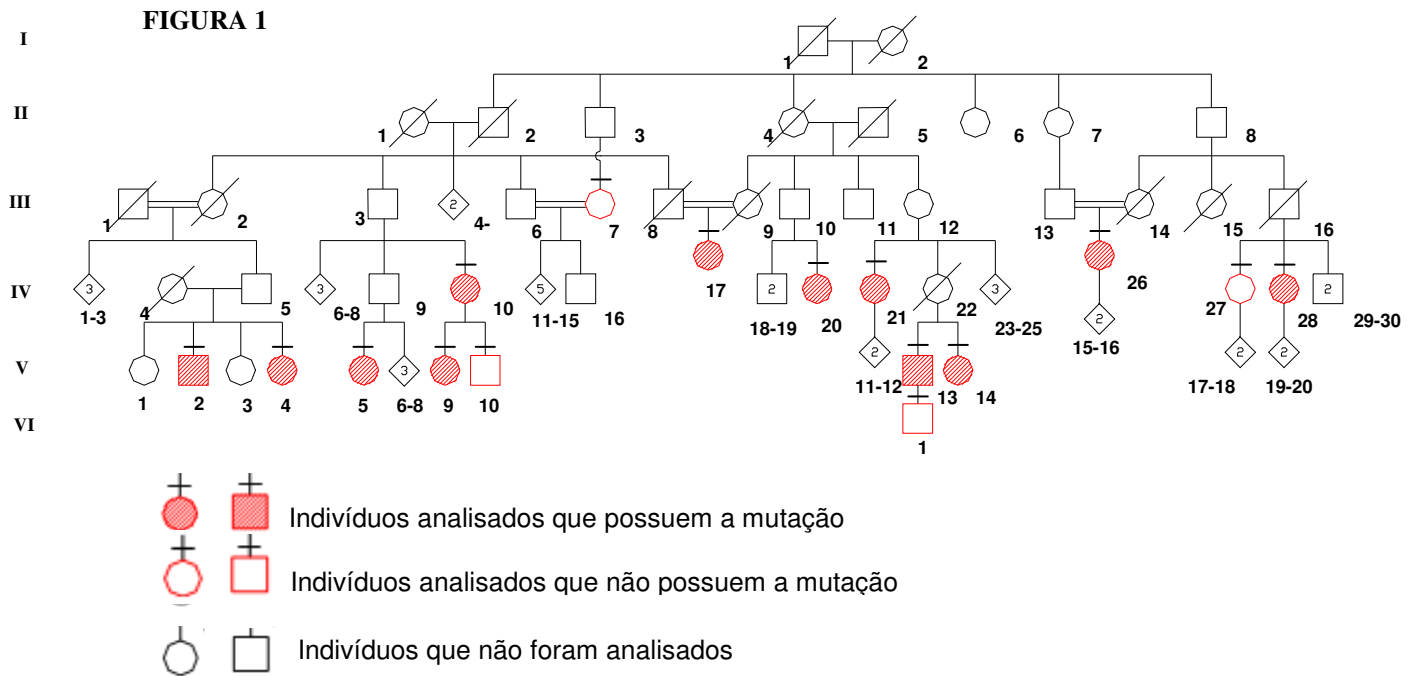
- Segawa M, Ohmi K, Itoh S, Aoyama M, Hayakawa H (1971) Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-Dopa. Hereditary basal ganglia disease with marked diurnal fluctuation. *Shinryo* (Tokyo) 24: 667–672 [in Japanese]
- Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, Ichinose H (1999) Characterization of Wild-Type and Mutants of Recombinant Human GTP Cyclohydrolase I: Relationship to Etiology of Dopa-Responsive Dystonia. *J Neurochem* 73(6):2510-2516
- Swick L, Kapatos G (2006) A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions. *J Neurochem* 97:1447-1455
- Togari A, Ichinose H, Matsumoto S, Fujita K, Nagatsu T (1992) Multiple mRNA forms of human GTP cyclohydrolase I. *Biochem Biophys Res Commun.* 187(1):359-365
- Yim JJ, Brown GM (1976) Characteristics of guanosine triphosphate cyclohydrolase I purified from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 251:5087-5094
- Van Hove JL, Steyaert J, Matthijs G, Legius E, Theys P, Wevers R, Romstad A, Moller LB, Hedrich K, Goriounov D, Blau N, Klein C, Casaer P (2006) Expanded motor and psychiatric phenotype in autosomal dominant Segawa syndrome due to GTP cyclohydrolase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:18-23

**Figura 1.** Heredograma de uma família brasileira com distonia responsiva à dopa. Dos 14 indivíduos analisados, quatro não possuem a mutação. Observa-se também o padrão de herança autossômica dominante.

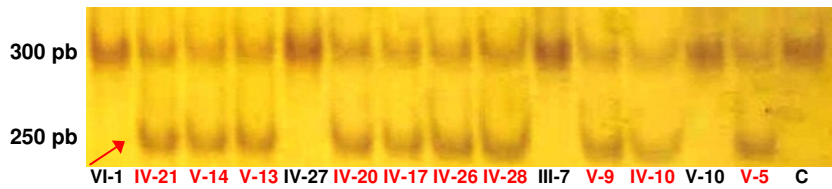
**Figura 2.** Gel de SSCP com o fragmento contendo o éxon cinco. A seta em vermelho indica a banda que difere do padrão de bandas observado na amostra controle (C). Os números em vermelho indicam indivíduos que possuem a mutação e os em preto indicam indivíduos sem a mutação.

**Figura 3.** Cromatogramas do seqüenciamento do éxon cinco do gene GCH1. O indivíduo normal (a) e o indivíduo portador da mutação heterozigota causada pela inserção de uma adenina (b) que provoca a sobreposição de duas leituras: a do alelo normal e a do alelo mutado.

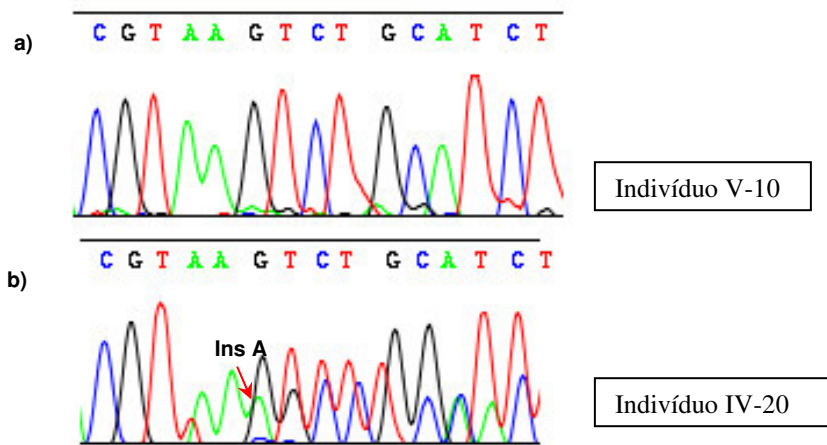
**Figura 4.** Esquema mostrando a correspondência entre os éxons e as partes estruturais do peptídeo. Cada monômero dobra-se em uma  $\alpha$ -hélice N-terminal (h1) e duas hélices anti-paralelas (h2,h3), que são separadas de um domínio comprimido C-terminal, composto de 4 folhas  $\beta$  anti-paralelas (b1-b4) dividida por 2 hélices antiparalelas (h4, h5) que terminam em uma hélice C-terminal (h6) (Nar et al. 1995).



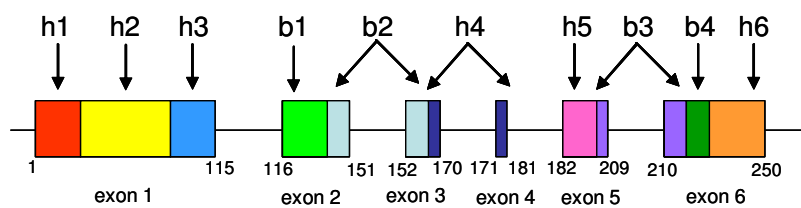
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



## COMENTÁRIOS FINAIS

No mundo inteiro existem vários grupos de pesquisa que estudam a Síndrome de Segawa. Muito já se sabe sobre a doença, mas ainda há muito a ser estudado. As teorias sobre as possíveis causas da expressividade altamente variável do fenótipo são bem fundamentadas, mas ainda precisam ser comprovadas. À medida que surgem novos casos descobrem-se novos sintomas que ainda não haviam sido descritos e até mesmo pacientes que não possuem mutação em nenhum dos genes já conhecidos como causadores da doença.

O interior do Brasil possivelmente possui vários casos de doenças genéticas ainda não diagnosticadas. A Distonia Responsiva à Dopa é um exemplo disso. Apesar de ter sido descrita há mais de 30 anos e estar sendo estudada durante todo este tempo, no Brasil poucos são aqueles que já ouviram falar da doença. Isto, infelizmente, ocasiona diagnósticos errôneos que em algumas vezes causam danos irreversíveis aos pacientes, uma vez que o tratamento aplicado não é o correto. Recentemente, foi divulgado pela imprensa o caso de duas irmãs gêmeas de Manaus (AM) que passaram mais de 20 anos na cama porque, aos 2 anos de idade, após uma convulsão, elas submergiram em um estado de letargia e receberam o diagnóstico de paralisia cerebral (<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u115924.shtml>). Depois, descobriu-se que elas tinham na verdade DRD e bastava fazer o tratamento com comprimidos de L-dopa para que elas levassem uma vida normal. O problema é que os 24 anos passados sobre a cama, sem se movimentar, deixaram seqüelas, e elas ainda necessitam de cadeiras de rodas para se locomover nas ruas, sendo que uma delas possui deformidades nos músculos dos braços e das pernas. Não se pode culpar os médicos pelo diagnóstico, pois na época a doença havia acabado de ser descrita.

Trabalhos como esse ajudam na divulgação de doenças até então desconhecidas e abrem novas frentes de pesquisa para o estudo de novas formas de tratamento e diagnósticos. Além disso, proporcionam a possibilidade de que as famílias, geralmente distantes dos grandes centros, sejam mais bem orientadas, inclusive com o aconselhamento genético. Uma população bem informada é importante, também, para que eles procurem atendimento médico quando notarem algo diferente.

O artigo apresentado nesta dissertação é o primeiro do Brasil a tratar desta doença especificamente e espera-se que, depois deste trabalho, a doença seja mais divulgada e casos como os das gêmeas de Manaus não voltem a ocorrer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bianca S, Bianca M. (2005) A new deletion in dominant guanosine triphosphate cyclohidrolase I deficiency gene – Segawa disease. *Journal of Neural Transmission* 1435-1463 on line.
- Blau N, Bonafé L, Thöny B. (2001) Tetrahydrobiopetrin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of DOPA-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 74:172-185.
- De Lonlay P et al..(2000) Tyrosine hydroxylase deficiency unresponsive to L-Dopa treatment with unusual clinical and biochemical presentation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 23:819-825.
- Furukawa Y et al. (2000) Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene. In: Hagenah et al., High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology* 64:908-911.
- Furukawa Y. (2003) Genetics and biochemistry of dopa-responsive dystonia: significance of striatal tyrosine hydroxylase protein loss. In: Bianca S, Bianca M., A new deletion in dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency gene – Segawa disease. *Journal of Neural Transmission* 1435-1463
- Gütlich M, Jaeger E, Rücknagel KP, Werner T, Rödl W, Ziegler I, Bacher A. (1994) Human GTP cyclohydrolase I: only one out of three cDNA isoforms gives rise to the active enzyme. *The Biochemical Journal* 302:215–221.
- Hagenah et al. (2005) High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology* 64:908-911.
- Hahn H, Trant MR, Brownstein MJ, Harper RA, Milstien S, Butler IJ. (2001) Neurologic and psychiatric manifestations in a family with a mutation in exon 2 of the guanosine triphosphate-cyclohydrolase gene. *Archives of Neurology* 58(5):749-755.
- Hirano M, Tamura Y, Nagai Y, Ito H, Imai T, Ueno S. (1995) Exon skipping caused by a base substitution at a splice site in the GTP cyclohydrolase I gene in a Japanese family with hereditary progressive dystonia/ dopa responsive dystonia. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 213: 645–651



- Hirano M, Tamaru Y, Ito H, Matsumoto S, Imai T, Ueno S. (1996) Mutant GTP cyclohydrolase I mRNA levels contribute to dopa-responsive dystonia onset. In: Müller U, Steinberger D, Topka H., Mutations of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Journal of Neural Transmission* 109:321-328
- Hirano M, Ueno S. (1999) Mutant GTP cyclohydrolase I in autosomal dominant dystonia and recessive hyperphenylalaninemia. *Neurology* 52:182–184.
- Hwang WJ, Calne DB, Tsui JKC, de la Fuente-Fernández R. (2001) The long-term response to levodopa in dopa-responsive dystonia. *Parkinsonism & Related Disorders* 8:1-5.
- Hyland K et al. (1997) Oral phenylalanine loading in dopa-responsive dystonia: A possible diagnostic test. *Neurology* 48:1290–1297.
- Hyland K, Nygaard TG, Trugman JM, Swoboda KJ, Arnold LA, Sparagana SP. (1999) Oral phenylalanine loading profiles in symptomatic and asymptomatic gene carriers with dopa-responsive dystonia due to dominantly inherited GTP cyclohydrolase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 22:213-215.
- Ichinose H et al. (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. In: Müller U, Steinberger D, Topka H., Mutations of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Journal of Neural Transmission* 109:321-328
- Jan MM. (2004) Misdiagnoses in children with dopa-responsive dystonia. *Pediatric Neurology* 31(4):298-303.
- Koshimura K, Miwa S, Watanabe Y. (1994) Dopamine-releasing action of 6R-L-erythro-tetrahydrobiopterin: analysis of its action site using sepiapterin. In: Müller U, Steinberger D, Topka H., Mutations of GCH1 in dopa responsive dystonia. *Journal of Neural Transmission* 109:321-328
- Lüdecke B, Dworniczak B, Bartholomé K. (1995) A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. In: Bräutigam C. et al., Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*; 44(9): 1897-1904.
- Lüdecke B, et al. (1996) Recessively inherited L-Dopa-responsive parkinsonism in infancy caused by a point mutation (L205P) in the tyrosine hydroxylase gene. In: Bräutigam C. et al., Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clinical Chemistry*; 44(9): 1897-1904.

- Müller U, Steinberger D, Topka H. (2002) Mutations of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Journal of Neural Transmission* 109:321-328.
- Nishiyama N, Yukishita S, Hagiwara H, Kakimoto S, Nomura Y, Segawa M. (2000) Gene mutation in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD), strictly defined dopa-responsive dystonia. *Brain & Development* 22:S102–S106
- Nygaard TG (1993) Dopa-responsive dystonia. Delineation of the clinical syndrome and clues to pathogenesis. In: Bianca S, Bianca M., A new deletion in dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency gene – Segawa disease. *Journal of Neural Transmission* 1435-1463
- Nygaard TG, Trugman JM, deYebenes JG, Fahn S (1990) Dopa-responsive dystonia: the spectrum of clinical manifestations in a large North American family. *Neurology* 40:66–69
- Nygaard TG, Snow BJ, Fahn S, Calne DB (1993a) Dopa-responsive dystonia: clinical characteristics and definition. In: Segawa M (ed) *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation*. Parthenon Publishing, pp 21–35
- Ohye T, Hori T, Katoh S, Nagatsu T, Ichinose H. (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the human sepiapterin reductase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251:597–602.
- Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. (1976) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. In: Jan M., *Misdiagnoses in children with dopa-responsive dystonia*. *Pediatric Neurology*, 2004; 31(4):298-303.
- Shimoji M, Hirayama K, Hyland K, Kapatos G. (1999) GTP cyclohydrolase I gene expression in the brains of male and female hph-1 mice. *Journal of Neurochemistry* 72(2):757–764.
- Steinberger D, Blau N, Goriunov D, Bitsch J, Zuker M, Hummel S, Müller U. (2004) Heterozygous mutation in 5'-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 5:187–190.
- Steinberger D, Weber Y, Korinthenberg R, Deuschl G, Benecke R, Martini J, Müller U (1998) High penetrance and pronounced variation in expressivity of GCH1 mutations in five families with Dopa-responsive dystonia. In: Müller U, Steinberger D, Topka H., *Mutations of GCH1 in dopa responsive dystonia*. *Journal of Neural Transmission* 109:321-328

Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, Ichinose H. (1999) Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase I: relationship to etiology of dopa-responsive dystonia. *Journal of Neurochemistry* 73(6):2510–2516.

Wevers RA et al.. (1999) A Review of biochemical and molecular genetic aspects of tyrosine hydroxylase deficiency including a novel mutation (291delC). *Journal of Inherited Metabolic Disease* 22:364-373.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)