

Débora Marques de Miranda

Estudo de Associação entre Síndrome de Tourette e
genes da via Slit-Robo envolvidos no
neurodesenvolvimento.

Orientador: Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Antônio Lúcio Teixeira

Co-orientador: Cathy Barr

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2006

Débora Marques de Miranda

Estudo de Associação entre Síndrome de Tourette e genes da via Slit-Robo
envolvidos no neurodesenvolvimento.

Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Farmacologia

Orientador: Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Antônio Lúcio Teixeira

Co-orientador: Cathy Barr

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2006

*Aos meus velhos e novos amores:
meus pais, meu Marquinho e nosso baby*

Sumário

Sumário	iv
Agradecimentos	v
Lista de abreviaturas	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	viii
Resumo	9
Abstract	11
O caso da Marquesa Dampierre	12
I. Introdução	13
I.I Características clínicas da Síndrome de Tourette	14
I.II História natural e epidemiologia da Síndrome de Tourette	17
I.III Características neuroanatômicas sustentando as hipóteses genéticas ..	18
I.IV Etiopatogênese da Síndrome de Tourette	21
I.V Estudos genéticos relacionados à Síndrome de Tourette: aspectos históricos e recentes	23
I.VI SLITRK1, SLITs, ROBOs, dos genes às proteínas.....	26
I.VII A seleção dos genes do nosso estudo.....	27
II. Objetivos	30
III. Material e Métodos.....	32
III.I Amostra estudada	33
III.II Diagnóstico Clínico	33
III.III Estudo Genotípico	34
III.IV Análise estatística.....	41
IV. Resultados.....	43
IV.I Gene SLITRK1	44
IV.II Genes ROBO3 e ROBO4	46
IV.III Gene SLIT2	51
V. Discussão	59
VI. Bibliografia	66
VII. Anexos.....	78
Anexo 1 Método de extração de DNA de leucócitos	79
Anexo 2 Critérios do DSM-IV para Tiques	82
Anexo 3.....	90
Anexo 4.....	91

Agradecimentos

Ao meu Marquinho símbolo de amor, amizade e dedicação, sempre presente, amigo e doce, muitas vezes antecipando a necessidade e confortando a angústia.

Ao meu big boss, LA, símbolo de amizade, lealdade e apoio. E que representa o único que poderia ser o meu orientador...

Ao Antônio símbolo de compreensão e estímulo.

À Cathy que fez-me, à sua forma, melhorar e crescer e propiciou condições para a realização desse trabalho.

Aos meus pais símbolo de amor, equilíbrio e tranquilidade, que torcem, cuidam e permitem, com a firme certeza da necessidade.

Ao baby que vêm, símbolo de alegria e cultivo de potencial.

Às crianças sadias ou doentes que são boa razão para tudo.

Aos meus irmãos e irmã que são doce presença e lembrança.

Ao Tomás, pequena doce criatura tão inspiradora.

À Bela e ao Flávio que garantiram parte da tranquilidade em ato de imensa amizade.

À Candida, nova amiga, que foi boa e solidária companhia no momento da escrita.

À Wolf símbolo de dedicação e delicadeza.

Ao professor Marcus Vinícius, exemplo de ciência.

Ao Jim, a Lizette, Karen, Kim, Nancy, Jill, Yu, Emma e Jonh símbolo de solidariedade e de gosto pela ciência – e pessoas que fizeram a temporada no Canadá agradável.

Aos demais familiares e amigos que são parte da história e que descobri que fazem tanta falta. Em especial ao Tio Vivaldo que sempre se deliciou com as atividades da vida acadêmica.

À CAPES que permite com o organizado programa de bolsa sanduíche uma experiência única.

Lista de abreviaturas

DHPLC – traduzido do inglês Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance

FAM – Frequência Alélica Mínima

PANDAS – traduzido do inglês Transtorno neuropsiquiátrico e pediátrico auto-imune associado a infecção estreptocócica

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – traduzido do inglês Polimorfismo de Nucleotídeo único

SLITRK1 – Slit and Trk-like family member 1

ST – Síndrome de Tourette

TDT – Test de Desequilíbrio de Transmissão

ROBO - Roundabout

Lista de Figuras

Figura 1. Mostra a formação dos homo e dos heterodúplex durante resfriamento gradativo após PCR.....	36
Figura 2. Resultados gráficos de DHPLC e de sequenciamento.....	45
Figura 3. Representação gráfica do Desequilíbrio de Ligação do gene <i>ROBO3</i>	48
Figura 4. Representação gráfica do Desequilíbrio de Ligação do gene <i>ROBO4</i>	50
Figura 5. Representação gráfica do Desequilíbrio de Ligação do gene <i>SLITRK1</i>	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados em PCR do gene de <i>SLITRK1</i> e as temperaturas de anelamento.....	35
Tabela 2 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene da <i>SLITRK1</i>	38
Tabela 3 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do <i>ROBO3</i>	39
Tabela 4 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do <i>ROBO4</i>	39
Tabela 5 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do <i>SLIT2</i>	40
Tabela 6 - Análise de TDT do gene <i>SLITRK1</i>	46
Tabela 7 - Desequilíbrio de ligação entre marcadores usados nos estudos do gene <i>SLITRK1</i>	46
Tabela 8 - Análise de TDT do gene <i>ROBO3</i>	47
Tabela 9 - Desequilíbrio de ligação entre marcadores usados nos estudos do gene <i>ROBO3</i>	48
Tabela 10 - Análise de TDT do gene <i>ROBO4</i>	49
Tabela 11 - Desequilíbrio de ligação entre os marcadores usados no estudo do gene <i>ROBO4</i>	50
Tabela 12 - Análise do TDTphase no gene <i>SLIT2</i>	52
Tabela 13 - Análise de combinação de haplótipos no gene da <i>SLIT2</i>	55

Resumo

A Síndrome de Gilles de la Tourette (ST) é uma entidade neuropsiquiátrica caracterizada pela presença de tiques e com importante componente hereditário. Muitos grupos vêm estudando os aspectos genéticos da ST, mas frequentemente os dados não se sustentam em estudos posteriores. Recentemente, foi descrita a presença de mutação do gene *Slit and Trk-like family member 1 (SLITRK1)* como gene correlacionado com a ST em três pacientes não-relacionados. A família das proteínas SLIT e seus receptores, os ROBO, aparentemente estão envolvidos no direcionamento axonal em relação ao cruzamento da linha média na medula vertebral. O objetivo do nosso estudo foi esclarecer se a via slit/robo está geneticamente associada à Síndrome de Tourette. Considerando que a participação nessa doença ainda é incerta, visto que apenas 0,6% dos pacientes de um único estudo apresentam alterações no gene *SLITRK1*, inicialmente procuramos estabelecer o papel do gene da *SLITRK1* na nossa amostra de crianças com diagnóstico de Síndrome de Tourette, e posteriormente selecionamos outros genes correlacionados com *SLITRK1* e que são codificados em regiões cromossômicas que apresentam linkage com a Síndrome de Tourette. Foram escolhidos para estudo os genes *SLIT2*, *SLITRK1*, *ROBO 3* e *ROBO4*.

Nossa amostragem é constituída por famílias de trios e famílias com um ou mais membros afetados com ST. A replicação do estudo de Abelson e colaboradores (2005) foi feita utilizando análise por DHPLC da região codificadora de *SLITRK1* e posterior sequenciamento das amostras que apresentaram alterações na cromatografia. Os demais genes estudados foram avaliados a partir da genotipagem de tagSNPs. Todos os dados foram analisados utilizando-se testes estatísticos, como TDT e análise de haplótipos ambos realizados no UNPHASED e capazes de avaliar a associação e o poder do estudo.

Como resultado, foram confirmados os achados de alteração no gene da *SLITRK1* em paciente com ST. O estudo dos genes *ROBO3* e *ROBO4* não encontrou associação com a ST. Dois polimorfismos do gene da *SLIT2* apresentam desvio de transmissão em pacientes com ST. E foi encontrada

associação entre dois tagSNPs do gene da *SLIT2* e a ST. Dessa forma, os genes *SLIT2* e *SLITRK1* são genes possivelmente relacionados com ST e devem ser continuamente investigados.

Abstract

Tourette syndrome (TS) is a neuropsychiatric disorder characterized by tics and familiar inheritance. Several research groups are investigating the genetic aspects of TS, however, frequently the findings are not replicated in subsequent studies. Study of gene *Slit and trk-like family member 1 (SLITRK1)* has shown correlation with TS in three non-related patients. The family of SLIT proteins and their receptors, the robo family, are involved in axonal guidance in the crossing over at the spinal cord. The objective of our study was to further elucidate the putative role of Slit-Robo pathway in TS. The role of *SLITRK1* gene in TS remains uncertain, since only 0.6% of patients in only one study were presented with changes in this gene. We have chosen genes that are related to the Slit-Robo pathway and present in regions pointed as suspicious in linkage association studies. Among the genes selected for our study were *SLIT2*, *SLITRK1*, *ROBO3* and *ROBO4*.

Our study is based in families with one or more affected individuals. All patients were evaluated by an experienced neuropsychiatrist. To replicate Abelson et al. (2005) findings, we used DHPLC to investigate the coding region of *SLITRK1* and subsequent sequencing of altered samples. Other genes were studied with tagSNPs. All data was analyzed with common statistical programs, as TRANSMIT and TDT-UNPHASED.

We have found mutation in the *SLITRK1* gene in one TS patient. We failed to find association among *ROBO3* and *ROBO4* genes and TS. Our study found association among *SLIT2* gene polymorphisms and TS.

In conclusion, some Slit-robo pathway genes are associated with TS, reinforcing the importance of proteins and genes involved in the neurodevelopment process for future investigation.

O caso da Marquesa Dampierre

O texto abaixo é uma tradução de uma descrição atribuída ao Dr. Gilles de la Tourette em avaliação de uma paciente:

“A Marquesa de Dampierre na idade de 7 anos foi acometida por movimentos convulsivos das mãos e braços... Depois de cada espasmo, os movimentos das mãos tornavam-se mais regulares e melhor controlados até que um movimento convulsivo interrompesse seu trabalho. Ela sofria de uma superexcitação e vergonha, e os movimentos tornaram-se mais e mais frequentes, sendo ela alvo de reprimendas e punições. Entretanto, logo tornou-se claro que esses movimentos eram involuntários. Os movimentos envolviam os ombros, o pescoço, e a face, e resultavam em contorções e caretas extraordinárias.”

“Com a progressão da doença, os espasmos passaram a envolver a voz e a fala, a jovem dama apresentava estranhos gritos e dizia palavras que não faziam sentido. Entretanto, durante todo o tempo, ela esteve claramente alerta e não mostrou nenhum sinal de delírio ou outros problemas mentais. Meses e anos passaram-se sem que houvessem mudanças nos seus sintomas. Esperava-se que com a puberdade isso pudesse naturalmente diminuir, mas isso não aconteceu.”

“No meio de uma interessante conversa, repentinamente, sem ser capaz de evitar, ela interrompia o que estava dizendo ou o que estava escutando para dar início a gritos horríveis e palavras que eram ainda mais extraordinárias que seus gritos. Todo esse comportamento contrastava deploravelmente com suas maneiras distintas. As palavras eram frequentemente de cunho ofensivo e obsceno provocando embaraço para ela e para aqueles que tinham que ouvir. As expressões eram tão vulgares que uma opinião desfavorável da mulher era algo inevitável.”

Texto retirado na íntegra do site <http://www.tourettes-disorder.com> e traduzido para o português.

I. Introdução

Até o fim do século XIX, todo movimento anormal era conhecido como coréia, palavra grega que significa dança (Shapiro e cols., 1988a). O livro “*Traité de Chorée*”, publicado em 1810, classifica as coréias como verdadeiras ou falsas. Entre as falsas encontrava-se a descrição da doença que mais tarde viria a ser denominada Síndrome de Tourette (ST) (Shapiro e cols., 1988a).

A primeira descrição de um paciente com ST foi feita por Itard em 1825, que relatou o caso da Madame Dampierre e que, posteriormente, foi reavaliada e descrita como um dos nove pacientes de Gilles de la Tourette (Shapiro e cols., 1988a). A Marquesa de Dampierre apresentou a doença aos 7 anos de idade e persistiu com sintomas até o dia de sua morte, aos 80 anos de idade.

Gilles de la Tourette descreveu pela primeira vez a síndrome de múltiplos tiques motores e vocais em 1885 (de la Tourette, 1885; Shapiro e cols., 1988a), relatando nove pacientes que apresentavam transtorno no qual estavam presentes tiques de início usual na face ou extremidades superiores, coprolalia e ecolalia, caráter familiar, maior frequência em homens, início na infância (entre 7 a 10 anos de idade), onde os sintomas eram intermitentes. Assim, foi caracterizada e separada das coréias e, posteriormente, denominada Síndrome de Tourette (ST) (Grados e cols., 2006).

Desde esse primeiro relato, o interesse na síndrome tem motivado seu estudo e melhor caracterização quanto aos aspectos clínicos, história natural, fisiopatogênese e tratamento.

I.I Características clínicas da Síndrome de Tourette

Atualmente, a ST é entendida como uma entidade neuropsiquiátrica caracterizada pela presença de um, ou mais freqüentemente, múltiplos tiques motores associados a um ou mais tiques vocais por, pelo menos, um ano, sem um período superior a 3 meses na ausência de tiques (Rampello e cols., 2006; Singer, 2005a). Para caracterização do diagnóstico pelo Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais IV (DSM-IV, American Psychiatric Association) são necessários:

- tiques motores e um ou mais tiques vocais no mesmo período de tempo, sem que, entretanto, sejam necessariamente concomitantes;

- tiques que acontecem várias vezes por dia, quase todos os dias, ou de maneira intermitente por um ou mais anos, durante o qual não deve haver período superior a 3 meses consecutivos sem tiques;

- a idade de início dos sintomas deve ser necessariamente menor que 18 anos;

- o transtorno não deve ser decorrente de efeitos fisiológicos diretos de substâncias ou de uma outra condição médica (uso de estimulantes, doença de Huntington, encefalite viral, etc.).

Os tiques são vocalizações e/ou movimentos anormais involuntários, repentinos, rápidos, repetitivos, arrítmicos, inapropriados e estereotipados (Singer, 2005a; Rampello, 2006). Os tiques motores podem envolver um músculo específico, pequenos grupos musculares ou vários grupos musculares agindo coordenadamente (Albin & Mink, 2006). Os tiques são modulados por estados emocionais, sendo exacerbados em situações de fadiga e de ansiedade, e minimizados durante o sono e nos momentos de concentração (Singer e cols., 2005a).

A ST clinicamente é bastante heterogênea, mas os tiques caracterizam-se pelo curso intermitente e o repertório variável ao longo da doença (Leckman e cols., 1999). O sintoma mais freqüente no início da manifestação da ST são tiques que envolvem os olhos, mas os pacientes freqüentemente apresentam uma variedade de outras ações complexas como tocar, lambar, cuspir, bater, pular, cheirar, ajoelhar, anormalidades de marcha e tosse forçada (Robertson, 1994). Alguns autores descrevem o desenvolvimento crânio-caudal dos tiques, aparecendo antes na cabeça para depois evoluir para o acometimento das extremidades (Leckman e cols., 1999).

Os tiques vocais freqüentemente aparecem depois dos motores, em média aos 11 anos de idade. Os tiques fônicos são sons ou palavras rápidas, que podem ser caracterizados por sua frequência, número, duração, volume e complexidade (Leckman e cols., 1999), podendo ser desde latidos e grunhidos a frases

complexas. A coprolalia, apesar de ser um dos sintomas mais conhecidos da doença, acomete menos de um terço dos pacientes com ST, entre os quais poucos são crianças (Robertson, 2000). A copropraxia (execução de gestos obscenos involuntários e inapropriados) é relatada entre 1 e 21% dos pacientes, enquanto ecolalia (a imitação de sons ou palavras de outras pessoas) e ecopraxia (imitação de ações de outras pessoas) ocorre de 11 a 44% dos pacientes. A palilalia (repetição da última palavra ou frase numa sentença ou da última sílaba de palavra pronunciada pelo paciente) acomete 6 a 15% dos pacientes (Robertson, 1994). Outros sintomas possivelmente encontrados na doença são os tiques sensoriais e a coprografia (Robertson, 1994).

Muitos pacientes descrevem experiências sensoriais premonitórias que são distintas dos tiques motores ou vocais (Robertson, 1994) e que, seguidos à realização do tique, promovem uma sensação de alívio. Entretanto, descrições clínicas informam que é comum o comportamento de negação dos sintomas pelos pacientes ou mesmo a supressão de sintomas durante avaliação clínica (Robertson, 1994).

Além dos tiques, a ST apresenta-se ainda associada a um amplo espectro de transtornos comportamentais e psiquiátricos. Atualmente, acredita-se que apenas 15% dos pacientes com ST não apresentam co-morbidades psiquiátricas. Os transtornos mais comumente associados são o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Robertson, 2000; Robertson, 2006). A co-morbidade entre TOC e ST varia de 20 a 60%, existindo estudos que apontam até 90% de co-morbidade com sintomas obsessivo-compulsivos (Bloch, 2006; Robertson, 2000). A porcentagem de crianças com a co-morbidade de TDAH e ST é variável de acordo com a população estudada. Robertson (2006), em revisão recente, aponta uma média em torno de 20% em vários estudos, sendo que a amplitude de variação entre diferentes estudos foi de 21 a 90% (Robertson, 2006).

Vários estudos mostraram ainda um aumento da incidência de transtornos de humor, especialmente depressão, e de ansiedade nos pacientes com ST (Singer, 2005a). Além dessas manifestações psiquiátricas, podem também estar

presentes outras alterações como comportamento de auto-mutilação, transtornos de personalidade, comportamentos agressivos e anti-sociais, transtorno de conduta, diversos distúrbios do sono, autismo e dificuldade de aprendizagem (Robertson, 2000). Dentre as co-morbidades neurológicas ressalta-se a ocorrência de migrânea nos pacientes com ST, numa frequência muitas vezes maior que na população em geral, chegando a alcançar 25% dos pacientes com ST (Kwak e cols., 2003).

Os problemas sociais da ST são variados e frequentes. Por exemplo, no trabalho de Pappert e colaboradores (2003), constatou-se que 52% das crianças com diagnóstico de ST apresentavam problemas sociais ou educacionais sendo que: 39% necessitavam de salas de estudo especiais, 10% cursavam com atraso na escola em, pelo menos, um ano e 29% apresentavam problemas disciplinares. Já na vida adulta, 32% dos pacientes tinham problemas sócio-educacionais. No momento da entrevista, apenas 71% estavam empregados. Dentre os pacientes com problemas sócio-educacionais durante a infância, 50% persistiram com alterações sociais durante a vida adulta.

A complexidade clínica e o potencial de devastação social promovido pela doença tornam seu estudo mais interessante e necessário, motivando a busca de novos caminhos para melhoria da qualidade de vida daqueles portadores desse diagnóstico.

I.II História natural e epidemiologia da Síndrome de Tourette

A ST manifesta-se por volta dos 6 anos de idade e tem curso variável, tendendo a diminuir tanto a frequência quanto a gravidade durante a puberdade ou nos primeiros anos da vida adulta (Leckman e cols., 1998). Um importante estudo de seguimento de 58 adolescentes e adultos jovens com idade entre 15 e 25 anos mostrou que os tiques desaparecem em 26% dos casos, diminuem em 46%, permanecem estáveis em 14% e aumentam em 14% dos afetados (Erenberg e cols., 1987).

Em relação à sua relevância epidemiológica, entre os anos de 1899 e 1966, estimava-se que a prevalência da ST variava entre 0.0005-0.019% (Shapiro e cols., 1988b). Essas estimativas trouxeram a impressão de que a ST estava sendo subestimada, o que ficou muito claro quando 666 pacientes com ST avaliados entre 1965 e 1981 apontaram que 61,7% deles nunca tinham sido diagnosticados, mesmo frequentando o consultório médico de centros de diagnóstico de ST (Shapiro e cols., 1998b). A ST deixou de ser uma doença considerada rara nos últimos anos (Robertson, 2003; Albin & Mink, 2006). Estudos da década de 1990 e da atual vêm redefinindo a prevalência de ST, que acredita-se estar presente em aproximadamente 1% das crianças entre 6 e 17 anos (Robertson, 2003). Em adultos, acomete de 0,5 a 4,3/10.000 indivíduos, refletindo a redução da prevalência do transtorno com o avançar da idade (Leckman e cols., 1998). Já os tiques isoladamente, podem estar presentes em até 10% das crianças e adolescentes entre 6 e 18 anos (Robertson, 2003). Os familiares de primeiro grau de pacientes afetados pela ST têm um risco 10 a 100 vezes maior que o risco de um indivíduo da população geral para desenvolver a ST (Pals e cols., 2003).

Trabalho realizado em 22 países, com avaliação de 3500 pacientes, reafirmou o fato da doença ser mais frequente entre meninos que meninas, estabelecendo uma taxa de 4,3:1, respectivamente. Os meninos apresentaram ainda mais frequentemente co-morbidades (Freeman, 2000).

I.III Características neuroanatômicas sustentando as hipóteses genéticas

A hipercinesia da ST sugere envolvimento de regiões motoras do cérebro, o componente obsessivo da doença indica alterações de áreas de processamento cognitivo e a dificuldade de inibir comportamentos inadequados mostra alterações de regiões inibitórias do cérebro (Peterson e cols., 1999b). Um circuito que é capaz de atuar nesses diversos processos é o circuito córtico-estriado-pálido-tálamo-cortical, também denominado fronto-estriatal. Considerando que os tiques são movimentos que fazem parte do repertório dos movimentos normais, acredita-

se que aconteçam a partir do funcionamento desorganizado do circuito fronto-estriatal.

A hipótese do envolvimento dos núcleos da base surgiu principalmente de paralelos com outros distúrbios do movimento (Singer, 2005a). Estudos “*post mortem*” apresentaram achados variáveis como hipoplasia de neurônios dos núcleos caudado e putâmen, além de aumento do número de sítios pré-sinápticos de captação de dopamina nessas mesmas regiões, mas todos foram realizados com um pequeno número de amostras (Peterson, 1999b). Isso nos leva a concluir que estudos “*post mortem*” não indicaram anormalidades anatômicas específicas que esclarecessem a anatomia da ST (Robertson, 1994).

Estudos de imagem são muito controversos e de difícil interpretação, especialmente porque os dados de imagem de ST geralmente são obtidos de pacientes adultos ou, ainda, de grupos compostos por crianças e adultos e, freqüentemente, são numericamente insuficientes (Albin e cols., 2006).

Um dos estudos com melhor amostragem realizado em pacientes com ST é o de Peterson e colaboradores (2003) que publicaram trabalho com 154 pacientes e 130 controles estudados utilizando ressonância magnética estrutural, pareados quanto a idade em grupo composto por crianças e adultos, focalizando na avaliação dos núcleos da base. Parcela importante dos pacientes, em torno de 46%, estava em uso de medicação neuroléptica, o que mostrou produzir alteração no volume dos núcleos da base de forma estatisticamente significativa, correlacionada ao uso de medicação típica ou atípica, o que fez com que os pacientes em uso de medicação fossem excluídos do estudo. A amostra final foi de 127 indivíduos com ST e 130 controles. A conclusão final desse trabalho foi que pacientes com ST apresentaram uma redução global do volume das estruturas do núcleo da base, especialmente do núcleo caudado (Peterson e cols., 2003).

Além dos núcleos da base, várias outras estruturas cerebrais apresentam evidências de envolvimento na ST. As evidências de envolvimento do tálamo na ST derivam da sua localização e de lesões neurocirúrgicas do tálamo. Lesões cirúrgicas de algumas porções do tálamo atenuam os tiques, enquanto outras

promovem exacerbação dos sinais. Além disso, estudo empregando ressonância magnética funcional, mostrou a ativação do tálamo mediante comando para suprimir tiques (Peterson, 1999b).

Estudo de ressonância magnética estrutural, envolvendo 155 pacientes com ST, crianças e adultos, pareados de acordo com a idade e sexo com 131 controles, avaliou o volume do córtex cerebral. Depois de realizadas correções para idade e sexo, encontraram volumes alterados em córtex pré-frontal e occipital inferior nos pacientes com ST. A região pré-frontal tem como uma de suas funções a tomada de decisões, incluindo também a região motora suplementar. Estimulação elétrica dessa região promove movimentos complexos, vocalizações, movimento na parte contralateral do corpo. A região pré-frontal contribui ainda para motivação, planejamento, execução de repertórios de comportamentos. Regiões occipitais incluem o processamento viso-espacial e atenção (Peterson, 2001). Considerando que as maiores diferenças encontradas entre os grupos foram nas regiões pré-frontal e occipital inferior, conclui-se que a ativação do córtex pré-frontal é coerente com a supressão que o paciente com ST faz dos tiques, pois a região pré-frontal pode induzir a redução da atividade dos núcleos da base.

Apesar dos estudos de imagem não serem restritos aos comentados acima, eles foram salientados pelo fato de possuírem amostragem importante e ilustrativa do amplo acometimento cerebral produzido pela ST. Com a perspectiva de ampla extensão cerebral da ST, no momento de escolha dos genes a serem estudados, selecionamos genes que fossem expressos no sistema nervoso central (SNC) especialmente nas áreas que estudos de neuroanatomia e neuroimagem indicam como regiões afetadas na ST.

I.IV Etiopatogênese da Síndrome de Tourette

A etiopatogênese da ST permanece controversa. Como vimos acima, estudos de neuroimagem estrutural e funcional, assim como investigações anátomo-patológicas, sugerem o envolvimento de circuitos córtico-estriato-pálido-tálamo-corticais (ou fronto-estriatais) na gênese dos tiques e alterações comportamentais na ST (Singer e cols., 2005a). No entanto, permanecem dúvidas quanto ao que determina a disfunção/lesão desses circuitos.

Vários fatores estão possivelmente envolvidos, incluindo alterações perinatais, fatores auto-imunes e infecciosos, especialmente após infecção estreptocócica, além dos fatores genéticos.

Entre os processos infecciosos, o que mais vem se destacando em número de estudos é a hipótese da ocorrência de ST secundária à infecção pelo estreptococos. Alguns grupos de pesquisa consideram que parte dos pacientes com ST integrariam a entidade clínica denominada PANDAS (*Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorder Associated with Streptococcal infection*)(Swedo e cols., 1998; Mell e cols., 2005). Os grupos que estudam PANDAS propõem que auto-anticorpos produzidos contra o *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A de Lancefield teriam reação cruzada com o tecido neuronal dos núcleos da base, gerando tiques e sintomas comportamentais (Swedo e cols., 1994; Swedo e cols., 2004). Como argumento a favor existe o fato de que familiares de primeiro grau de crianças com PANDAS apresentam maior taxa de tiques e TOC que a população geral (Singer, 2005 a e b). Entretanto, vários aspectos dessa entidade continuam controversos, entre eles: (a) não é clara a relação entre a infecção pelo *Streptococcus* e o desenvolvimento dos sintomas, (b) os auto-anticorpos são variavelmente detectados no soro/plasma dos pacientes conforme o grupo de pesquisadores ou a metodologia empregada (Peterson, 1999a), (c) mesmo os anticorpos detectados podem ser decorrentes de uma resposta imune dirigida à lesão tecidual anterior e não relacionada a fatores determinantes da ST, especialmente se considerarmos a frequência da infecção

pelo estreptococos (Singer, 2005b). Sendo assim, essa hipótese ainda é considerada frágil quanto à sustentação científica (Singer, 2005a e b).

Outros processos infecciosos vêm sendo relacionados com a clínica de ST, mas a documentação científica ainda consiste apenas de relatos de casos de pacientes com sintomas de ST subsequentes a infecção viral, até o presente momento sem maior sustentação científica (Robertson, 2000).

Estudos com gêmeos monozigóticos demonstraram que algumas características do período peri-natal poderiam modular a manifestação da ST. Trabalho desenvolvido na década de 80 mostrou que baixo peso seria um fator predisponente à manifestação mais grave da ST (Peterson e cols., 1999a). Esse mesmo grupo, em 1990, desenvolveu estudo que constatou maior número de complicações durante a gravidez e parto entre as crianças com ST. Entretanto, esse trabalho não foi realizado com grupo controle e apenas comparou a incidência de complicações na gravidez das mães de crianças com ST em relação à incidência de complicações nas grávidas em geral (Peterson e cols., 1999a). O trabalho de Burd e cols. (1999) avaliou informações de 92 cartões de pré-natal de crianças com ST, comparando com as informações de 420 cartões de crianças controles. Esse estudo apontou que os cuidados pré-natais (número de consultas médicas e mês de início do pré-natal) e o valor menor que oito do índice Apgar de cinco minutos são fatores de risco para o surgimento da ST. Em estudo realizado por Khalifa e cols. (2005), no entanto, não foi encontrada associação entre ST e fatores pré ou perinatais. Enfim, são poucos os estudos avaliando fatores ambientais como cuidados pré-natais, gravidade da náusea e vômitos da mãe durante a gravidez, complicações durante a gravidez, baixo peso de nascimento, índice de Apgar e estresse materno e não está bem estabelecido seu papel na etiopatogênese da ST, sendo necessários estudos complementares (Singer e cols., 2005a).

I.V Estudos genéticos relacionados à Síndrome de Tourette: aspectos históricos e recentes

O caráter familiar da ST foi bem estabelecido nas décadas de 70 e 80, quando foi realizado estudos com gêmeos e com famílias de pacientes com diagnóstico de ST (Pauls e cols., 1981; Kidd e cols., 1980; Price e cols., 1985). No trabalho desenvolvido por Price e cols. (1985) foi encontrada concordância quanto à ST de 53% entre gêmeos monozigóticos e de apenas 8% entre os dizigóticos, sugerindo que, além do componente genético, outros fatores também atuam na etiopatogênese da doença (Price e cols., 1985).

Ao contrário de doenças mendelianas, a susceptibilidade às doenças complexas, como a ST, é multifatorial e provavelmente envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. Os esforços para localizar genes de susceptibilidade para essas doenças vêm sendo frequentemente infrutíferos, o que se deve à heterogeneidade de fenótipos, multiplicidade de genes, penetrância incompleta, complexo padrão de herança, intermitência de apresentação clínica, além da participação de fatores ambientais (Paschou e cols., 2004; Barr, 2005).

A boa resposta terapêutica da ST aos antagonistas dopaminérgicos sustenta a idéia de que o sistema dopaminérgico esteja envolvido na etiopatogênese da ST. Esse fato motivou o início da investigação de possíveis genes associados à ST a partir de genes envolvidos na neurotransmissão dopaminérgica. Foram encontradas associações entre um polimorfismo VNTR (*variable number of tandem repeats*) do exon 3 do gene do receptor D4 (Grice e cols., 1996) e dois polimorfismos isolados de gene do receptor de D2 e a ST, entretanto faltam estudos que reproduzam esses dados com sucesso (Barr e cols., 1998; Diaz-Anzaldúa, 2004; Lee e cols., 2005). Outros genes relacionados com a modulação da neurotransmissão, especialmente a dopaminérgica, foram estudados, tais como receptores de dopamina D1, D2, D3 e D5, tirosina hidroxilase, dopamina beta-hidroxilase, tirosinase, transportador de dopamina, transportador de serotonina, triptofano-hidroxilase e os receptores serotoninérgicos 1A, 6 e 7 (Barr e cols., 1998; Ozbay, 2006), mas sem achados consistentes de associação com a ST.

A possibilidade de correlação da ST com alterações auto-imunes e pós-infecciosas têm motivado a pesquisa de genes participantes da resposta imune (Swedo e cols., 1994; Kirvan, 2003). Foram feitos alguns estudos com genes codificando antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e II, mas nenhum deles mostrou associação com a ST (Caine, 1985; Schoenian, 2003). As regiões cromossômicas que contêm os genes HLA também não foram apontadas em estudos de mapeamento como regiões associadas geneticamente com a ST (Caine, 1985). No momento, como as alterações imunes associadas com a ST são bastante questionáveis, não existem trabalhos recentes que apontem novos dados em relação ao envolvimento de genes relacionados com o sistema imune em associação com a ST.

Mais recentemente, tem sido feita associação entre BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) e vários transtornos psiquiátricos, incluindo o TOC (Hall e cols., 2003). Como a co-morbidade entre TOC e a ST é freqüente e, acreditando que esses grupos de pacientes têm uma mesma vulnerabilidade genética (Grados e cols., 2003; Klaffke, 2006), foi realizado estudo de polimorfismo Val66Met do gene do BDNF em ST, no entanto sem achado de associação (Klaffke e cols., 2006).

Os estudos de ligação (*linkage*) do genoma realizado com grandes famílias ou com famílias com mais de um membro afetado apontaram ligação entre a ST com várias regiões genômicas, tais como nos cromossomos 3q (Verkerk e cols., 2006), 4q (TSA Consortium for Genetics, 1999; Zhang e cols., 2002), 5 (Barr e cols., 1999), 8p (TSA Consortium for Genetics, 1999), 8q22 (Simonin e cols., 1998), 10, 17q25 (Zhang e cols., 2002), 11q23-24 (Simonin e cols., 1998; Merette e cols., 2000), 13 (Merette e cols., 2000) e 17 (Paschou e cols., 2004) e regiões com escores de associação mais baixos nos cromossomos 10, 13, 19 e 20 (Simonin e cols., 1998; Barr e cols., 1999; TSA Consortium for Genetics, 1999; Barr, 2005). Nesses sítios genéticos, vem sendo feito mapeamento detalhado por diversos grupos, estudando famílias de diferentes populações na tentativa de confirmar os sítios acima ou mesmo apresentar novos sítios de associação. Até o presente momento, apenas o marcador de D11S1377, representativo da região 11q23, foi

considerado positivo em dois estudos independentes (Merette e cols., 2000; Simonic, 2001; Pauls, 2003).

Alguns estudos de avaliação de anormalidades cromossômicas foram realizados em indivíduos com ST e os achados de citogenética são interessantes na busca de genes candidatos, principalmente quando associados a hipóteses neurobiológicas. A região 7q22-q31.1 (Boghossian-Sell e cols., 1996; Kroisel, 2001) e a região 18q22.1 foram sugeridas como possíveis regiões associadas com a ST, muito embora um estudo anterior de *linkage* não tenha estabelecido essas regiões como associadas a doença (Heutink e cols., 1990). Uma translocação balanceada entre os cromossomos 1 e 8 foi encontrada em família de membros com diagnóstico de ST e tiques isolados, além de outros diagnósticos psiquiátricos (Barr, 2005). Outras anormalidades cromossômicas foram associadas com a ST dentre elas deleção de 9p22-23, translocação balanceada dos cromossomos 3 e 8, duplicação “de novo” do cromossomo 16p13.1 (Barr, 2005).

Recentemente, Abelson e cols. (2005) identificaram um paciente portador de ST e TDAH que possui a inversão no cromossomo 13, do qual foi feito estudo detalhado da região e encontrado um gene possivelmente associado com a ST. O gene encontrado foi o *Slit and Trk-like family member 1* ou simplesmente *SLITRK1*, localizado no cromossoma 13q31.1, que codifica uma proteína transmembrana com duas repetições ricas em leucina em seus domínios extracelulares. Depois de identificada uma mutação no gene do *SLITRK1*, foram investigados outros 174 pacientes com diagnóstico de ST quanto à presença de mutações nesse gene. Encontrou-se um paciente com mutação em heterozigose, apresentando deleção de uma base, levando em uma das fitas à alteração da janela de leitura (*frameshift*), determinando a geração de parte da proteína alterada. Essa proteína, quando expressa em neurônios, promoveu um crescimento reduzido de neuritos. Mutações do gene da *SLITRK1* foram descritas em uma parcela muito pequena dos pacientes com diagnóstico de ST (em torno de 0,6% dos pacientes), mas pode indicar uma via de sinalização potencialmente envolvida na patogênese da ST (Grados & Walkup, 2006).

I.VI SLITRK1, SLITs, ROBOs, dos genes às proteínas

A proteína SLITRK, identificada como alterada em pacientes com ST no trabalho de Abelson e colaboradores (2005), é homóloga às proteínas SLIT e TRK e foi identificada como uma proteína transmembrana que controla o crescimento do neurito (Aruga e cols., 2003a). A família das proteínas SLITRK é composta por 6 moléculas, SLITRK1 a SLITRK6, todas muito conservadas entre ratos e humanos no sistema nervoso central (Aruga e cols., 2003a). Os transcritos de SLITRK1 a SLITRK5 apresentam intensa expressão em córtex cerebral, ao passo que a expressão de SLITRK1 está localizada principalmente em lobo frontal (Aruga e cols., 2003b). Essa proteína apresenta ainda expressão significativa em neocórtex, estriado, globo pálido, cerebelo, hipocampo, tálamo e núcleos subtalâmicos, mostrando alguma sobreposição com regiões envolvidas com a ST (Abelson e cols., 2005). Ao contrário das proteínas SLIT, a SLITRK1 é pouco expressa em medula espinhal, mas é amplamente expressa em tecido de cérebro fetal (Aruga e cols., 2003b).

As proteínas SLIT e seus receptores, os ROBO, têm como um de seus papéis modular o crescimento axonal no que diz respeito ao cruzamento da linha média na medula espinhal de vertebrados (Kidd e cols., 1999; Mambetisaeva, 2005). Os primeiros elementos da via SLIT-ROBO foram descritos apenas nos últimos 10 anos e ainda são uma via pouco conhecida. Foram identificadas três proteínas SLIT e quatro ROBO. As proteínas SLIT foram denominadas SLIT 1 a SLIT 3 (Brose e cols., 1999; Kidd e cols., 1999). As SLIT 1 e 2 são expressas no cérebro e medula espinhal, respectivamente, e apresentam redução da expressão após o período fetal. Já a SLIT 3 é pouco expressa em tecidos do sistema nervoso central, sendo encontrada principalmente em tecido tireoideano. Inicialmente caracterizado em *Drosophila*, e conservado em vertebrados, as SLITs são agentes que repelem axônios comissurais e evitam o recruzamento da linha média (Brose, 1999). Camundongo *Knockout* para as três formas de SLIT apresentaram axônios comissurais desorganizados e desfasciculados, reafirmando em modelo animal o papel das SLIT no direcionamento do cruzamento da linha média (Long, 2004).

Os receptores ROBO foram descritos e denominados de ROBO1 a ROBO4. Os ROBO também têm redução de expressão no período pós-natal e assim como as SLIT 1 e 2, são largamente expressos no sistema nervoso central, exceção ao ROBO4, que não está presente no sistema nervoso central e sim no endotélio vascular, sendo encontrado nas bibliotecas cDNA, expresso principalmente em tecidos tumorais durante a vida adulta (Huminiecki, 2002). Já o receptor tirosina quinase (TRK) acelera as vias de diferenciação induzidas pelo fator de crescimento neural (Hempstead e cols., 1992). O papel de SLIT e TRK, bem como os achados de regulação do crescimento de neuritos por SLITRK1 são coerentes com a possibilidade de participação da SLITRK1 na etiopatogênese da ST.

Após o trabalho de Abelson e colaboradores (2005), vários grupos procuraram replicar os achados em pacientes com diagnóstico de ST e outras comorbidades associadas. Trabalho realizado por Verkerk e colaboradores (2006) investigou uma grande família com 31 membros e, pelo menos, 10 pacientes afetados com ST ou tiques, identificando três pontos de ligação em três diferentes cromossomas, entre esses o cromossoma 13q. O gene do *SLITRK1* também foi avaliado, mas não foram encontradas mutações nesse gene (Verkerk e cols., 2006).

O gene *SLITRK1*, baseado na frequente co-morbidade entre TOC e TS, foi investigado num estudo caso-controle de 322 pacientes com TOC e 390 controles, sendo encontrada a variante 321 descrita por Abelson e colaboradores (2005) apenas em um indivíduo controle de origem caucasiana do qual não havia disponibilidade de história ou avaliação clínica (Wendland, 2006). Estudo com 44 famílias de pacientes com tricotilomania, embora sem clínica de ST, identificou 2 mutações não-sinônimas no gene *SLITRK1* (Zucher e cols., 2006). Até o momento não surgiram outros trabalhos que confirmem a presença de mutações no gene da *SLITRK1* em pacientes com ST.

I.VII A seleção dos genes do nosso estudo

Os estudos de *linkage* vêm sendo bem sucedidos em estabelecer o papel de fatores genéticos na expressão de transtornos complexos (Bull e cols., 2005), sendo capazes de mostrar a existência de um *locus* etiologicamente importante mesmo na ausência da anormalidade biológica (Pauls, 2003). Diante dos dados do *linkage*, uma possível abordagem é a tentativa de localização de genes relacionados com determinado fenótipo, no chamado estudo de genes candidatos (Havill & Dyer, 2005). O estudo de genes candidatos, assim como o de polimorfismos candidatos, é um dos tipos de estudo de associação, que pode ser feito baseado em famílias ou em caso-controles. No nosso estudo foi realizado baseado em famílias, o que propicia redução de problemas como estratificação da população e o pareamento adequado de casos e controles (Evangelou, 2006).

No desenho do nosso estudo de associação, usamos a estratégia combinada de escolher genes possivelmente associados com a doença a partir de hipóteses neurobiológicas (no caso, genes de proteínas correlacionadas com SLITRK1) e em regiões previamente identificadas como regiões de *linkage*, além de estudarmos, preferencialmente, genes expressos no sistema nervoso central. Essa estratégia vem sendo repetidamente utilizada e apontada na literatura como adequada na seleção de genes candidatos (Pauls, 2003).

Nosso estudo foi inicialmente motivado pelos achados de Abelson e colaboradores (2005) de mutações no gene da SLITRK1 em pacientes com ST. Definida a associação da ST com o gene da SLITRK1 procuramos outros genes da via que cumprissem os critérios para seleção como genes candidatos a serem investigados no nosso estudo.

O cromossomo 11 tem sido amplamente investigado em estudos de associação com a ST devido ao fato de que nele localizam-se os receptores de dopamina D2 e D4. Entretanto, as regiões apontadas por *linkage* (11q23-24) são próximas apenas da região cromossômica do receptor de dopamina D2, localizado na região 11q22. Inicialmente focalizamos nossos esforços nas regiões de *linkage* 11q23-24 tendo identificado os genes ROBO3 e ROBO4 como genes candidatos.

Outra região apontada como relacionada à ST por estudos de *linkage* é a região 4q, identificada em *linkage* realizado pelo *TSA Genetics Consortium* e

divulgada até o presente momento apenas entre os membros do consórcio, dentre os quais a Dra. Cathy Barr (comunicação pessoal). Nessa região selecionamos o SLIT2 como gene candidato.

Por fim, após os achados de Abelson e colaboradores (2005), Grados e Walkup (2006) publicaram trabalho sugerindo passos que consideram importantes no estudo de *SLITRK-1* na ST sendo eles a replicação das evidências de que mutações no gene *SLITRK1* são acompanhadas do fenótipo de ST a partir da busca sistemática do gene de *SLITRK1* em amostras de pacientes com ST a associação neurobiológica que associe variantes genéticas de *SLITRK1* a modelos biológicos que apontem um mecanismo causal e ainda o desenvolvimento de um modelo animal *knockout* para *SLITRK1* para avaliação de comportamento.

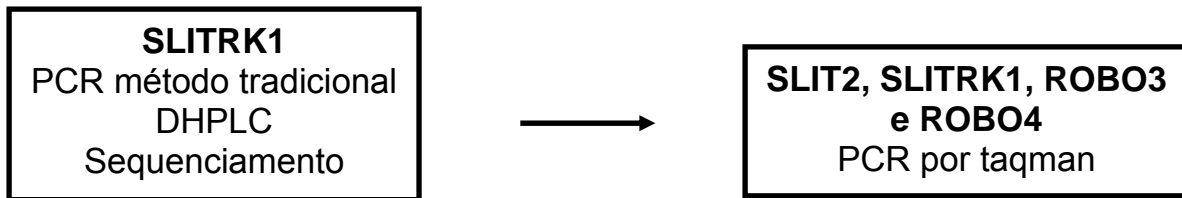
Concordando com essas prerrogativas, estabelecemos nosso estudo de associação do gene *SLITRK1* e genes codificadores de proteínas correlacionadas com a via Slit-robo, na tentativa de elucidar a participação na ST de outros membros da mesma via e ainda vislumbrar os próximos passos a serem seguidos no estudo da correlação entre ST e elementos envolvidos no processo de neurodesenvolvimento.

II. Objetivos

- 1) Investigar, em população composta por trios e famílias com um ou mais indivíduos com diagnóstico de ST, a presença de alterações no gene *SLITRK1*;
- 2) Selecionar genes correlacionados com a via de sinalização de *SLITRK1* que possam estar envolvidos com a etiopatogênese da ST, entre eles os genes *ROBO3*, *ROBO4* e *SLIT2*;
- 3) Selecionar marcadores tagSNPs para representar cada um dos genes, estabelecendo se o conjunto de marcadores selecionados é representativo de todo o gene;
- 4) Determinar o genótipo os indivíduos para os tagSNPs escolhidos;
- 5) Determinar as frequências dos haplótipos na população estudada e investigar associações com o diagnóstico da doença.

III. Material e Métodos

Os métodos utilizados seguem o esquema abaixo:



III.I Amostra estudada

No nosso estudo, a casuística utilizada resultou do trabalho de coleta de amostras e dados, durante cerca de 10 anos, na Clínica de Tourette, do Toronto Western Hospital, Canadá. Essa é uma amostra numericamente importante, constituída por 255 pacientes com diagnóstico de tiques isolados ou ST, e de seus pais. Em algumas famílias foram genotipadas ainda as amostras de irmãos do probando, doentes ou não, num total de 604 indivíduos. Todos os indivíduos foram genotipados para todos os marcadores do nosso estudo.

III.II Diagnóstico Clínico

O critério diagnóstico para a inclusão de um paciente em um estudo de genética deve ser detalhado e o mais acurado possível. Alguns problemas são vivenciados no diagnóstico da ST como: os casos podem ser sutis, os tiques podem ser voluntariamente suprimidos, a doença tem a característica de ser intermitente ou ainda os tiques podem simplesmente não estar presentes durante o momento da avaliação neuro-psiquiátrica (Robertson, 1999).

No nosso estudo, o diagnóstico foi feito pela equipe do Dr. Paul Sandor na Tourette's Clinic no Toronto Western Hospital. Cada paciente e seus familiares foram avaliados clinicamente por grupo experiente no diagnóstico. Para ser

enquadrado no critério de doente, o indivíduo deveria cumprir os critérios do DSM-IV (Anexo 2).

A heterogeneidade clínica dos pacientes e a ausência de instrumentos diagnósticos que mensurem adequadamente a doença vêm sendo entendidas, historicamente, como uma das causas de falha na localização de genes associados com a ST (Robertson, 1999). Nossa população foi avaliada por profissionais experientes, mas ainda assim contamos com as dificuldades particulares da doença e, assim, optamos por usar como dados clínicos apenas o diagnóstico da ST e/ou a presença de tiques isolados. Os pacientes com tics foram incluídos na nossa seleção por serem considerados atualmente parte da mesma doença com diferentes expressões de gravidade (Saccomani, 2005).

III.III Estudo Genotípico

III.III.I Extração de DNA a partir de leucócitos pelo método de NaCl concentrado

A extração de DNA foi realizada por técnicos do laboratório da Dra. Barr, ao longo dos 10 anos de coleta de amostras de sangue. O método de extração encontra-se detalhado no Anexo 1 (Miller e cols., 1988).

III.III.II Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região codificante do gene *SLITRK1* foi dividida em quatro fragmentos entre 500 e 650 pb. Os pares de oligonucleotídeos (*primers*) foram construídos utilizando-se o programa *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e encontram-se em tabela 1:

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados em PCR do gene de *SLITRK1* e as temperaturas de anelamento:

Oligonucleotídeos (pb) 5' →3'	Temperatura de anelamento
<i>SLITRK1</i> -seq1F - gggatgaattgctcgcttta	57°C
<i>SLITRK1</i> -seq1R - agcgttttcagcctgttacc	
<i>SLITRK1</i> seq2F - tgccaacggttccagtatg	61°C
<i>SLITRK1</i> -seq2R - aatcagccaagctgctcac	
<i>SLITRK1</i> -seq3F - aacaggaacgtgagcagctt	58°C
<i>SLITRK1</i> -seq3R - ttccgtggaggctatctgg	
<i>SLITRK1</i> -seq4F - tcaacaacaacctgctgagg	57°C
<i>SLITRK1</i> -seq4R - ctcccctattggggttg	

pb, pares de bases

Cada fragmento foi amplificado a partir das amostras de DNA por reação tradicional de PCR (Mullis e cols., 1986) utilizando-se os oligonucleotídeos da tabela acima (tabela 1). As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos: 95°C por 4 minutos por um ciclo, 95°C por 30 segundos da temperatura de anelamento específica para cada par de oligonucleotídeos, seguidos de 72°C por 40 segundos em 35 ciclos e 72°C por 10 minutos. A amplificação dos fragmentos de PCR foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose e por marcação com brometo de etídio.

III.III.III Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (DHPLC)

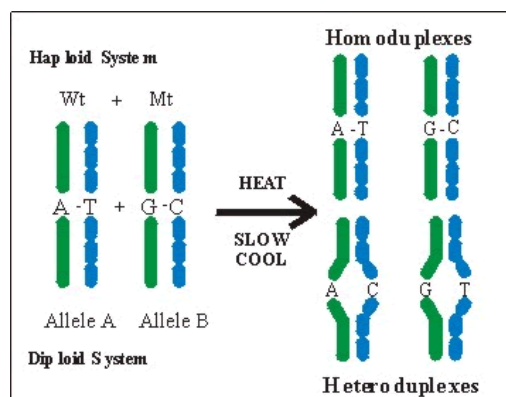
A cromatografia líquida desnaturante de alta-performance ou, simplesmente, DHPLC, é uma técnica de alta acurácia, com mais de 95% de sensibilidade na detecção de novas mutações (Underhill e cols, 1997; O'Donovan e cols., 1998).

A sequência de cada produto de PCR foi submetida à análise pelo programa *DHPLC melting* (<http://insertion.stanford.edu/meltdoc.html>) que define a

temperatura para que haja separação dos dúplex. Os produtos de PCR foram pré-preparados para DHPLC, desnaturados a 94°C por 10 minutos e gradualmente (1°C/min) resfriados para 45°C, gerando produtos finais homodúplex e heterodúplex. Veja esquema abaixo (figura 1):

Figura 1. Mostra a formação dos homo e dos heterodúplex durante resfriamento gradativo após PCR. (figura retirada do site:

www.ncvs.org/ncvs/groups/cmb/dna.html)



Quando submetidos a cromatografia no aparelho de DHPLC (Transgenomic Inc., NE), qualquer mínima diferença entre os homo e os heterodúplex são detectadas. Essas diferenças podem ser novas mutações, polimorfismos ainda não descritos, ou falso-positivos por erro de técnica. Para diferenciação entre essas possibilidades e uma verdadeira mutação, outras técnicas, como o sequenciamento direto e estudos de prevalência da mutação na população, são necessários. No caso das nossas amostras, todas aquelas que mostraram alterações em relação ao padrão cromatográfico das demais foram submetidas a posterior sequenciamento direto. A realização do DHPLC aconteceu no CAMH (Center for Addiction and Mental Health) em projeto de colaboração com Dr. John Vincent.

III.III.IV Escolha dos polimorfismos a serem estudados

Os estudos de associação de genes com doenças vêm sendo desenhados com o objetivo de conseguir-se uma boa cobertura do gene e um custo mais baixo. Um dos métodos que vem sendo utilizado é o baseado em haplótipos, na qual são selecionados polimorfismos representativos de um ou mais haplótipos, os assim denominados "tagSNPs", que são transmitidos junto com os polimorfismos que os representam. Nosso estudo de associação foi desenhado baseado em tagSNPs.

Algumas variáveis numéricas foram estabelecidas para definir o quanto cada tagSNP deve ser representativo de uma região genética. Entre elas as mais importantes são o D' , r^2 e a FAM (*frequência alélica mínima*). O trabalho de Carlson e colaboradores (2004) estabelece que um r^2 maior do que 0,5 propicia uma seleção de tag SNPs com o mínimo do que é considerado representativo do haplótipo e, assim, capazes de estabelecer riscos relacionados com o haplótipo em estudo.

A FAM significa a frequência mínima na qual um alelo pode ser encontrado, sendo que os alelos com FAM maior, por exemplo >40%, são alelos que já estão presentes na população a um número de gerações muito maior que os alelos com FAM < 25%. Considerando-se que, por razões evolutivas e genéticas, um alelo promotor de doença tende a ser mais recente, devemos não ser muito restritivos na escolha da FAM. Entretanto, dependendo do tamanho da região estudada, a restrição da FAM pode vir a ser imperativa para possibilitar a obtenção de dados confiáveis (Jorde, 2005).

Os tagSNPs foram escolhidos através do sítio do Projeto Hapmap (<http://hapmap.org>) a partir da definição de FAM e r^2 seguindo preferencialmente os valores determinados por Gabriel e colaboradores (2002). Para os genes *ROBO3*, *ROBO4*, e *SLITRK1*, foram escolhidos tagSNPs com FAM > 10%; já para o *SLIT2* foram selecionados marcadores para FAM > 25%, enquanto a r^2 utilizada foi maior que 0.8 para os genes *ROBO3*, *ROBO4* e *SLITRK1* e de 0.65 para o gene da *SLIT2*. Outro fator avaliado na seleção dos marcadores foi a disponibilidade dos

ensaios (*assay-on-demand*) na *Applied Biosystems*, medida considerada na otimização do custo.

III.III.V Ensaios de TaqMan

O TaqMan® é um tipo de ensaio fornecido pela ABI (*Applied Biosystems Inc.*, Foster, CA) nas versões *assay-on-demand* e *assay-by-design* constituído por dois pares de oligonucleotídeos: *forward* e *reverse* (oligonucleotídeos na concentração de 900 µM), um marcador - 1 VIC® dye – detecta a presença do alelo 1 (marcadores com concentração final de 200 µM), um marcador 1 6FAM™ dye – detecta a presença do alelo 2 (marcadores com concentração final de 200 µM). Para o gene *SLITRK1* foram construídos cinco ensaios TaqMan com diferentes objetivos: dois foram para verificação das mutações descritas por Abelson e colaboradores (2005), dois outros para investigação de dois tagSNPs e ainda um ensaio para verificação da presença da mutação não-sinônima encontrada no nosso estudo em sequenciamento direto. Para os genes *SLITRK1*, *ROBO3*, *ROBO4* e *SLIT2*, seguem em tabelas abaixo (tabelas 2 a 5), os ensaios utilizados:

Tabela 2 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene da *SLITRK1*

TagSNPs e variantes de <i>SLITRK1</i>	Polimorfismos ou variantes estudados no gene <i>SLITRK1</i>
<i>SLITRK-321</i>	AGTGCCATTTGCGCCATTATTTGTGATC[G/A]GTAGGCAGTTCAGAGCATAAGTTAACTG
<i>SLITRK-indel</i>	CTACTGTAGAGAACAACACTTTCAAGAA[C/-]CTTTTGGACCTCAGGTGGCTATAC
<i>SLITRK-3P</i>	AGAATGAGGTTCTTGTA[T/C]CCACAAAGTGCGATTTTCGGA
<i>rs9546538</i>	ATAAAAGGCTGACGATCTACATAGA[C/T]GCTTATTTAAATGGATTATTTGAT
<i>rs9593835</i>	AAGTGGA AAAAGAGTAATTAATTGG[C/T]TATTGAGGTCTAAGCCAATAAAGTG

Tabela 3 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do *ROBO3*

TagSNPs de <i>ROBO3</i>	Polimorfismos estudados no gene <i>ROBO3</i>
<i>rs11219819</i>	GAAGCGTCAAAGTCTGAGATTCCAG[C/T]CCTGGTTGGTTCAACAGCAACACTT
<i>rs4936957</i>	GGGTAGGCACAGGGAATTTGACAT[C/T]ATGGGAACAGGTAGCCTGCAGAGTA
<i>rs3923890</i>	CCCTGCTGGGTCCTGCCTGTCTTTA[A/T]GTACCTTGACCCTGGTGTCTGTCCT
<i>rs11219821</i>	ATTCTCACATGAATAAAAAGGGTGA[C/T]GGTTAGTAGGGGTGAAGCAGGTGTT
<i>rs4606490</i>	GAGAATGAGGACAAGGGGCTGCCCG[C/T]GGGGCCCTAAGCTCCTCCCCTGAGG
<i>rs3802905</i>	GGAACAGGTGAACCCCAATCTTGGG[C/G]TGTTTCATTGGCAGCCTCCTGGTGCC

Tabela 4 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do *ROBO4*

TagSNPs de <i>ROBO4</i>	Polimorfismos estudados no <i>ROBO4</i>
<i>rs4078483</i>	AGAGAAGAGGCCTGGGCCCTGCTCC[C/G]TGTCACCTTCCATCCTCCCCACAGT
<i>rs4635093</i>	GAACAAGCAGGTCAAGGGGAGTGGG[G/T]GGTACTGGGAGAGCCTGCCAGTTTT
<i>rs6590109</i>	ACTCATCAATGACTAGACTCCCTCC[A/G]TCAAAGTTTCCTTTGGTACTTTGGC
<i>rs12823</i>	TGAGGGCTCCAGGTCAGCTTTGCTC[A/T]AATTTTGTTTTCAATTTGTTTTCACA

Tabela 5 - Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene do *SLIT2*

Tag SNPs de <i>SLIT2</i>	Polimorfismos estudados no gene da <i>SLIT2</i>
<i>rs485909</i>	ATAATGAAATGACTAACAGTTCGTT[A/G]CTAACCACTTTTTCTCTCTCACT
<i>rs4403045</i>	CTTGAAGAGCAAGGGTTAGTAGAAC[C/T]AGGCTCTGGATTTAGTTTTGCATTA
<i>rs556816</i>	TGCAGGCAATTAGAATTGCGTTCTC[A/T]AATTTTCTTCTGAGATCCTCACAAT
<i>rs7655084</i>	TCTACTGCCTTGTCCATATTATTT[G/T]GTGCACATTTCCCTGGCACTCTGG
<i>rs2196476</i>	TTAATCCATTAATCTATTGATGAA[C/T]AGATTCCAGGAAAGCACACACAAAC
<i>rs7668974</i>	TCTTCTCTATGCAATCTTCTTTT[C/T]ATCCTGCCAAGACTTCGTTCTTCT
<i>rs696953</i>	CCAAGTTTTTGGTTCTGGGTTGGGT[A/G]CACCCAGGAAATCTAGAAAAGGTA
<i>rs10026776</i>	CAAATGACATCACTTTTCCCTCCATA[C/T]TCACAGAGCTTTGTGTCTTAGGAAG
<i>rs11733205</i>	CATATAATATCCCTAAGAAAGACA[C/T]CAAGTACCTGGTAAATAGGTAATTT
<i>rs1033111</i>	TTATTACTTTCTATTTTTGTGTCT[C/T]CTATCTCTCTTTGCTTTCTCTTTGT
<i>rs3756147</i>	CTACTTAAAAATTCCATTTTTATAG[C/T]CTAATTATCTTTCTGGACTGAGTTC
<i>rs2168801</i>	TAAGCACTTCATACTAATAACAATG[A/G]TATTTATTTGATGCTTATTTATTGG
<i>rs3775816</i>	CCTTGTTCCAGTGCTTATATGGATC[C/T]GACTACCCTGTCTGCCTCAAATG
<i>rs2292441</i>	AAGCAGTAACAACACTTTTACATAA[C/G]GTAATCTTCACATGATTTCATGCA
<i>rs3775825</i>	TCTGGATATGCTTGATCTGAATACA[A/G]TTGAGTCACTTTGCCTGTTATTTT
<i>rs2446087</i>	ATTTCCATTGCTACATTAAGTA[C/T]ATGAGATTCTATAGTCATTAATGT
<i>rs9993853</i>	AATATTTCTTTTGTGTCAATCACAT[A/G]TGCTAGGTGATTTATACATTATATA
<i>rs17621372</i>	TGAAAAGATTGACTCAGAATAATTC[C/T]TGATTTTATGATAGCCATTGAAA
<i>rs6816854</i>	TTATGAAATGACTTTCTTTTATAGC[C/T]ATAAGATGATTTCCCATGCAACAAA

A reação de PCR foi preparada com 1µL de DNA; 0,1µL do ensaio de TaqMan e 3,9µL de *green ou red mix*, num total de 5µL de reação de PCR por amostra. As reações foram feitas em placas de reações para 96 amostras, sendo realizados para cada 94 amostras dois controles negativos. A reação de PCR (*polimerase chain reaction*) foi realizada com um ciclo de 5 minutos de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de anelamento e extensão cada um deles com 30 e 15 segundos, respectivamente, em termocicladora convencional (ThermoHybaid). Para alguns ensaios foram necessários 10-15 ciclos complementares.

Os produtos das reações de PCR foram analisados em equipamento de PCR em tempo real (ABI 7900, Applied Biosystems) no modo de discriminação de alelos.

III.III.VI Sequenciamento automático

Todas as amostras submetidas a DHPLC, que apresentaram alteração do padrão cromatográfico quando comparadas aos controles, foram submetidas a sequenciamento direto. O sequenciamento foi realizado pela empresa ACGT Corporation (Toronto, Canadá), da qual recebemos os resultados no formato de cromatogramas.

III.IV Análise estatística

Na análise dos dados de associação usamos o TDT (*Transmission Disequilibrium Test*) com a finalidade de testar a hipótese nula de que o marcador não está associado com a doença. A distorção de transmissão estima o desvio da transmissão de alelos dos esperados 50:50 na herança dos alelos parentais. No TDT, o número de transmissões de um alelo proveniente de pais exclusivamente heterozigotos é comparado ao número de vezes que o alelo alternativo é transmitido (Sham & Curtis, 1995; Havill & Dyer, 2005). Foi usado para análise dos nossos dados o TDT implementado no programa UNPHASED v2.404 ou 3.03 (Dudbridge, 2003), tanto nas análises de alelos isolados, quanto nas combinações de haplótipos.

Para análise de multialélica é necessária correção para múltiplos testes. O método de correção para múltiplos testes escolhido foi permutação (1000 permutações) realizadas por meio do programa TDTphase (Balding, 2006). O método de correção descrito por Bonferroni (1936) foi utilizado apenas para correção de análise de haplótipos do gene da *SLIT2*, apenas pela impossibilidade de usar a permutação.

Dados de r^2 e D' foram calculados usando o programa Haploview v2.03 assim como as figuras de *linkage disequilibrium* (Barrett, 2005). A transmissão dos

haplótipos foi analisada usando o programa TRANSMIT (Clayton, 1999) com a opção de estimativa de variância robusta para os genes *ROBO3* e *ROBO4* e os dados de transmissão de haplótipos foram obtidos a partir do uso do programa UNPHASED (v3.03) para os genes *SLITRK1* e *SLIT2*.

IV. Resultados

IV.1 Gene *SLITRK1*

Na tentativa de replicar os achados de Abelson e colaboradores (2005) relativos ao gene da *SLITRK1*, investigamos quanto à presença das mutações que haviam sido descritas; entretanto essas mutações não foram encontradas em nossa amostra.

Submetemos nossos 155 probandos a *screening* por DHPLC da região codificante do gene *SLITRK1*. Três variantes foram identificadas, apresentado dois picos no cromatograma, onde as amostras controle, nas mesmas condições cromatográficas, apresentaram apenas um pico (Figura 2A). As amostras que apresentaram variantes foram sequenciadas e três mutações foram encontradas em produtos de PCR de três pacientes não-relacionados.

As mutações encontradas foram troca de adenina por guanina na posição 196 (A196G) do mRNA na amostra 8041-3, troca de timina por citosina na posição 1917 (A1917G) na amostra 8013-3 e troca de adenina por guanina na amostra 892-3 na posição 1190 (A1190G); todas apresentavam-se em heterozigose. As mutações A196G e T1917C são sinônimas e codificam para leucina (códon CTG/CTA e CTT/CTC, respectivamente). A mutação A1190G leva a troca do aminoácido ácido aspártico para glicina (códon GAT e GGT) em parte da proteína expressa.

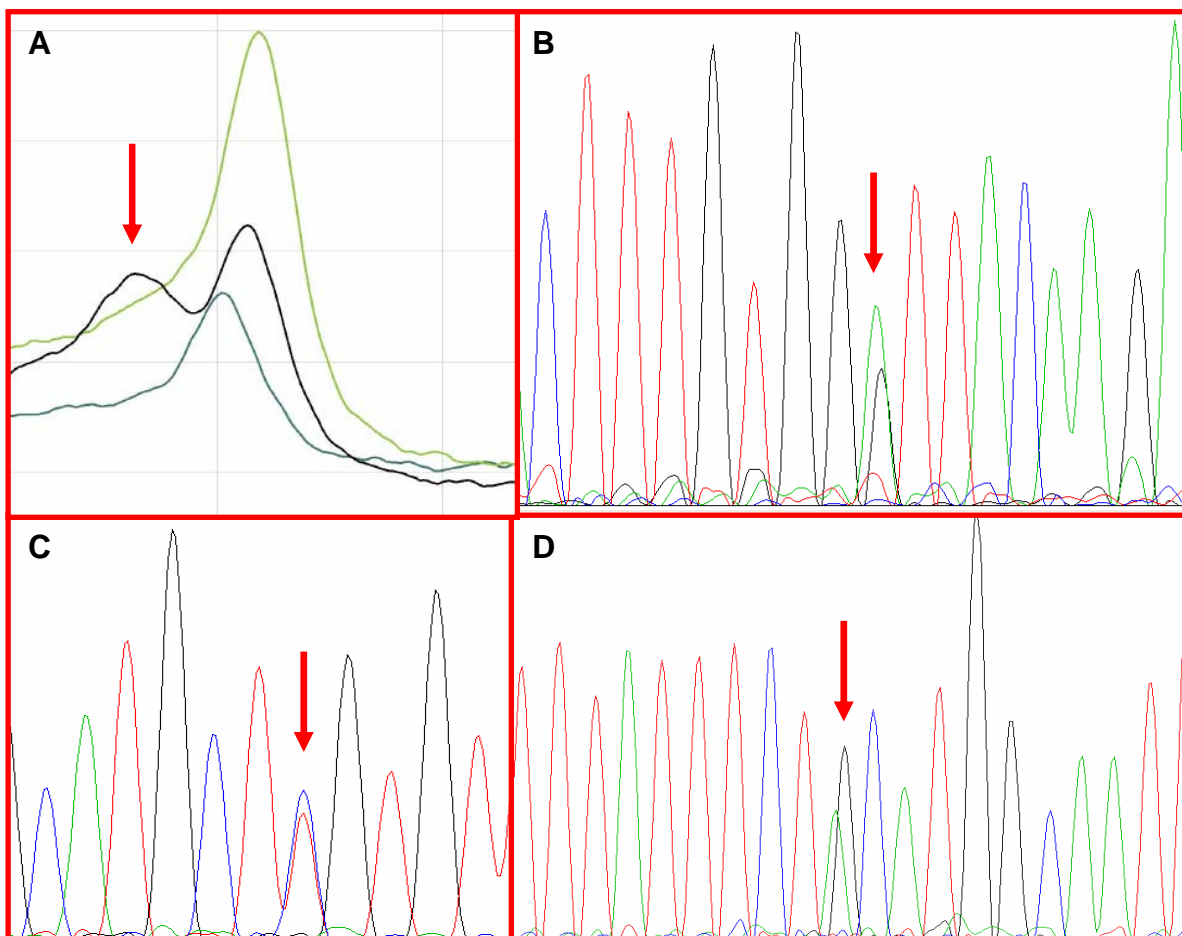


Figura 2. Resultados gráficos de DHPLC e de sequenciamento. **A-** A seta aponta o segundo pico presente na amostra 892-3 diferente dos demais gráficos das amostras. **B-** Cromatograma gerado em sequenciamento apresentando heteroziguidade de G/T. **C e D-** As sequências de C e D são alterações sinônimas, das amostras 8013-3 e 8041-3, respectivamente mostrando as mutações C/T e A/G ambas sinônimas.

Para verificar se a variante não-sinônima não estava presente em outros indivíduos da nossa amostra, construímos marcador para sua identificação. Encontramos a presença da mesma alteração somente no pai do probando. O pai do probando está classificado no database como não afetado para ST ou tiques. Foi feita tentativa de reavaliação clínica do pai do probando, até o presente momento sem sucesso.

Com o achado de mutação, procuramos estabelecer associação entre o gene e a doença, a partir do estudo com tagSNPs. Para isso utilizamos dois tagSNPs cuja genotipagem não apresentou alteração do padrão de transmissão de alelos e não mostrou associação com a Síndrome de Tourette (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de TDT do gene *SLITRK1*

Polimorfismo	Alelo	Frequência de alelos	Transmitido	Não Transmitido	TDT
<i>rs9546538</i>	C	0,3352	78	100	LRS = 3,77024
	T	0,6648	188	165	DF = 1 p = 0,052
<i>rs9593835</i>	C	0,2728	104	126	LRS = 2,973 DF
	T	0,7271	318	295	= 1 p = 0,08466

Tabela 7 - Desequilíbrio de ligação entre marcadores usados nos estudos do gene *SLITRK1*:

	<i>rs9546538</i>	<i>rs9593835</i>
<i>rs9546538</i>		0,92
<i>rs9593835</i>	0,73	

Valores de D' são mostrados na metade superior da tabela e r^2 na metade inferior da tabela

Dessa forma concluímos que o gene da *SLITRK1* não é um gene de maior participação na ST podendo estar alterado em apenas uma única família do nosso estudo dentre 155 famílias.

IV.II Genes *ROBO3* e *ROBO4*

No estudo dos genes *ROBO3* e *ROBO4* foram estudados seis e quatro marcadores, respectivamente, num total de 155 famílias com 255 indivíduos

doentes. Esses marcadores propiciaram uma adequada representatividade dos haplótipos e boa cobertura dos dois genes (Tabelas 9 e 11).

Os resultados das análises de TDT dos marcadores estudados são mostrados nas tabelas 8 e 10. Não tendo sido encontrada diferença na transmissão de alelos entre a população controle e a população afetada. O desequilíbrio de ligação entre os marcadores (Tabelas 9 e 11 e figuras 3 e 4) apresenta um forte desequilíbrio de ligação nesses genes na nossa amostra coincidindo com o apresentado nos dados do Hapmap (www.hapmap.org). Na avaliação de associação entre as possíveis combinações de haplótipos e a doença não foi observada associação entre os haplótipos e a doença tanto no gene *ROBO3* quanto no *ROBO4*.

Tabela 8 - Análise de TDT do gene *ROBO3*

Polimorfismo	Alelo	Frequência de alelos	Transmitidos	Não-Transmitidos	χ^2	Valor de p
rs11219819	C	0,75	62	52	0,877	0,349
	T	0,24	52	62		
rs4936957	C	0,64	78	69	0,551	0,457
	T	0,32	69	78		
rs3923890	A	0,31	76	69	0,338	0,561
	T	0,69	69	76		
rs11219821	C	0,54	89	84	0,145	0,703
	T	0,45	84	89		
rs4606490	C	0,44	83	82	0,006	0,938
	T	0,55	82	83		
rs3802905	C	0,62	81	77	0,101	0,750
	G	0,38	77	81		

Tabela 9 Desequilíbrio de ligação entre marcadores usados nos estudos do gene *ROBO3*

	rs11219821	rs4936957	rs3923890	rs11219821	rs4606490	rs3802905
rs11219821		0,27	0,30	0,60	0,32	0,88
rs4936957	0,05		0,92	0,96	0,83	0,87
rs3923890	0,07	0,78		0,96	0,97	0,93
rs11219821	0,10	0,37	0,34		0,97	0,88
rs4606490	0,04	0,43	0,53	0,61		0,91
rs3802905	0,16	0,23	0,24	0,58	0,41	

Valores de D' são mostrados na metade superior da tabela e r^2 na metade inferior da tabela

Figura 3. Representação gráfica do Desequilíbrio de Ligação do gene *ROBO3* construída com os nossos dados e gerada apartir da utilização do Haploview (Barrett, 2005). A intensidade do vermelho é representativa de alto desequilíbrio de ligação entre os marcadores, enquanto as tonalidades rosa indicam menor desequilíbrio de ligação.

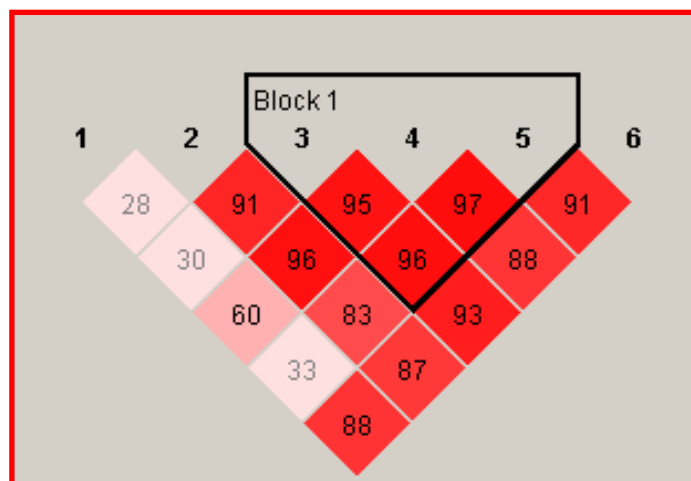


Tabela 10 – Análise de TDT do gene *ROBO4*

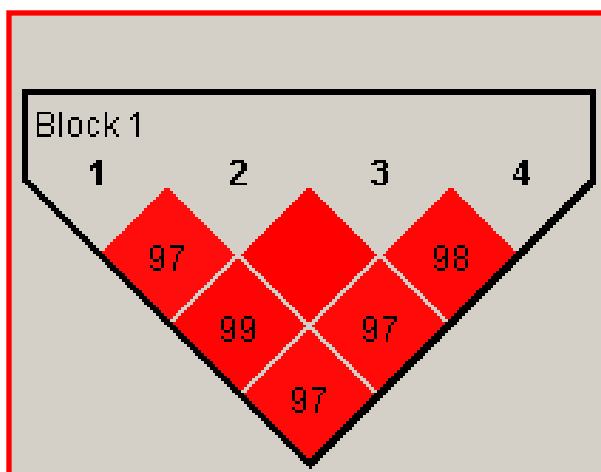
Polimorfismo	Alelo	Frequência do alelo	Transmitidos	Não- Transmitidos	χ^2	p-valor
rs4078483	C	0,306	44	42	0,048	0,826
	G	0,694	42	44		
rs4635093	G	0,298	33	30	0,143	0,705
	T	0,702	30	33		
rs6590109	A	0,667	55	46	0,516	0,472
	G	0,333	46	55		
rs12823	A	0,350	37	30	0,731	0,392
	T	0,650	30	37		

Tabela 11 - Desequilíbrio de ligação entre os marcadores usados no estudo do gene *ROBO4*

	rs4078483	rs4635093	rs6590109	rs12823
rs4078483		0,97	0,99	0,98
rs4635093	0,19		1,0	0,98
rs6590109	0,84	0,21		0,98
rs12823	0,22	0,23	0,26	

Valores de D' são mostrados na metade superior da tabela e r^2 na metade inferior da tabela

Figura 4. Representação gráfica do Desequilíbrio de Ligação do gene *ROBO4* construída com os nossos dados e gerada a partir da utilização do Haploview (Barrett, 2005).



IV.III Gene *SLIT2*

O gene *SLIT2* foi estudado em 155 famílias com 19 tagSNPs, tendo sido selecionados marcadores com um r^2 de 0,65 e a FAM >25% devido ao tamanho do gene. Apesar de estudarmos 19 tagSNPs, o gene continuou apresentando uma cobertura insuficiente (figura 5). Entretanto, foram identificados marcadores com diferença de transmissão entre as populações de casos e controles (tabela 12). Os marcadores 7 e 9 são os que apresentam positividade quando avaliados individualmente e quando submetidos a TDT com 1000 permutações mantiveram $p = 0,04$.

Tabela 12 Análise do TDTphase no gene *SLIT2*

Polimorfismo #	Alelo	Frequência do alelo	Transmitidos	Não-transmitidos	LDS	p-value
#1 - 6828rs7655084	G	0,30	121	115	0,14	0,69
	T	0,69	277	282		
#2 - 1528rs2196476	A	0,28	119	144	3,43	0,06
	G	0,71	299	273		
#3 - 8974rs7668974	C	0,60	252	274	2,53	0,11
	T	0,39	164	141		
#4 - 6172rs696953	A	0,41	172	152	1,81	0,17
	C	0,58	242	261		
#5 - 3045rs4403045	T	0,25	102	123	2,66	0,10
	C	0,74	302	280		
#6 - 6776rs10026776	G	0,46	192	216	2,73	0,09
	A	0,53	224	199		
#7 - 9845rs11733205	C	0,32	111	137	3,94	0,04
	T	0,67	233	206		
#8 - 5030rs1033111	C	0,63	261	248	0,73	0,39
	T	0,36	151	163		
#9 - 8261rs3756147	C	0,64	259	229	4,17	0,04
	T	0,35	145	174		
#10 - 5909rs485909	A	0,53	218	215	0,04	0,83
	G	0,46	192	195		
#11 - 6816rs556816	T	0,45	175	181	0,21	0,64
	A	0,54	207	200		
#12 - 3207rs2168801	A	0,34	141	136	0,09	0,76
	G	0,65	265	269		
#13 - 6854rs6816854	C	0,50	194	204	0,48	0,48
	T	0,49	192	181		
#14 - 5816rs3775816	G	0,39	160	168	0,35	0,55
	A	0,60	246	237		
#15 - 8063rs2292441	C	0,69	295	281	0,97	0,32
	G	0,30	127	140		
#16 - 9534rs3775825	A	0,48	199	183	1,07	0,30
	G	0,51	215	230		
#17 - 6561rs2446087	A	0,31	131	133	0,03	0,85
	G	0,68	283	280		
#18 - 9485rs9993853	A	0,67	269	291	2,79	0,09
	G	0,32	131	108		
#19 - 3874rs17621372	C	0,4	160	154	0,15	0,69
	T	0,6	240	245		

O primeiro alelo é o alelo identificado como alelo 1 na análise de combinação de alelos e o segundo alelo é o alelo 2 na análise de combinação de alelos em todos os marcadores.

A análise de herança de haplótipos apresentou vários dados positivos, mas discuto apenas os que foram repetidamente positivos em diferentes combinações de alelos e ainda apresentaram coerência na conferência de risco ou de proteção em relação ao alelo herdado. Entretanto, todos os dados positivos estão na tabela 13 e a análise feita com todas as 170 diferentes combinações de alelos estão disponíveis em CD no anexo 3 incluindo todos os dados negativos.

As alterações que se repetem em pelo menos duas combinações de haplótipos e que parecem inferir risco ou proteção para a doença seguem abaixo.

A presença do alelo 2 do marcador 2 (1528) confere aumento do risco para desenvolver a doença quando combinado com dois outros alelos. O alelo 1 do marcador 5 (3045) confere proteção em duas combinações de alelos.

O marcador 7 (9845) apresenta dois diferentes componentes quando analisada a herança dos seus dois alelos, a herança do alelo 1 confere proteção e o alelo 2 confere risco nas suas combinações com outros alelos.

O alelo 2 do marcador 6 (6776) confere risco em dois haplótipos diferentes. O marcador 9 (8261), assim como o 7, apresenta dado positivo quando avaliada a diferença de transmissão de alelos entre os controles e os casos. Na análise dos haplótipos o alelo 1 infere aumento do risco e o alelo 2 confere proteção.

A presença do alelo 2 do marcador 12 (3207) em três combinações de alelos confere proteção, inclusive quando combinado com o alelo 2 do marcador 7 anula o risco inferido por esse outro alelo.

A presença do alelo 2 do marcador 18 (9485) confere aumento do risco em até duas vezes mais risco nas diferentes combinações de alelos.

Por fim, a presença do alelo 1 do marcador 13 (6854) confere proteção nos diferentes arranjos de alelos.

Para essas análises de combinação de alelos não foram feitas permutações pelo fato de que não houve disponibilidade de computadores com capacidade para realização dos cálculos gerados. Dessa forma foi optado por fazer uso da correção de Bonferroni, mesmo sabendo que não é o método mais adequado para esse tipo de estudo, como discutido posteriormente.

A correção de Bonferroni (Bonferroni, 1936) gerou um novo valor de p , passando a ser considerado positivo apenas os resultados com $p < 0,00016$. No caso todos os nossos resultados de análise de haplótipos seriam entendidos como negativos a partir dessa correção.

Enfatizando o caráter restritivo dessa correção, optamos por valorizar os achados relacionados com os alelos dos marcadores 7 e 9, pelo fato de que são marcadores associados com a doença e que repetidas vezes apresentam alterações em diferentes combinações de haplótipos herdados.

Dessa forma os marcadores 7 e 9, que representam dois diferentes tagSNPs do gene SLIT2, mostram-se associados com a doença e com a possibilidade de terem alelos que quando herdados inferem risco ou proteção à ST.

Tabela 13: Análise de combinação de haplótipos no gene da SLIT2 obtida a partir do uso do programa UNPHASED.

Marcadores testados: 2 6						
TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS						
Likelihood ratio chisq = 10,52 df = 3 p-value = <u>0,0146</u>						
ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS						
Haplótipo de Referência: 1-1						
Haplótipos	Casos	Controles	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
2-2	173,7	125,1	0,3678	1,45	7,82	<u>0,0051</u>
Marcadores testados: 2 7						
TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS						
Likelihood ratio chisq = 10,78 df = 3 p-value = <u>0,013</u>						
ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS						
Haplótipo de Referência: 1-1						
Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RelRisk	Chisq	P-value
2-2	197	143,2	0,4254	1,643	9,381	<u>0,0021</u>
Marcadores testados: 2 18						
TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS						
Likelihood ratio chisq = 8,79 df = 3 p-value = <u>0,0322</u>						
ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS						
Haplótipo de Referência: 1-1						
Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
1-1	80,68	118,6	0,2198	1	6,996	<u>0,0081</u>
1-2	40,52	28,66	0,0946	2,097	4,253	0,2434
Marcadores testados: 3 9						
TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS						
Likelihood ratio chisq = 7,871 df = 3 p-value = <u>0,0487</u>						
ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS						
Haplótipo de Referência: 1-1						
Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
1-2	84,73	113	0,2201	0,7194	6,535	<u>0,0105</u>
2-1	101,5	75,82	0,1895	1,375	4,786	<u>0,0286</u>
Marcadores testados: 5 12						
TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS						
Likelihood ratio chisq = 8,941 df = 3 p-value = <u>0,0300</u>						
ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS						
Haplótipo de Referência: 1-1						
Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
1-2	69,93	106,3	0,2037	0,4426	5,485	<u>0,0191</u>

Marcadores testados: 5 13

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 8,922 df = 3 p-value = 0,0303

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

1-1 54,86 92,93 0,167 1 5,865 0,01541-2 49,6 36,5 0,117 2,337 4,532 0,5839**Marcadores testados: 6 18**

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 7,914 df = 3 p-value = 0,0478

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

2-2 78,32 46,42 0,138 1,995 6,433 0,0112**Marcadores testados: 7 9**

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 9,72 df = 3 p-value = 0,0211

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

1-2 42,04 69,19 0,1122 0,6437 6,722 0,00952-1 173,7 136,5 0,3956 1,406 5,671 0,0172**Marcadores testados: 7 12**

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 15,78 df = 3 p-value = 0,0012

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

1-2 83,21 137,3 0,2622 0,397 7,174 0,00732-2 188,1 137,2 0,4176 0,8468 6,438 0,0111**Marcadores testados: 7 13**

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 11,56 df = 3 p-value = 0,0090

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

1-1 62,81 109,2 0,2035 1 6,775 0,00921-2 66,28 50,61 0,1649 2,122 0,369 0,5435**Marcadores testados: 7 18**

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 10,83 df = 3 p-value = 0,0126

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype Caso Controle FreqPop RiscRel Chisq P-value

2-2 93,61 54,36 0,1718 2,142 8,115 0,0043

Marcadores testados: 8 11

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 11,52 df = 3 p-value = 0,0092

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
1-2	154,7	116,7	0,3255	1,769	5,852	<u>0,0155</u>

Marcadores testados: 9 13

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 13,83 df = 3 p-value = 0,0031

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
2-1	60,62	103	0,1826	0,3945	11,94	<u>0,0005</u>

Marcadores testados: 9 14

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 8,956 df = 3 p-value = 0,0298

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
2-1	44,97	77,09	0,1336	0,4444	9,871	<u>0,0016</u>

Marcadores testados: 9 18

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

Likelihood ratio chisq = 10,22 df = 3 p-value = 0,0168

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
2-1	84,06	126,7	0,2388	0,5798	8,528	<u>0,0034</u>

Marcadores testados: 13 18

TESTE DE ASSOCIAÇÃO DE ALELOS

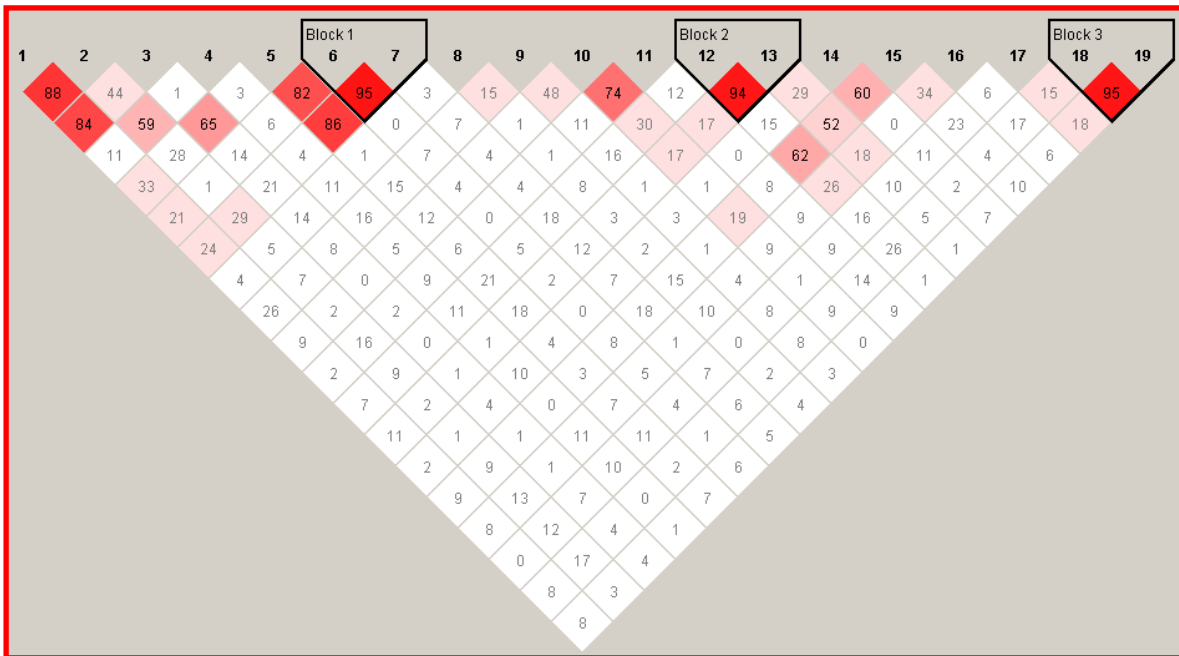
Likelihood ratio chisq = 9,529 df = 3 p-value = 0,0230

ESTIMATIVA DOS EFEITOS DOS ALELOS

Haplótipo de Referência: 1-1

Haplotype	Caso	Controle	FreqPop	RiscRel	Chisq	P-value
2-2	78,35	42,07	0,1309	1,791	6,657	<u>0,0098</u>

Figura 5. Representação gráfica do Dequilíbrio de ligação de SLIT2 com os dados obtidos a partir do uso de 19 marcadores gerada pelo Haploview (Barrett, 2005)



V. Discussão

Nosso estudo foi o primeiro a investigar outros genes correlacionados com a proteína SLITRK1. A hipótese neurobiológica de envolvimento de *SLITRK1* na Síndrome de Tourette foi associada com a informação de estudos de ligação e de expressão. Considerando que conseguimos encontrar nova mutação no gene da *SLITRK1* e estabelecemos a associação entre ST e o polimorfismos do gene da *SLIT2*, a nossa estratégia de estudo mostrou-se adequada.

Em relação ao gene da *SLITRK1*, não encontramos as mutações descritas por Abelson e colaboradores (2005) em nossa amostra; entretanto foi encontrada uma mutação não-sinônima e duas outras variantes sinônimas na região codificante do gene *SLITRK1*. Essas variantes sinônimas podem ser mutações ou polimorfismos ainda não descritos, uma vez que não foi investigada a sua presença na população geral. Por não produzir alteração funcional na proteína, não priorizamos a investigação desses polimorfismos na população de indivíduos com ST.

A mutação em *frameshift* do gene *SLITRK1* descrita por Abelson e colaboradores (2005) promove, quando expresso o gene mutante em células em cultura, a redução dos dendritos se comparada com a expressão do gene regular. Assim como essa mutação em *frameshift*, a mutação não-sinônima descrita no nosso trabalho também está em região codificante, entretanto essa mutação não leva a mudança de janela de leitura, sendo apenas uma troca pontual de aminoácido. Apesar de não terem sido feitos experimentos funcionais quanto a nova proteína gerada, podemos prever que é provável uma perda, pelo menos parcial, de função da proteína ou modificação das suas características secundárias e terciárias.

O achado de que mutações diferentes em um mesmo gene (no caso no gene *SLITRK1*) produzindo um mesmo fenótipo, não é raro e encontra-se presente em outras doenças, tais como fibrose cística, diabetes insípido nefrogênico, etc. Confirmada a existência de mutações no gene *SLITRK1* em pacientes com ST, procuramos determinar a frequência da mutação em nossa população e encontramos sua presença em um pequeno número de pacientes com ST, cerca 0,7% dos nossos indivíduos afetados, mantendo proporção

aproximada à estimada por Grados e Walkup (2006). Essa baixa frequência talvez seja a explicação porque não encontramos associação entre o gene e a ST quando os tagSNPs foram utilizados (Evans e cols., 2006). Outros fatores poderiam explicar não ter sido estabelecida associação entre o gene *SLITRK1* e a ST. Um desses fatores é a distância entre os marcadores. Os marcadores utilizados no estudo do gene de *SLITRK1* foram selecionados por serem os mais próximos e com frequência alélica maior que 5% na população caucasiana, mas ainda assim estão na distância de +1,5Kb e - 2,5Kb da região de codificação do gene de interesse. Entretanto estão em forte equilíbrio de ligação, podendo ser realmente considerados representativos desse gene.

Uma outra possibilidade diferente dessa questão metodológica, é a possibilidade dessa mutação não estar associada com a doença e sim ser um variante muito raro na população encontrado ao acaso no nosso paciente e no estudo de Abelson e colaboradores (2005). Conta a favor dessa hipótese, o fato do pai do probando também carreador da mesma mutação, não apresentar fenótipo doente, mas nesse ponto podemos especular que a ST apresenta clínica variável e que pode ser discreta em alguns casos, podendo ser esse o caso desse indivíduo. Acredito que uma reavaliação clínica cuidadosa seria imperativa para uma melhor caracterização, entretanto até o presente momento essa avaliação não foi possível. Contra essa hipótese está o fato de que as populações controle do trabalho de Abelson e colaboradores (2005), assim como a nossa não apresentou a mutação ou seja mais de 4300 cromossomos controles foram avaliados e não foi encontrada a mutação. Entretanto, persiste a certeza de que a associação entre o gene da *SLITRK1* e a ST virá na medida que o dado for sendo replicado e se mostrar coerente, quanto a associação, pelo menos numa pequena parcela dos pacientes com ST.

O poder estatístico de um estudo baseado em desequilíbrio de ligação é afetado pelo método utilizado, pelo número de amostras, pelo modo de herança, pelo padrão de recombinação, pela região de mutação, pela idade da mutação, pelo grau de heterogeneidade de locus e de alelos, o tipo de marcadores do ensaio e aspectos da história da população (Jorde, 2005). Por causa dessa

complexidade, nenhuma técnica possui ótimo poder estatístico para todas as circunstâncias. O poder estatístico tende a ser maior quando uma doença é determinada por um único gene e uma única mutação, que responde por uma parcela importante da população doente e que aparece em um haplótipo usualmente incomum, exatamente o contrário das características da Síndrome de Tourette. Dessa forma nosso estudo de associação baseado em tagSNPs não se mostrou uma boa alternativa para investigação de associação entre *SLITRK1* e ST.

Os genes *ROBO3* e *ROBO4* foram escolhidos principalmente devido a sua localização no cromossomo 11, em sítio apontado por dois estudos de *linkage* diferentes (Merette e cols, 2000; Simonic e cols, 2001) e distante duas megabases (2 Mb) do marcador associado de modo mais significativo à ST (Simonic e cols, 2001). Nós não encontramos associação entre os genes *ROBO3* e *ROBO4* com ST, mas a região cromossômica continua uma interessante região para busca de genes candidatos na Síndrome de Tourette.

Em relação a investigação de associação do gene *SLIT2* com a ST, tivemos as dificuldades próprias de estudo de um gene grande, como custo dos experimentos e uso de múltiplos testes estatísticos. Para viabilização do projeto inicialmente determinamos no nosso planejamento uma $r^2 > 0,65$ e uma FAM > 20%, dessa forma utilizamos valores pouco superiores ao estabelecido por Carlson e colaboradores (2004) como mínimo r^2 e selecionamos uma FAM que informa sobre mutações mais antigas na população. Depois do estudo inicial com dez marcadores, as análises preliminares mostravam fraco desequilíbrio de ligação entre os marcadores e vários marcadores positivos mediante análises de TDT. Selecionamos mais marcadores próximos às regiões que apresentavam marcadores positivos. Com essa medida aumentamos a nossa chance de ter ainda mais dados positivos, o que poderia ser decorrente do uso de múltiplos testes, mas ao mesmo tempo foi a única possibilidade de aumentarmos o desequilíbrio de ligação entre os marcadores e conseqüentemente propiciarmos uma cobertura mínima do gene e ao mesmo tempo tentar identificar regiões com

mais de um marcador positivo. A presença de mais de um marcador positivo na mesma região do gene reforçaria a hipótese de real associação.

Testes múltiplos são tema polêmico em estudos de associação especialmente no que se refere à sua correção. Nesse campo, uma das poucas concordâncias é que o grande número de testes faz crescer a possibilidade de obtenção de falsos-positivos. Diante de muitos marcadores para *SLIT2* procuramos formas de efetuar o melhor meio de correção para múltiplos testes (Havill & Dyer, 2005). Uma das estratégias apontadas pela literatura é reduzir ao máximo o número de testes aos quais a amostra é submetida e ainda aplicar correções para múltiplos testes, dentre elas a correção de Bonferroni (Bonferroni, 1936). No caso do nosso estudo submetemos nossa amostra à genotipagem de 19 tagSNPs para o gene da *SLIT2* e na análise dos marcadores foi feito TDT pelo programa UNPHASED com 1000 permutações, com correção do melhor valor de p . As permutações evitam os efeitos de múltiplos testes (Balding, 2006) e, após correção por meio de permutações, nossos marcadores com p de 0,04 continuaram com p de 0,04, não tendo alterado seu valor.

Outra possibilidade apontada pela literatura é a correção de Bonferroni, na qual o nível de significância (ex, $p < 0,05$) é dividido pelo número de testes aos quais a amostra é submetida, no nosso caso seriam considerados positivos os marcadores com $p < 0,00016$. A correção de Bonferroni apesar de ser usada frequentemente na literatura, apresenta dois grandes problemas para ser utilizada na nossa análise. O primeiro deles é o fato de que é adequada para correção de testes completamente independentes e o segundo é que em uma doença como a ST, aparentemente poligênica, podemos não detectar uma verdadeira associação quando usamos um teste muito restritivo como a correção de Bonferroni (Balding, 2006). Considerando que os haplótipos estão em desequilíbrio de ligação e com isso os testes não são independentes, a correção de Bonferroni não parece ser a melhor alternativa para correção para múltiplos testes em genética. Entretanto, a análise de associação de haplótipos de *SLIT2* e a Síndrome de Tourette foi realizada pelo programa UNPHASED, assim como para os demais genes, mas dessa vez devido ao volume de dados a serem analisados, a

instituição onde foi desenvolvida a análise dos dados não contava com capacidade computacional para realização de permutações. Como na análise de haplótipos foram feitos 170 diferentes testes era imperativa a correção para múltiplos testes e na dificuldade de realizar permutações submetemos nosso dado à correção de Bonferroni. Essa correção foi feita, mas não sem enfatizar todas as suas desvantagens do seu uso nesse tipo de estudo e resultou na anulação dos dados positivos da análise inicial de haplótipos. Como resultado final do gene da *SLIT2* persistiram positivos, mesmos após permutação, o achado de associação dos marcadores 7 e 9 com a ST. Coincidentemente esses marcadores foram os que apresentaram mais frequentemente alteração na predisposição à doença quando feita análise de haplótipos, mas como já dito esses dados foram considerados negativos após correção com Bonferroni. Considerando que o método de Bonferroni não foi adequado e o de permutações não foi possível, a análise de haplótipos de genes como o *SLIT2*, para ser adequada, precisa de outras alternativas mais sólidas para correção de múltiplos testes, o que a literatura ainda não apresenta, ou pelo menos de programas mais robustos para realização de permutações.

Na introdução discutimos sobre as hipóteses neurobiológicas que vem sendo seguidas na busca de genes candidatos na ST. A hipótese de associação com genes relacionados com neurotransmissão foi até o presente momento a mais explorada, entretanto não mostra dados amplamente reproduzidos e tão pouco que consigam justificar a presença da ST. A hipótese imunológica ainda não apresenta substrato na literatura que justifique a pesquisa de mais genes de fatores imunológicos envolvidos na ST, sendo necesssário melhor estabelecer a presença de alterações imunes na ST para então secundariamente abrir a perspectiva de estudo de genes.

Por fim, a hipótese de associação com fatores envolvidos no neurodesenvolvimento apesar de em fase inicial e precisando de replicações e estudos funcionais, diante do achado de mais uma mutação no gene da *SLITRK1* e de associação de polimorfismos do gene da *SLIT2* com a ST, reafirmamos que genes de proteínas envolvidas no direcionamento axonal são bons genes

candidatos na Síndrome de Tourette, principalmente quando somados com informação dos estudos de linkage.

VI. Bibliografia

Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LS 4th, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science*. 2005;310:317-20

Albin RL, Mink JW. Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci*. 2006; 29:175-82.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4^o edition DSM-IV-TR. Washington (DC): American Psychiatric Association, 2000.

Aruga J, Mikoshiba K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*. 2003a; 24: 117-29.

Aruga J, Yokota N, Mikoshiba K, Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene*. 2003b; 315: 87-94.

Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006; 7: 781-91

Barr CL, Sandor P. Current status of genetic studies of Gilles de la Tourette syndrome. *Can J Psychiatry*. 1998; 43: 351-7.

Barr CL, Wigg KG, Pakstis AJ, Kurlan R, Pauls D, Kidd KK, Tsui LC, Sandor P, Genome scan for linkage to Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Med Genet*. 1999; 88:437-45.

Barr CL. 2005: Progress in Gene Localization. In Kurlan R (ed) Handbook of Tourette's Syndrome and Related Tic and Behavioral Disorders. New York, NY: Marcel Dekker Inc. pg379-398.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21: 263-5.

Bloch MH, Peterson BS, Scahill L, Otko J, Katsoyich L, Zhang H, Leckman JF. Adulthood outcome of tic and obsessive-compulsive symptom severity in children with Tourette syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006; 160: 65-9.

Bonferroni, CE. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilit `a, *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze*. 1936; 8, 3 – 62.

Boghossian-Sell L, Comings DE, Overhauser J. Tourette syndrome in a pedigree with a 7;18 translocation: identification of a YAC spanning the translocation breakpoint at 18q22.3. *Am J Hum Genet*. 1996; 59: 999-1005.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*. 1999; 96: 795-806.

Bull SB, John S, Briollais L. Fine mapping by linkage and association in nuclear family and case-control designs. *Genet Epidemiol*. 2005; 29: S48-58.

Burd L, Severud R, Klug MG, Kerbeshian J. Prenatal and perinatal risk factors for Tourette disorder. *J Perinat Med*. 1999; 27: 295-302.

Caine ED, Weitkamp LR, Chiverton P, Guttormsen S, Yagnow R, Hempfling S, Kennelly D. Tourette syndrome and HLA. *J Neurol Sci*. 1985; 69: 201-6.

Clayton D. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *Am J Hum Genet.* 1999; 65:1170-7.

Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 2004 ;74: 106-20.

de la Tourette, G. Etude sur une affection nerveuse, caracterisee par l'incoordination motrice accompagnee de l'echolalie et de coprolalie. *Arch Neurol.*1885; 9: 158-200.

Diaz-Anzaldua A, Joober R, Riviere JB, Dion Y, Lesperance P, Richer F, Chouinard S, Rouleau GA; Montreal Tourette Syndrome Study Group. Tourette syndrome and dopaminergic genes: a family-based association study in the French Canadian founder population. *Mol Psychiatry.* 2004; 9: 272-7.

Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol.* 2003; 25: 115-21.

Erenberg G, Cruse RP, Rothner AD. The natural history of Tourette syndrome: a follow-up study. *Ann Neurol.* 1987; 22: 383-5.

Evangelou E, Trikalinos TA, Salanti G, Ioannidis JP. Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations. *PLoS Genet.* 2006; 2:e123.

Evans DM, Morris AP, Cardon LR, Sham PC. A Note on the Power to Detect Transmission Distortion in Parent-Child Trios via the Transmission Disequilibrium Test. *Behav Genet.* 2006; 36: 947-50.

Freeman RD, Fast DK, Burd L, Kerbeshian J, Robertson MM, Sandor P. An international perspective on Tourette syndrome: selected findings from 3,500 individuals in 22 countries. *Dev Med Child Neurol.* 2000; 42: 436-47.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002; 296: 2225-9.

Grados MA, Walkup JT. A new gene for Tourette's syndrome: a window into causal mechanisms? *Trends Genet.* 2006; 22: 291-3.

Grice DE, Leckman JF, Pauls DL, Kurlan R, Kidd KK, Pakstis AJ, Chang FM, Buxbaum JD, Cohen DJ, Gelernter J. Linkage disequilibrium between an allele at the dopamine D4 receptor locus and Tourette syndrome, by the transmission-disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 644-52.

Hempstead BL, Rabin SJ, Kaplan L, Reid S, Parada LF, Kaplan DR. Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron.* 1992; 9: 883-96.

Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulsom R, Bicknell R. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics.* 2002; 79: 547-52.

Hall D, Dhillia A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M. Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 370-376.

Havill LM, Dyer TD. Association mapping: methodologies, strategies, and issues, *Genet Epidemiol.* 2005; 29: S77-85

Heutink P, van de Wetering BJ, Breedveld GJ, Weber J, Sandkuyl LA, Devor EJ, Heiberg A, Niermeijer MF, Oostra BA. No evidence for genetic linkage of Gilles de la Tourette syndrome on chromosomes 7 and 18. *J Med Genet.* 1990; 27: 433-6.

Jorde LB. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res.* 2000; 10: 1435-44. Review.

Klaffke S, Konig IR, Poustka F, Ziegler A, Hebebrand J, Bandmann O. Brain-derived neurotrophic factor: a genetic risk factor for obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome? *Mov Disord.* 2006; 21: 881-3.

Khalifa N, von Knorring AL. Tourette syndrome and other tic disorders in a total population of children: clinical assessment and background. *Acta Paediatr.* 2005; 94: 1608-14.

Kidd KK, Prusoff BA, Cohen DJ. Familial pattern of Gilles de la Tourette syndrome. *Arch Gen Psychiatry.* 1980; 37: 1336-9.

Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell.* 1999; 96:785-94.

Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW. Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med,* 2003; 9: 914-20,

Klaffke S, Konig IR, Poustka F, Ziegler A, Hebebrand J, Bandmann O. Brain-derived neurotrophic factor: A genetic risk factor for obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome? *Mov Disord.* 2006; 21:881-3.

Kroisel PM, Petek E, Emberger W, Windpassinger C, Wladika W, Wagner K. Candidate region for Gilles de la Tourette syndrome at 7q31. *Am J Med Genet.* 2001; 101: 259-61.

Kwak C, Vuong KD, Jankovic J. Migraine headache in patients with Tourette syndrome. *Arch Neurol.* 2003; 60: 1595-8.

Leckman JF, Zhang H, Vitale A, Lahnin F, Lynch K, Bondi C, Kim YS, Peterson BS. Course of tic severity in Tourette syndrome: the first two decades. *Pediatrics.* 1998; 102: 14-9.

Leckman JF, King RA, Cohen DJ. 1999. Tics and tic disorders. In: Leckman JF (ed). Tourette's syndrome – tics, obsessions, compulsions: developmental psychopathology and clinical care. New York, NY. John Wiley, pg 23-42.

Lee CC, Chou IC, Tsai CH, Wang TR, Li TC, Tsai FJ. Dopamine receptor D2 gene polymorphisms are associated in Taiwanese children with Tourette syndrome. *Pediatr Neurol.* 2005; 33: 272-6.

Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron.* 2004;42: 213-23.

Mambetisaeva ET, Andrews W, Camurri L, Annan A, Sundaresan V. Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn.* 2005; 233: 41-51.

Mell LK, Davis RL, Owens D. Association between streptococcal infection and obsessive-compulsive disorder, Tourette's syndrome, and tic disorder. *Pediatrics.* 2005;116: 56-60.

Merette C, Brassard A, Potvin A, Bouvier H, Rousseau F, Emond C, Bissonnette L, Roy MA, Maziade M, Ott J, Caron C. Significant linkage for Tourette syndrome in a large French Canadian family. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 1008-13.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51: 263-73.

O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics.* 1998; 52: 44-9.

Ozbay F, Wigg KG, Turanli ET, Asherson P, Yazgan Y, Sandor P, Barr CL. Analysis of the dopamine beta hydroxylase gene in Gilles de la tourette syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006; 141; 673-7.

Pappert EJ, Goetz CG, Louis ED, Blasucci L, Leurgans S. Objective assessments of longitudinal outcome in Gilles de la Tourette's syndrome. *Neurology.* 2003; 61: 936-40.

Paschou P, Feng Y, Pakstis AJ, Speed WC, DeMille MM, Kidd JR, Jaghori B, Kurlan R, Pauls DL, Sandor P, Barr CL, Kidd KK. Indications of linkage and association of Gilles de la Tourette syndrome in two independent family samples: 17q25 is a putative susceptibility region, *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 545-60.

Pauls DL, Cohen DJ, Heimbuch R, Detlor J, Kidd KK. Familial pattern and transmission of Gilles de la Tourette syndrome and multiple tics. *Arch Gen Psychiatry.* 1981; 38:1091-3.

Pauls DL. An update on the genetics of Gilles de la Tourette syndrome. *J Psychosom Res.* 2003; 55: 7-12. Review

Peterson BS, Leckman JF, Lombroso P, Zhang H, Lynch K, Carter AS, Pauls DL, Cohen DJ. 1999a. Environmental risk and protective factors. In: Leckman JF (ed). Tourette's syndrome – tics, obsessions, compulsions: developmental psychopathology and clinical care. New York, NY. John Wiley, pg 215-219.

Peterson BS, Leckman JF, Arnsten A, Anderson GM, Staib LH, Gore JC, Broman RA, Malison R, Scahill L, Cohen DJ. 1999b. Neuroanatomical Circuitry. In: Leckman JF (ed). Tourette's syndrome – tics, obsessions, compulsions: developmental psychopathology and clinical care. New York, NY. John Wiley, pg 230-260.

Peterson BS, Staib L, Scahill L, Zhang H, Anderson C, Leckman JF, Cohen DJ, Gore JC, Albert J, Webster R. Regional brain and ventricular volumes in Tourette syndrome. *Arch Gen Psychiatry.* 2001; 58: 427-40.

Peterson BS, Thomas P, Kane MJ, Scahill L, Zhang H, Bronen R, King RA, Leckman JF, Staib L. Basal Ganglia volumes in patients with Gilles de la Tourette syndrome. *Arch Gen Psychiatry.* 2003; 60: 415-24.

Price RA, Kidd KK, Cohen DJ, Pauls DL, Leckman JF. A twin study of Tourette syndrome. *Arch Gen Psychiatry.* 1985; 42:815-20.

Rampello L, Alvano A, Battaglia G, Bruno V, Raffaele R, Nicoletti F. Tic disorders: from pathophysiology to treatment. *J Neurol.* 2006; 253: 1-15.

Robertson MM. Annotation: Gilles de la Tourette syndrome--an update. *J Child Psychol Psychiatry.* 1994; 35: 597-611. Review.

Robertson MM, Banerjee S, Kurlan R, Cohen DJ, Leckman JF, McMahon W, Pauls DL, Sandor P, van de Wetering BJ. The Tourette syndrome diagnostic confidence index: development and clinical associations. *Neurology*. 1999; 53: 2108-12.

Robertson MM. Tourette syndrome, associated conditions and the complexities of treatment. *Brain*. 2000;123 :425-62. Review.

Robertson MM. Diagnosing Tourette syndrome: is it a common disorder? *J Psychosom Res*. 2003;55:3-6.

Robertson MM. Attention deficit hyperactivity disorder, tics and Tourette's syndrome: the relationship and treatment implications. A commentary. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2006; 15: 1-11. Review.

Saccomani L, Fabiana V, Manuela B, Giambattista R. Tourette syndrome and chronic tics in a sample of children and adolescents. *Brain Dev*. 2005; 27: 349-52

Sham PC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet*. 1995; 59: 323-36.

Shapiro AK, Shapiro ES, Young JG, Feinberg TE. 1988a. History of Tourette and Tic Disorders. In: Shapiro e Shapiro (ed). Gilles de la Tourette Syndrome. 2 edition. New York, NY. Raven Press; pg 1-27.

Shapiro AK, Shapiro ES, Young JG, Feinberg TE. 1988b. Epidemiology. In: Shapiro e Shapiro (ed). Gilles de la Tourette Syndrome. 2 edition. New York, NY. Raven Press, pg 45-60.

Schoenian S, Konig I, Oertel W, Remschmidt H, Ziegler A, Hebebrand J, Bandmann O. HLA-DRB genotyping in Gilles de la Tourette patients and their parents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003; 119: 60-4.

Simonic I, Gericke GS, Ott J, Weber JL. Identification of genetic markers associated with Gilles de la Tourette syndrome in an Afrikaner population. *Am J Hum Genet.* 1998; 63: 839-46.

Simonic I, Nyholt DR, Gericke GS, Gordon D, Matsumoto N, Ledbetter DH, Ott J, Weber JL. Further evidence for linkage of Gilles de la Tourette syndrome (GTS) susceptibility loci on chromosomes 2p11, 8q22 and 11q23-24 in South African Afrikaners. *Am J Med Genet.* 2001; 105: 163-7.

Singer HS. Tourette's syndrome: from behaviour to biology. *Lancet Neurol.* 2005a; 4: 149-59. Review.

Singer HS, Hong JJ, Yoon DY, Williams PN. Serum autoantibodies do not differentiate PANDAS and Tourette syndrome from controls. *Neurology.* 2005b; 65: 1701-7.

Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S, Lougee L, Dow S, Zamkoff J, Dubbert BK. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry.* 1998; 155: 264-71.

Swedo SE, Leonard HL, Kiessling LS. Speculations on antineuronal antibody-mediated neuropsychiatric disorders of childhood. *Pediatrics.* 1994; 93:323-6.

Swedo SE, Leonard HL, Rapoport JL. The pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection (PANDAS) subgroup: separating fact from fiction. *Pediatrics.* 2004; 113: 907-11.

The Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics A complete genome screen in sib pairs affected by Gilles de la Tourette syndrome, *Am J Hum Genet*, 1999; 65: 1428-36,

Verkerk AJ, Cath DC, van der Linde HC, Both J, Heutink P, Breedveld G, Aulchenko YS, Oostra BA. Genetic and clinical analysis of a large Dutch Gilles de la Tourette family. *Mol Psychiatry*. 2006;11: 954-64.

Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res*. 1997; 7: 996-1005.

Wendland JR, Kruse MR, Murphy DL. Functional SLITRK1 var321, varCDfs and SLC6A4 G56A variants and susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 2006; 11: 802-4.

Zhang H, Leckman JF, Pauls DL, Tsai CP, Kidd KK, Campos MR; Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics. Genomewide scan of hoarding in sib pairs in which both sibs have Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 896-904.

Zuchner S, Cuccaro ML, Tran-Viet KN, Cope H, Krishnan RR, Pericak-Vance MA, Wright HH, Ashley-Koch A. SLITRK1 mutations in Trichotillomania. *Mol Psychiatry*. 2006; 11: 888-9.

VII. Anexos

Anexo 1 Método de extração de DNA de leucócitos

Soluções:

Solução de lise de células vermelhas (pH 7,4):

155 mM NH₄Cl – 8,3 g NH₄Cl
10 m MKHCO₃ – 1,0 g KHCO₃
1 mM Na₂EDTA – 2 mL 0,5 M Na₂EDTA
Complete até 1 litro de água

Tampão de lise de núcleo (pH 8,2):

10 mM TRIS-HCl – 1 mL 2M Tris
400 mM NaCl – 16 mL 5M NaCl
1 mM Na₂EDTA – 0,8 mL 0,5M Na₂EDTA
Complete tudo para 200mL e autoclave

Solução de Proteinase K:

0,1 g Proteinase K (200U/mg)
5 mg 10% SDS
2 mL 500mM EDTA
43 mL de H₂O

Tampão de TE (pH 7,5)

10 mM Tris-HCl
1 mM Na₂EDTA
Autoclave o tampão

NaCl saturado

Adicione NaCl à água até que o sal não possa mais dissolver na solução (aproximadamente 6M). Autoclave.

Amostras de sangue são melhor processadas nos primeiros três dias após a venopunção.

Dia 1

Transfira a amostra de sangue para um tubo de 50 mL contendo 30 mL de solução para glóbulos vermelhos. Seale o tubo com parafilme para prevenir o vazamento e coloque o tubo no gelo por 10-15 minutos até que o sangue comece a ficar escuro.

Centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Despeje o sobrenadante num frasco com pequeno volume de água sanitária, sendo cuidadoso para não desprezar ou mover o pellet de células brancas. Cuidado extra deve ser tomado com amostras de sangue mais velhas que três dias; quando decantar o sobrenadante de células vermelhas, o pellet branco pode não ser distinguível, sendo melhor deixar os últimos 4-5 mLs de solução no tubo.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 30 mLs de solução de globules vermelhos e centrifugue a 800 x g por 10 minutos. Remova o sobrenadante. Depois de lavar o pellet branco vai ser aparente. Repita a etapa de lavagem novamente.

Ressuspenda o pellet de células brancas em 3 mL de tampão de lise de núcleo.

Adicione 200microL de 10%SDS e 500 µL de solução de proteinase K. Incube o lisado de células a 37°C durante a noite permitindo que a proteína cinase degrade as proteínas. Se o pellet continua invisível, adicione de novo 500microL de solução de proteinase K e incube a 37°C. Essa etapa vai ser necessária para sangues com mais de três dias de retirada.

Dia 2

Depois da digestão, adicione 3 mL de H₂O e 3 mL de NaCL saturado. Misture bem. Centrifugue a 1200 x g por 30 min para precipitar proteínas. Cuidadosamente transfira o sobrenadante para um tubo de 50 mL, evitando que o pellet de proteína flutue. No sobrenadante, adicione 2 volumes de álcool na

temperatura ambiente e inverta o tubo até que o DNA seja visível. Transfira o DNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e lave com etanol 70%. Ressuspenda em 1 mL de tampão TE. Deixe *overnight* num agitador para ressuspender e estoque a 4°C.

Anexo 2 Critérios do DSM-IV para Tiques

Quatro transtornos são incluídos nessa secção: Síndrome de Tourette. Transtorno de Tic motor ou vocal crônico, Transtorno de Tiques Transitórios, Transtorno de Tiques não especificados.

O conceito de tique envolve um movimento motor estereotipado, rápido, recorrente, súbito, não-rítmico ou ainda uma vocalização. Ele é vivenciado como irresistível, mas pode ser suprimido por períodos variáveis de tempo. Todas as formas de tiques podem ser exacerbadas pelo estresse e atenuadas durante atividades de concentração. Tiques são reduzidos durante o sono. Tiques motores e vocais podem ser classificados em simples ou complexos, embora os limites não sejam bem estabelecidos. Tiques motores simples comuns incluem piscar os olhos, mover o pescoço, rodar o ombro, fazer caretas e tosse. Tiques vocais simples incluem limpar a garganta, fungar, grunhir e latir. Tiques motores complexos incluem pular e cheirar. Tiques vocais complexos incluem a repetição de palavras ou frases fora do contexto, coprolalia, palilalia e ecolalia. Outros tiques complexos incluem ecocinesia (imitação dos movimentos de outra pessoa).

Diagnóstico Diferencial

Os transtornos de tiques devem ser distinguidos de outras anormalidades do movimento que podem acompanhar condições médicas em geral (doença de Huntington, acidente vascular cerebral, síndrome de Lesch-Nyhan, doença de Wilson, coréia de Sydenham, esclerose múltipla, encefalite pós-viral, lesão cerebral) ou ainda podem ser decorrentes do efeito direto de substâncias (neurolépticos). Movimentos coreiformes são movimentos na forma de dança, irregulares, não-repetitivos. Movimentos distônicos são mais lentos, alternando os movimentos com estados prolongados de tensão muscular. Movimentos atetóides são lentos, irregulares, frequentemente acometem os movimentos de dedos das mãos e pés, mas frequentemente usam rosto e pescoço. Movimentos mioclônicos são breves, contrações musculares a choque que podem afetar partes dos

músculos ou grupos musculares mas não sinergisticamente. Movimentos hemibalismícos são intermitentes, grosseiros, de grande amplitude, sendo movimentos unilaterais dos membros. Espasmos são movimentos estereotípicos, lentos, mais prolongados que os tiques e envolvem grupos musculares. Hemi-espasmo facial consiste de contração muscular irregular, repetitiva, unilateral de músculos da face. Sincinese envolve movimentos involuntários seguindo um voluntário (movimento do canto da boca quando a pessoa pretende fechar os olhos). A diferenciação vai ser muito facilitada se forem consideradas a presença de outros fatores definindo a condição médica geral ou a história de uso de medicação.

Quando os tiques são uma consequência do uso de medicação, o Transtorno de Movimento induzido por medicação não especificada deve ser diagnosticado ao invés do Transtorno de Tique. Em alguns casos algumas medicações (exemplo: metilfenidato) podem exacerbar o Transtorno de Tique pré-existente, nesse caso nenhum diagnóstico adicional de transtorno induzido por medicação será necessário.

Tiques tem que ser diferenciados de movimentos estereotipados vistos em Transtorno de Movimentos Estereotípicos e Transtorno do desenvolvimento Pervasivo. Diferenciar tiques simples de movimentos estereotipados é relativamente fácil e direto. A distinção completa entre tiques motores complexos e movimentos estereotipados é menos clara. Em geral, movimentos estereotipados parecem ser mais direcionados e intencionais, enquanto os tiques devem ser diferenciados de compulsões. Compulsões são tipicamente complexas e são realizadas em resposta a obsessões ou seguindo normas que devem ser aplicadas com rigor. Em contraste com as compulsões, tiques são tipicamente menos complexos e não tem por objetivo neutralizar a ansiedade resultante de uma obsessão. Alguns indivíduos manifestam sintomas tanto de Transtorno Obsessivo-Compulsivo quanto de Transtorno de Tiques e ambos os diagnósticos devem ser firmados. Alguns tiques motores e vocais devem ser distintos do comportamento catatônico e desorganizado dos esquizofrênicos.

Os transtornos de tiques podem ser distinguidos entre eles quanto à sua duração, variedade e idade de surgimento. O transtorno de tique transitório inclui

tiques motores e vocais durando pelo menos 4 semanas, mas não mais que 12 meses consecutivos. A Síndrome de Tourette e o Transtorno de Tiques vocais e motores crônicos tem a duração de mais de 12 meses e podem ser diferenciados porque a Síndrome de Tourette requer múltiplos tics e pelo menos um tique vocal. Tiques não especificados vão ser apropriados para apresentações clinicamente significativas durando menos de 4 semanas para apresentações com idade de início após 18 anos e para o caso incomum de indivíduos com apenas um tique motor e apenas um tique vocal.

307.23 Síndrome de Tourette

Fatores Diagnósticos

Fatores essenciais da Síndrome de Tourette são a presença de múltiplos tiques motores e um ou mais tiques vocais (Critério A). Esses tiques podem surgir simultaneamente ou em diferentes períodos da doença. Os tiques ocorrem muitas vezes durante o dia, recorrentemente num período de 1 ano (Critério B). Durante esse período de 1 ano é essencial a ausência de um período de tempo superior a 3 meses consecutivos sem tiques. Os distúrbios causam estresse ou prejuízo social, ocupacional, ou de outras importantes áreas de funcionamento (Critério C). O início do transtorno tem que ser antes dos 18 anos (Critério D). Os tiques não podem ser decorrentes de efeitos fisiológicos diretos de substâncias (como exemplo de estimulantes) ou de uma condição médica outra (como exemplo em decorrência de doença de Huntington ou encefalite pós-viral)(Critério E).

A localização anatômica, o número, a frequência, a complexidade, a gravidade dos tiques mudam ao longo do tempo. Os tiques tipicamente envolvem a cabeça e frequentemente outras partes do corpo como o tronco e membros superiores e inferiores. Os tiques vocais incluem várias palavras ou sons como cliques, grunhidos, choro, latidos, fungadas e tosse. Coprolalia, um tique vocal complexo envolvendo palavrões e obscenidades, está presente em poucos indivíduos com o transtorno. Tiques motores complexos podem ser tocar, ajoelhar, agachar, dar passos para trás e virar subitamente quando andando. Em

aproximadamente metade dos indivíduos com essa doença, o primeiro sintoma a surgir é um tique único, mais frequentemente piscar os olhos, menos frequentemente tiques que envolvem outra parte da face ou do corpo. Sintomas iniciais podem incluir protusão de língua, agachar, fungação, saltos em um pé só, pulos, limpar a garganta, gaguejar, emitir sons ou palavras sem propósitos e coprolalia.

Fatores e Transtornos Associados

Os sintomas mais comumente associados à Síndrome de Tourette são as obsessões e compulsões. Hiperatividade, distraibilidade e impulsividade são relativamente comuns, acontecem ainda desconforto social, vergonha, auto-consciência e humor deprimido. O funcionamento social, acadêmico e ocupacional podem estar prejudicados pela rejeição de outros ou ansiedade por ter tiques em situações sociais. Em casos graves de Síndrome de Tourette os tiques podem interferir nas atividades diárias (como por exemplo ler e escrever). Complicações raras da Síndrome de Tourette incluem lesão física, problemas ortopédicos e lesões de pele. A gravidade dos tiques pode ser exacerbada pelo uso de estimulantes do sistema nervoso central, o que pode ser um fenômeno dose relacionado. Transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e transtornos de aprendizado podem estar associados com a Síndrome de Tourette.

Fatores variáveis com cultura específica e com gênero

A Síndrome de Tourette vêm sendo relatada em diversos grupos raciais e étnicos. Acomete 1,5 a 3 vezes mais o sexo masculino que o sexo feminino.

Prevalência

A Síndrome de Tourette acontece em aproximadamente 4 - 5 indivíduos por 10000.

Curso

A idade de início da Síndrome de Tourette pode ser precoce, como aos 2 anos, mas sempre acontece na infância e adolescência e por definição antes dos 18 anos. A idade média de início para tiques motores é de 7 anos. A duração da doença é por toda a vida, sendo que podem acontecer períodos de remissão de semanas a anos. Na maioria dos casos a gravidade, frequência, variabilidade dos sintomas diminuem na adolescência e vida adulta. Em outros casos, os sintomas desaparecem inteiramente no princípio da vida adulta.

Padrão Familiar

A vulnerabilidade à Síndrome de Tourette e transtornos associados é transmitida como um padrão de doença autossômica dominante. Vulnerabilidade implica que a criança recebe a genética ou a base constitucional para desenvolver o Transtorno de Tique; a classificação ou a gravidade do transtorno podem ser diferentes de uma geração para outra. Deve estar claro que nem todo mundo que herda a vulnerabilidade genética vai expressar sintomas de Transtorno de Tique. A penetrância no sexo feminino de carreadores de genes é de 70%, a penetrância de carreadores de genes de sexo masculino é algo em torno de 99%. A doença pode apresentar-se como ST, transtorno de tique vocal e motor, algumas formas de transtorno obsessivo-compulsivo e talvez transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Em aproximadamente 10% dos pacientes com Síndrome de Tourette não há evidência de padrão familiar. Indivíduos com essas formas não-genéticas de Síndrome de Tourette ou outro transtorno de tique frequentemente apresentam outra doença mental ou condição médica.

Diagnóstico Diferencial

Referência para o Diagnóstico Diferencial da seção de transtorno de tiques.

Critério Diagnóstico para 307.23 Síndrome de Tourette:

- A. Tiques motores e um ou mais tiques vocais presentes durante o curso da doença, não necessariamente coincidentes
- B. Os tiques ocorrem muitas vezes ao dia quase todo dia ou intermitentemente por um período de mais de 1 ano e durante esse período não há um período livre de tiques maior que 3 meses consecutivos
- C. Os distúrbios causam importante estresse ou piora da vida social, ocupacional ou outras importantes áreas de funcionamento
- D. O surgimento deve ser anterior aos 18 anos
- E. O transtorno não decorre de efeitos fisiológicos diretos de substâncias ou de uma condição médica geral

307.22 Transtorno de Tiques Vocais e Motores

Fatores Diagnósticos:

O fator diagnóstico essencial é a presença de tiques motores ou tiques vocais, mas não necessariamente de ambos. Isso difere da Síndrome de Tourette, na qual tem estar presentes tiques motores e um ou mais vocais. Os outros critérios diagnósticos são os mesmos para a Síndrome de Tourette. O diagnóstico de Transtorno de tique motor ou vocal não pode ser feito se o critério de Síndrome de Tourette for feito. Aparentemente o transtorno de tiques vocais e motores crônicos e a Síndrome de Tourette podem ser geneticamente relacionados porque frequentemente ocorrem nas mesmas famílias.

Diagnóstico Diferencial

Referência ao Diagnóstico Diferencial da seção de Transtornos de Tiques.

Critério Diagnóstico para 307.22 Transtorno de tique vocal ou motor crônico:

- A. Tiques motores ou tiques vocais, não estando presentes ambos durante o curso da doença
- B. Os tiques ocorrem muitas vezes ao dia quase todos os dias ou intermitentemente por um período de mais de 1 ano e durante esse período não há um período livre de tiques maior que 3 meses consecutivos
- C. Os distúrbios causam importante estresse ou piora da vida social, ocupacional ou outras importantes áreas de funcionamento
- D. O surgimento deve ser anterior aos 18 anos
- E. O transtorno não decorre de efeitos fisiológicos diretos de substâncias ou de uma condição médica geral
- F. Nunca teve critério diagnóstico para Síndrome de Tourette

307.21 Transtorno de tique transitório:

Critérios Diagnósticos:

Os fatores diagnósticos de Transtorno Transitório de Tiques estão presentes quando presentes um ou múltiplos tiques motores ou vocais. Os tiques ocorrem várias vezes ao dia, quase todos os dias e por pelo menos 4 semanas, mas não por mais do que consecutivos 12 meses. Os outros fatores essenciais são os mesmos para a Síndrome de Tourette. O Transtorno Transitório de Tique não pode ser feito se houver diagnóstico prévio de algum outro transtorno de tique.

As outras características do transtorno são as mesmas para a Síndrome de Tourette, exceto pelo fato de que o comprometimento funcional e a gravidade dos sintomas são usualmente muito menores.

Especificantes

O curso de Transtorno Transitório de Tique pode ser por especificar um Episódio Único ou Recorrente.

Diagnóstico Diferencial

Refere ao diagnóstico diferencial da seção de Transtornos de Tics.

Critério Diagnóstico para 307.21 Transtorno Transitório de Tique:

- | | |
|----|--|
| A. | Tiques motores ou tiques vocais, únicos ou múltiplos |
| B. | Os tiques ocorrem muitas vezes ao dia quase todos os dias por pelo menos 4 semanas, mas não mais do que por 12 meses |
| C. | Os distúrbios causam importante estresse ou piora da vida social, ocupacional ou outras importantes áreas de funcionamento |
| D. | O surgimento deve ser anterior aos 18 anos |
| E. | O transtorno não decorre de efeitos fisiológicos diretos de substâncias ou de uma condição médica geral |
| F. | Nunca teve critério diagnóstico para outro transtorno de tique |
| G. | Deve ser especificado se é um episódio único ou recorrente |

307.20 Transtorno de Tique Não-especificado

Essa categoria foi criada para tiques que não preenchem os critérios diagnósticos para Transtorno de Tique específico. Exemplo inclui tiques durando menos de 4 semanas ou tiques com início após os 18 anos.

Anexo 3

Anexo 4

Manuscrito resultante de parte dos dados apresentados atualmente em processo de revisão pelos co-autores para submissão em futuro próximo.

**Association study between Gilles de la Tourette Syndrome and two genes located in
11q23-24**

DM Miranda^{1,2*}, K Wigg^{2*}, Y Feng², P Sandor², C Barr^{2,3}

¹Department of Pharmacology of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

² Cell and Molecular Biology Division, Toronto Western Research Institute, University Health Network, Toronto, ON, Canada

³ Brain and Behavior Programme, the Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada.

* These authors contributed equally to this work

Correspondence Author: Dr CL Barr, The Toronto Western Hospital, 399 Bathurst Street, MP14-302, Toronto, Ontario M5T2S8, Canada. E-mail: CBarr@uhnes.utoronto.ca

Abstract

Gilles de la Tourette syndrome (GTS) is an inherited neuropsychiatric disorder characterized by the presence of motor and phonic tics. The genetical aspects have been studied and some genome scans appointed association between GTS and the region 11q23-25. We identified in 11q23-25 region possible susceptibility genes to GTS, the ROBO3 and ROBO4 genes. Recently, a mutation in the SLITRK1 gene was found in few patients. The SLIT-ROBO proteins family has a role an axonal pathfinding in the crossover midline in spinal cord. These findings motivated our study of other genes of SLIT-ROBO pathway, the ROBO3 and ROBO4 genes in trios and families with patients with GTS. We selected 6 markers for ROBO3 and 4 markers for ROBO4 and determine the haplotypes. Our study was the first to study these genes and we did not find correlations between GTS and ROBO3 and ROBO4 genes.

Key Words

Gilles de la Tourette Syndrome, genes, SLIT-ROBO, axonal pathfinding

Introduction

Gilles de la Tourette syndrome (GTS) is a neuropsychiatric disorder characterized by the presence of both motor and phonic tics that begin in childhood and typically wax and wane over periods of weeks or months [Olson, 2004 #2634] [Xu, 2003 #1703]. Tourette syndrome usually begins with motor tics at the age of 6-7 years and in most patients improves in late adolescence and early adulthood [Leckman, 1998 #2635]. Phonic tics begin 1-2 years after the onset of motor tics. In children, prevalence rates of GTS can reach 50 per 10000 and in studies among adults and adolescents the rates reported are lower in the range of 0.5 and 4.3 per 10000 [Leckman, 1998 #2635].

Other disorders are commonly observed in affected individuals and in family members of GTS probands [Rampello, 2006 #2636]. Obsessive-compulsive symptoms usually occur in 20-60%, but in some studies can reach 89% [Singer, 2005 #2637]. Symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) are common. Moreover Tourette's patients also have elevated rates of depression, personality disorders, anxiety disorders and several social and emotional difficulties [Olson, 2004 #2634]. GTS is a complex disorder with many different presentations that may be accompanied by other syndromes which makes the exact definition of phenotype complex and difficult.

GTS is an inherited disorder, with a high percentage of GTS patients having an affected first-degree relative [Mink, 2006 #2625]. The strong support for the genetic component is provided by evidence from studies with monozygotic twins, which showed 86% of concordance for chronic tics disorder among monozygotic twins compared with only 20% among dizygotic twins. A number of genome linkage studies were performed to elucidate genetic inheritance and several chromosomal regions have been suggestive of linkage, however the LOD scores for many loci are low and many studies have failed to show a reproducible locus. The difficulty to identify susceptibility genes establish the genetic role in GTS have been attributed to uncertainties about the mode of inheritance, the difficulty defining the exact phenotype and complicating factors such as locus heterogeneity. [Merette, 2000 #1379], [Barr, 1999 #743].

One locus that has shown some reproducibility is the 11q24 region. In a case-control study of Simonin et al. (1998), using 91 Africaners nuclear families with one or

more affected children, they found association between GTS and the 11q region as well as 4 additional chromosomal regions. In a subsequent study [Simonic, 2001 #2633], this group confirmed the finding of association with the 11q chromosomal region, particularly with the marker D11S1377. In the study of Mérette et al (2000), these findings were tested in a large French Canadian family (127 members) with members diagnosed with GTS or isolated tics. Significant evidence for linkage was found for the markers D11S1377 and D11S933. Moreover, the same region of chromosome 11q24 was studied with 6 markers in another study of Diaz-Anzaldúa et al (2005) with 199 isolated cases and 174 French Canadian families. In this case they failed to find association in and between the markers D11S1377 and D11S933. Based on the positive findings in the region 11q23-24, we targeted two genes as promising candidates – roundabout 3 (ROBO3) and roundabout 4 (ROBO4).

In addition to their localization to this candidate region, ROBO3 and ROBO4 are also attractive candidates because of their involvement in the Slit-Robo pathway. A recent finding of one child with GTS and a *de novo* inversion on chromosome 13, identified a gene encoding Slit and Trk-like 1 (SLITRK1) a member of a family implicated in neurite outgrowth, that was close to one of the breakpoints [Mink, 2006 #2625] [Abelson, 2005 #2429]. After this finding, 174 unrelated subjects with GTS were studied and two mutations in this gene were identified in three unrelated individuals. No mutations were found at this locus in 3,600 control chromosomes. Both mutations are thought to cause haploinsufficiency. In primary neuronal cultures, wild type SLITRK1 enhanced dendritic growth, but a SLITRK1 mutant did not. SLITRK1 is expressed widely in developing and postnatal brain. The implication of a molecule regulating neuronal development opens an intuitively attractive pathway to explain the pathogenesis of GTS [Mink, 2006 #2625].

Robo family proteins are transmembrane receptors for the Slit molecule. In midline ventral nerve cord of *Drosophila* it is well characterized that the interactions between Slit-Robo keep commissural axons from recrossing the midline, and also maintain ipsilateral axons on their own side [Brose, 1999 #2631][Kidd, 1999 #2632]. Immunohistochemical studies revealed that, in *Drosophila*, commissural axons express little or no Robo protein until they have crossed the midline [Kidd, 1999 #2632]. Robo protein expression is dramatically upregulated at the growth cone after midline crossing. Therefore, commissural

axons become highly responsive to the Slit repellent activity, preventing axons from recrossing the midline.

ROBO3 mutations have been identified in patients with the syndrome of horizontal gaze palsy, a rare human disorder characterized by the absence of conjugate horizontal eye movement and progressive scoliosis. In the study of that disorder, Jen et al. (2004) found an error in the crossing of the midline in the medulla [Jen, 2004 #2638]. In the same study it was demonstrated that there was abundant expression of the ROBO3 gene in the fetal human brain. Mutations in the human ROBO3 gene disrupt hindbrain axon path finding and morphogenesis [Jen, 2004 #2638], suggesting that, ROBO3, like other robo-family members, is required for hindbrain axon midline crossing in human [Mambetisaeva, 2005 #2639].

ROBO4 or magic roundabout was identified using bioinformatics techniques and its expression was found in heart, adult and fetal brain, liver, lung, kidney, muscle, placenta, and small intestine, but not in those from peripheral blood leukocytes, spleen, and testis. In this study using In situ hybridization and immunohistochemistry, the expression was detected in endothelial cells, but not neuronal cells [Huminiecki, 2002 #2628]. However microarray data available from public databases (www.geneatlas.org) and in situ data from the Allen Brain Atlas (www.brain-map.org) provide clear evidence for brain expression. ROBO4 is the most recent gene identified in the Slit-Robo pathway and its role, its ligand and exact mechanisms of action are still unknown. [Seth et al., 2005 #2627] have shown that ROBO 4 is differentially over-expressed in tumor endothelial cells in comparison with normal adult endothelial cells and they hypothesized that expression of ROBO 4 is involved in regulating the migration of endothelial cells during tumor angiogenesis [Seth et al., 2005 #2627].

On the basis of the SLITRK1 findings we hypothesized that other genes of Slit-robo pathway may also contribute to susceptibility to GTS. Following the linkage findings in11q24, we have decided to begin our study with the genotyping of selected SNPS in the ROBO3 and ROBO4 genes.

Materials and Methods

Subjects

Our sample consisted of 155 nuclear families, with both affected sibling pair families and parent/proband trios in a total of 255 affected individuals recruited from the Tourette Syndrome Clinic of Toronto Western Hospital. Written informed parental or patient consent was obtained for all participants and the study was approved by the ethics committee of the University Health Network. Information about symptoms associated with GTS and obsessive compulsive disorder were collected using a self- and family-report based on the tic inventory and ordinal severity scales of the Yale Global Tic Severity Scale [Leckman, 1989 #649] and the symptom checklist and ordinal scales of the Yale-Brown Obsessive-compulsive scale [Goodman, 1989 #39]. The information was checked by an experienced neuropsychiatrist or neurologist, who also performed a direct examination of each proband.

Genotyping

Blood was collected from the subjects and genomic DNA was extracted from leukocytes using a standard high salt extraction method [Miller, 1988 #250].

A total of 10 markers from ROBO3 and ROBO4 genes were genotyped using the TaqMan® assay with primer and probes available commercially (Applied Biosystems -AB). The PCR primers and allelic discrimination probes were obtained from AB (assay-on-demand). Five microliters of PCR reactions contained 30ng of genomic DNA, 5µmol of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0,125µl of allelic discrimination mix, which contained 18µM of each primer and 4µM of each probe. The thermal cycling conditions for all these primers were 95°C for 10 min, then 40-60 cycles of 92°C for 15 sec and 1 min at 59°C. Negative controls were included with each 96-well plate. Plates were read on the ABI 7900-HT Sequence Detection System® (Applied Biosystems) using the allelic discrimination end-point analysis mode of the software package version 2.0 (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

For the categorical analysis of Tourette Syndrome the extended TDT (ETDT) program [Sham, 1995 #500][Curtis, 1995 #648] was used to test for the biased the transmission of alleles. The coefficients of linkage disequilibrium between markers alleles, Δ^2 and D' were calculated using Haploview v2.03 [Barrett, 2005 #2115]. The transmission of haplotypes was analysed using TRANSMIT program using the robust estimator of variance option. (Clayton, 1999)

Results

To investigate the association between GTS and the ROBO3 and ROBO4 genes, we genotyped four markers in the ROBO4 gene and six markers in the ROBO3 gene in a sample of 155 families with 255 affected individuals. These markers tagged the major haplotypes of these genes to ensure adequate coverage of each gene.

The results of the TDT analysis for the markers used in this study are shown in table 1 for ROBO3 and Table 2 for ROBO4. We didn't observe statistical evidence for difference in transmittion of alleles and any of the markers in our sample of GTS patients. The linkage disequilibrium between the markers was estimated using Haploview (Tables III and IV). We observe a strong linkage disequilibrium across these genes as predicted in the Hapmap data set.

Discussion

In the past 15 years many strategies have been used to identify susceptibility genes for GTS including genome scans and candidate genes studies. Severals genome scans were performed and several chromosomal regions have been suggestive of linkage, but the LOD scores for many loci usually are low and these studies have failed to show a consistent finding across all studies [Barr, 2005 #2330]. The finding that variants in the SLITRK1 gene were correlated with GTS in three patients has been the first possible clue to lead to GTS ethio-pathogenesis. However at this time SLITRK1 appears to contribute to a very small number of cases and further has not as get been replicated in additional studies.

Our study is the first study to look at other genes in the SLIT-ROBO pathway. We studied two genes that are part of the SLIT-ROBO pathway located in the chromosomal 11q in region identified in several linkage and association studies. We failed to find association between ROBO3 and ROBO4 genes with GTS, but we cannot rule out other genes influencing the SLIT-ROBO pathway in the etiology of GTS.

The role of the SLIT-ROBO proteins have been studied and some findings suggest that these proteins are involved with neuronal migration, muscular migration and leukocytes chemotaxis, but the mechanisms is still not fully understood [Wong, 2002 #2640] [Parsons, 2003 #2641]. The knowledge of the functional mechanisms of SLIT-ROBO proteins and additional genetical studies are required to determine the real role of this pathway in GTS.

Acknowledgments:

This work was supported by Doctoral Fellowship from the CAPES/Brazil and by grants from Canadian Institutes of Health Research.

References:

Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LS 4th, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW. 2005. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science*. 310(5746):317-20

Albin RL, Mink JW. 2006. Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci*. 29(3):175-82.

Barr CL, Wigg KG, Pakstis AJ, Kurlan R, Pauls D, Kidd KK, Tsui LC, Sandor P. 1999. Genome scan for linkage to Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Med Genet*. 88(4):437-45

Barr CL. 2005: Progress in Gene Localization. In Kurlan R (ed) Handbook of Tourette's Syndrome and Related Tic and Behavioral Disorders. New York, NY: Marcel Dekker Inc, pp379-398.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2):263-5.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96(6):795-806.

Chowdhury U, Heyman I. 2004. Tourette's syndrome in children. *BMJ* 329(7479):1356-7.

Clayton D. 1999. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *Am J Hum Genet*. 65(4):1170-7.

Diaz-Anzaldúa A, Riviere JB, Dube MP, Joobar R, Saint-Onge J, Dion Y, Lesperance P, Richer F, Chouinard S, Rouleau GA; Montreal Tourette Syndrome Study Group. 2005 Chromosome 11-q24 region in Tourette syndrome: association and linkage disequilibrium study in the French Canadian population. *Am J Med Genet A* 138(3):225-8.

Goodman WK, Price LH, Rasmussen SA, Mazure C, Fleischmann RL, Hill CL, Heninger GR, Charney DS. 1989. The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 46(11): 1006-1011.

Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulson R, Bicknell R. 2002. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79(4):547-52.

Jen, J. C.; Chan, W.-M.; Bosley, T. M.; Wan, J.; Carr, J. R.; Rub, U.; Shattuck, D.; Salamon, G.; Kudo, L. C.; Ou, J.; Lin, D. D. M.; Salih, M. A. M.; and 23 others :2004

Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304: 1509-1513.

Kidd T, Bland KS, Goodman CS. 1999. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96(6):785-94.

Leckman JF, Riddle MA, Hardin MT, Ort SI, Swartz KL, Stevenson J, Cohen DJ. 1989. The Yale Global Tic Severity Scale: initial testing of a clinician-rated scale of tic severity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*.566-76.

Leckman JF, Zhang H, Vitale A, Lahnin F, Lynch K, Bondi C, Kim YS, Peterson BS. 1998. Course of tic severity in Tourette syndrome: the first two decades. *Pediatrics* 102(1 Pt 1):14-9.

Mambetisaeva ET, Andrews W, Camurri L, Annan A, Sundaresan V. 2005. Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn* 233(1):41-51.

Merette C, Brassard A, Potvin A, Bouvier H, Rousseau F, Emond C, Bissonnette L, Roy MA, Maziade M, Ott J, Caron C. 2000. Significant linkage for Tourette syndrome in a large French Canadian family. *Am J Hum Genet* 67(4):1008-13. Epub 2000 Sep 11.

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.

Parsons L, Parsons L, Harris KL, Turner K, Whittington PM. 2003. Roundabout gene family functions during sensory axon guidance in the *drosophila* embryo are mediated by both Slit-dependent and Slit-independent mechanisms. *Dev Biol* 264(2):363-75.

Olson S. *Neurobiology*. 2004. Making sense of Tourette's. *Science*. 305(5689):1390-2.

Rampello L, Alvano A, Battaglia G, Bruno V, Raffaele R, Nicoletti F. 2006. Tic disorders: from pathophysiology to treatment. *J Neurol.* 253(1):1-15.

Seth P, Lin Y, Hanai J, Shivalingappa V, Duyao MP, Sukhatme VP. 2005. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(2):533-41.

Sham PC, Curtis D. 1995. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet* 59 (Pt 3):323-36.

Simoncic I, Gericke GS, Ott J, Weber JL. 1998. Identification of genetic markers associated with Gilles de la Tourette syndrome in an Afrikaner population. *Am J Hum Genet* 63(3):839-46.

Simoncic I, Nyholt DR, Gericke GS, Gordon D, Matsumoto N, Ledbetter DH, Ott J, Weber JL. 2001. Further evidence for linkage of Gilles de la Tourette syndrome (GTS) susceptibility loci on chromosomes 2p11, 8q22 and 11q23-24 in South African Afrikaners. *Am J Med Genet* 105 (2):163-7.

Singer HS. 2005. Tourette's syndrome: from behaviour to biology. *Lancet Neurol.* 4(3):149-59.

Wong K, Park HT, Wu JY, Rao Y. 2002. Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* 12(5):583-91.

Xu C, Ozbay F, Wigg K, Shulman R, Tahir E, Yazgan Y, Sandor P, Barr CL; Tourette Syndrome Association Genetic Consortium. 2003. Evaluation of the genes for the adrenergic receptors alpha 2A and alpha 1C and Gilles de la Tourette Syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 119(1):54-9.

Table 1 - Categorical Analysis of the ROBO3 gene

Polymorphism	Allele	Allele Frequency	Transmissions	Non-Transmission	χ^2	p-value
rs 11219819	C	0.75	62	52	0.877	0.349
	T	0.24	52	62		
rs 4936957	C	0.64	78	69	0.551	0.457
	T	0.32	69	78		
rs 3923890	A	0.31	76	69	0.338	0.561
	T	0.69	69	76		
rs 11219821	C	0.54	89	84	0.145	0.703
	T	0.45	84	89		
rs 4606490	C	0.44	83	82	0.006	0.938
	T	0.55	82	83		
rs 3802905	C	0.62	81	77	0.101	0.750
	G	0.38	77	81		

Table 2 – Categorical Analysis of the ROBO 4 gene

Polymorphism	Allele	Allele Frequency	Transmissions	Non-Transmission	χ^2	p-value
rs 4078483	C	0.306	44	42	0.048	0.826
	G	0.694	42	44		
rs 4635093	G	0.298	33	30	0.143	0.705
	T	0.702	30	33		
rs 6590109	A	0.667	55	46	0.516	0.472
	G	0.333	46	55		
rs 12823	A	0.35	37	30	0.731	0.392
	T	0.65	30	37		

Table 3 - Linkage disequilibrium between markers used in the study of robo 3 gene:

	rs11219821	rs4936957	rs3923890	rs11219821	rs4606490	rs3802905
rs11219821		0.27	0.30	0.60	0.32	0.88
rs4936957	0.05		0.92	0.96	0.83	0.87
rs3923890	0.07	0.78		0.96	0.97	0.93
rs11219821	0.10	0.37	0.34		0.97	0.88
rs4606490	0.04	0.43	0.53	0.61		0.91
rs3802905	0.16	0.23	0.24	0.58	0.41	

D' values are shown in the upper half of the table, r^2 in the lower half of the table

Table 4 - Linkage disequilibrium between markers used in the study of robo 4 gene:

	rs4078483	rs4635093	rs6590109	rs12823
rs4078483		0.97	0.99	0.98
rs4635093	0.19		1.0	0.98
rs6590109	0.84	0.21		0.98
rs12823	0.22	0.23	0.26	

D' values are shown in the upper half of the table, r^2 in the lower half of the table