

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

TESE DE DOUTORADO

**Aspectos clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no
Rio Grande do Sul**

**Sua relação com as outras ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes
E uma hipótese sobre seus fatores modificadores**

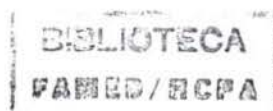
Laura Bannach Jardim

**Orientador
Prof. Dr. Roberto Giugliani**

**Co-orientadora
Profa. Dra. Maria Luiza Pereira**

Porto Alegre

2000



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA DOENÇA DE
MACHADO-JOSEPH NO RIO GRANDE DO SUL.
SUA RELAÇÃO COM AS OUTRAS ATAXIAS
ESPINOCEREBELARES AUTOSSÔMICAS DOMINANTES
E UMA HIPÓTESE SOBRE SEUS FATORES MODIFICADORES.**

LAURA BANNACH JARDIM

Orientador

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora

Profa. Dra. Maria Luiza Pereira

**Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Medicina: Clínica Médica
Mestrado e Doutorado, da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção
do título de Doutor em Clínica
Médica.**

**Porto Alegre
2000**

MED
T
w1140 J37a 2000

05189684

[0283485] Jardim, Laura Bannach. Aspectos clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul: sua relação com as outras ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes e uma hipótese sobre seus fatores modificadores. 2000. 317 f.

J37a Jardim, Laura Bannach

Aspectos clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul: sua relação com as outras ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes e uma hipótese sobre seus fatores modificadores / Laura Bannach Jardim; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Maria Luiza Pereira. – Porto Alegre, 2000.
317 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica.

1. Ataxia espinocerebelar. 2. Doença de Machado-Joseph. I. Giugliani, Roberto. II. Pereira, Maria Luiza. III. Título.

NLM: WL 140

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Desejo agradecer:

- ao Prof. Roberto Giugliani , meu orientador de quase tudo o que fiz desde 1988, pelo apoio paciente durante todos os anos em que temos trabalhado juntos, pelos incentivos, pelas oportunidades, pela amizade, pela humanidade, pela modéstia, pela temperança, pela sabedoria; e por tudo o que tentou me ensinar;
- ao Prof. Jorge Sequeiros, por ter recebido tantos ensaios moleculares, enquanto dividia comigo o seu grande saber sobre genética, sobre ética e sobre a doença de Machado-Joseph; por ter se dedicado tanto aos artigos; pela continuidade da parceria que se desenvolve entre portugueses do Porto e brasileiros de Porto Alegre;
- à Profa. Maria Luisa Pereira, professora e colega, por ter implantado aqui, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os ensaios moleculares para a doença de Machado-Joseph;
- à Isabel Silveira e a sua equipe – Anabela Ferro, Isabel Alonso , Maria do Céu Moreira , Pedro Mendonça , Fátima Ferreirinha – que tantos exames fizeram para Machado-Joseph, para SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA8 e DRPLA; como trabalharam!
- à Leticia Rasia de Melo, por ter sido a primeira a me ajudar na organização do arquivo de pacientes e de famílias;
- à Ana Cristina Puga, à Carolina Fishinger Moura de Souza, à Simone Karam e à Cláudia Cecchin, médicas que têm dividido comigo o atendimento dos pacientes e de suas famílias; por assumirem o aconselhamento genético, o atendimento dos testes preditivos e um sem fim de novos dilemas éticos que vêm surgindo no cuidado dessa doença;
- ao Prof. Cláudio Osório, à Andréa Vainer, à Neusa Sicca da Rocha e à Regina Margis, psiquiatras, por me ajudarem todos os dias no cuidado psicológico dos doentes e de suas famílias; e por terem organizado o atendimento em grupo desses doentes, junto com a Simone Karam;
- à Adriana Pacheco Pires, psicóloga, pois foi ela quem assumiu o cuidado e a avaliação psicológica dos testes preditivos, testes que não entram explicitamente nessa tese, mas

que eram a consequência necessária dela;

- à Thais Monte e ao Carlos Rieder, os dois colegas neurologistas que também, sem outra obrigação além de seus motivos interiores, passaram a atender nossos doentes atáxicos, criando um novo ambulatório e sugerindo alternativas terapêuticas;
- a todos os neurologistas que me encaminharam os doentes para serem investigados - em especial ao Prof. Sérgio Roberto Haussen e à Profª. Lizelotte Barea;
- ao Prof. Bernardo Horta, por ter me ajudado nas questões estatísticas desse trabalho;
- aos colegas médicos do Serviço de Genética, Profª. Lavinia Schüller-Faccini, Têmis Félix, Maria Teresa Sanseverino, Júlio Cesar Loguércio Leite e Ricardo Flores Pires, que tiveram, de diferentes formas, aumentadas as suas tarefas clínicas na medida em que eu me dedicava a essa tese;
- ao Prof. José Roberto Goldim, por ter me ajudado a lidar com os problemas éticos que foram surgindo durante o atendimento cotidiano da doença de Machado-Joseph;
- à Zeniara e ao Fabrizio que, na secretaria, tanta ajuda têm me dado nesses anos;
- à Sandra Leistner, que nesse ínterim montou a técnica molecular para a doença de Friedreich, outra ataxia que tínhamos necessidade de investigar em alguns dos nossos doentes;
- ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, por ter me aceitado entre os seus alunos e depois por ter me recebido de volta;
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto de Cooperação Científica e Tecnológica Internacional (ICCTI), de Portugal, por terem me propiciado a viagem a Portugal, em 1997, e à Profª. Purificação Tavares por ter me indicado – junto com o Prof. Roberto Giugliani – para aquela missão de trabalho;
- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro que forneceu à Maria Luiza Pereira, para a montagem das técnicas moleculares aqui em Porto Alegre;

- ao Ivan;
- à minha família, em especial aos meus pais e ao Milton Luiz: eles que tanto conforto deram, para que a vida cotidiana fosse fácil e eu me esquecesse dela e me perdesse nisso aqui; ele que todo dia é um grande pai, o que torna tão simples para eu ser (ou pensar que sou) uma boa mãe;
- aos meus filhos;
- e a todos os pacientes que participaram desse trabalho.

*..assim como uma faca
que sem bolso ou bainha
se transformasse em parte
de vossa anatomia;*

*qual uma faca íntima
ou faca de uso interno,
habitando num corpo
como o próprio esqueleto*

*de um homem que o tivesse,
e sempre, doloroso,
de homem que se ferisse
contra seus próprios ossos.*

João Cabral de Melo Neto

Uma faca só lâmina, 1955

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes ou SCAs. Notas históricas	16
1.2 A doença de Machado Joseph	22
1.2.1 A história da doença de Machado-Joseph e sua definição	22
1.2.2 Epidemiologia	24
1.2.3 Manifestações clínicas e patológicas	26
1.2.4 Genética clássica da doença de Machado-Joseph	33
1.2.5 O gene da DMJ – o gene MJD1	35
1.2.6 Fatores modificadores	41
1.2.7 A origem da DMJ e os estudos dos haplotipos do gene MJD1	43
1.3 As demais SCAs. Sua classificação atual	47
1.3.1 SCA1	48
1.3.2 SCA2	49
1.3.3 DRPLA	51
1.3.4 SCA4	52
1.3.5 SCA5	52
1.3.6 SCA6	53
1.3.7 SCA7	55
1.3.8 SCA8	57

1.3.9 SCA10	59
1.3.10 SCA11	59
1.3.11 SCA12	60
1.4 Fisiopatologia geral das expansões CAGs – os tratos de poliglutaminas	61
1.4.1 Por que as poliglutaminas se agregam?	65
1.4.2 Os agregados são tóxicos?	66
1.4.3 O papel da proteólise dos agregados	66
1.4.4 O modelo atual de relação entre agregados e morte celular	68
1.5 O cuidado das SCAs em geral e da DMJ em particular	69
1.5.1 O tratamento dos sintomas neurológicos	69
1.5.2 Outros cuidados	71
1.5.3 Prevenção	71
2. JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO	81
3. HIPÓTESES	83
4. OBJETIVOS	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
6. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS	107

6.1 Artigo 1	108
A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 49 new families with Machado-Joseph disease or SCA7.	
6. 2 Sua versão em português: Um estudo das ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes no sul do Brasil – achados clínicos e moleculares de 49 novas famílias com doença de Machado-Joseph ou SCA7.	134
6.3 Artigo 2	152
Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil.	
6.4 Sua versão em português: A doença de Machado-Joseph: caracterização clínica e molecular de novas famílias provenientes do sul do Brasil	182
6.5 Artigo 3	206
Neurological findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes and (CAG) _n	
6.6 Sua versão em português: Manifestações neurológicas na doença de Machado-Joseph: a sua relação com a duração da doença, com os tipos clínicos e com o tamanho da expansão CAG	237
6.7 Artigo 4	265
Searching modifier factors of the Machado-Joseph disease phenotype: a study on SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts	
6.8 Sua versão em português: A busca pelos fatores modificadores da doença de Machado-Joseph: um estudo sobre as repetições CAGs dos genes SCA2, SCA6 e DRPLA.	289
7 CONCLUSÕES	304
8 ANEXOS	308

SUMÁRIO DAS TABELAS

	página
TABELA 1. Introdução	76
Classificação de Konigsmark e Weiner (1970) das atrofas olivopontocerebelares.	
TABELA 2. Introdução	77
Classificação de Anita Harding das Ataxias Cerebelares Autossômicas Dominantes	
TABELA 3. Introdução	78
Classificação genotípica das ataxias cerebelares autossômicas dominantes.	
TABELA 4. Introdução	79
Achados neuropatológicos na DMJ	
TABELA 5. Introdução	80
Doenças genéticas devidas a expansões CAG	
Table 1. Artigo 1	133
Molecular diagnoses found in the general sample of patients	
Tabela 1. Artigo 1	151
Diagnósticos realizados na presente amostra de doentes (o mesmo conteúdo da anterior)	
Table 1. Artigo 2	178
Age at onset and anticipation in MJD patients, according to gender, to affected parents and to clinical types.	
Tabela 1. Artigo 2	202
As idades de início e as antecipações nos pacientes, de acordo com o sexo, com o genitor afetado e com o tipo clínico(o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 2. Artigos 2 e 3	180
Neurological findings among MJD patients	231
Tabela 2. Artigos 2 e 3	204
Achados neurológicos dos pacientes com DMJ (o mesmo conteúdo da anterior).	259

Table 3. Artigo 2	181
Comparison between the present Brazilian patients and Portuguese Azorean cases already described.	
Tabela 3. Artigo 2	205
Comparação entre os pacientes do presente estudo e outros pacientes portugueses e brasileiros, descritos por outros autores (o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 1. Artigo 3	230
Clinical characteristics of the present sample	
Tabela 1. Artigo 3	258
Características clínicas da amostra estudada (o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 3. Artigo 3	232
Degree of severity of each neurological sign	
Tabela 3. Artigo 3	260
A gravidade de cada sinal neurológico estudado na presente amostra (o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 4. Artigo 3	234
Associations found between neurological signs and disease duration, disease incapacitation (gait ataxia), clinical types, and CAG length	
Tabela 4. Artigo 3	262
As associa�es encontradas entre os achados neurológicos e a dura�o da doença, a incapacita�o (ataxia de marcha), os tipos clínicos e os tamanhos das repeti�es CAG (o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 5. Artigo 3	236
CAG repeat lengths in pyramidal and dystonic findings	
Tabela 5. Artigo 3	264
O tamanho das repeti�es CAG entre dois achados neurológicos (o mesmo conteúdo da anterior).	
Table 1. Artigo 4	284
Distribution of (CAG) _n length at the SCA2, SCA6 and DRPLA loci of MJD patients, according to their clinical type.	

Tabela 1. Artigo 4

302

Distribuição dos tamanhos dos (CAG)_n dos loci SCA2, SCA6 e DRPLA nos pacientes com DMJ, de acordo com os seus tipos clínicos (o mesmo que a anterior).

SUMÁRIO DAS FIGURAS

- Figura 1 Artigo 2 – A duração da doença entre os 3 tipos clínicos, na presente amostra. A duração média da doença foi de 5,37 anos (dp=3,4) no tipo 1, de 8,4 anos (dp=5,7) no tipo 2, de 11,6 anos (dp=5,8 no tipo 3 e de 15 anos (dp=5,6) nos casos “inclassificáveis”. Os tipos 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas ao serem comparados com os demais, inclusive quando comparados um com o outro. 173
- Figura 2 Artigo 2 – A distribuição da antecipação, de acordo com o sexo do genitor afetado. 174
- Figura 3 Artigo 2 – As frequências dos tamanhos das seqüências repetitivas CAG nos alelos normais e nos expandidos. Os alelos normais contém entre 14 e 38 repetições, sendo mais freqüente o de 24 repetições. Os expandidos contém entre 71 e 85 repetições, o mais comum sendo o de 73 repetições. 175
- Figura 4 Artigo 2 – A correlação do comprimento das repetições CAG no gene MJD1 com a idade de início. Um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,48$ foi obtido entre as variáveis. 176
- Figura 5 Artigo 2 – A distribuição dos tamanhos das repetições CAG entre os tipos clínicos. Os pacientes com o tipo 1 tiveram alelos maiores – com média de 80 (dp=3) repetições – do que os pacientes com os tipos 2 e 3 – com média respectivamente de 75,3 (dp = 2) e de 74,2 (dp = 1,6) ($p < 0,0001$, ANOVA). 177
- Figura 1 Artigo 3 – A progressão da disartria, da disfagia e das fasciculações de acordo com a duração da doença. 227
- Figura 2 Artigo 3– A maneira como alguns dos achados neurológicos pioraram com a progressão da doença: (a) oftalmoparesias; (b) achados piramidais; (c) fasciculações e (d) disfagia. 228

- Figura 3 Artigo 3– A maneira como alguns dos achados neurológicos não se modificaram com a progressão da doença: (a) nistagmo, (b) retração palpebral; (c) atrofia óptica e (d) rigidez/bradicinesia 229
- Figura 1 Artigo 4 – A presença da rigidez e/ou bradicinesia de acordo com o tamanho do (CAG)_n do alelo maior do gene SCA6. 286
- Figura 2 Artigo 4 – A correlação entre a gravidade das fasciculações e o tamanho do (CAG)_n do alelo maior do gene SCA2. 287
- Figura 3 Artigo 4 - A correlação entre o grau da perda sensorial e o tamanho do (CAG)_n nos alelos SCA2. 288

1. INTRODUÇÃO

O movimento propositado provavelmente surgiu no mundo com o aparecimento da vida. Em sua essência, ele é a expressão de uma vontade, presente mesmo no mais simples organismo unicelular. Essa expressão da vontade, ou de um propósito, fica mais aparente na medida em que se sobe na escala filogenética. Então, tanto o “querer” como o movimento crescem em complexidade, até ambos alcançarem, por um lado, um estatuto filosófico e, por outro lado, uma conformação anátomo-funcional da qual, sem dúvida, um dos principais órgãos é o cerebelo.

A realização de um movimento, especialmente se ele envolve muitos grupos musculares, necessita que os músculos agonistas, os antagonistas, os sinergistas e os músculos fixadores de articulações estejam correlacionados. Músculos agonistas e sinergistas contraem-se para executar o movimento: os antagonistas relaxam-se para facilitá-lo. Músculos fixadores impedem deslocamentos ou mudanças na postura apropriada do animal. Todas essas contrações ou relaxamentos individuais devem se realizar de modo sinérgico ou coordenado, no qual também a velocidade do movimento, a distância que ele cobre e a sua força sejam corretamente calculadas. Essa função neurológica, denominada de “coordenação”, é realizada pelo cerebelo (DeJong, 1979) (1).

Boa parte das funções cerebelares – reunidas no conceito de coordenação - foram deduzidas a partir da observação dos efeitos de suas doenças. O efeito principal de uma doença do cerebelo e de suas conexões é a ataxia, palavra de origem grega que significa,

literalmente, confusão, embora o seu sentido moderno seja o de incoordenação (Caldas Aulete, 1964) (2).

Quando evidente nas extremidades, a ataxia apresenta-se através de um tremor de ação e de movimentos dismétricos e decompostos em seus subgrupos articulares. Há freqüentemente dificuldade de um movimento ser sucedido por seu antagonista (disdiadococinesia). Quando a ataxia envolve a musculatura fonatória, a consequência é um defeito na articulação da palavra (fala disártrica). Quando, finalmente, a ataxia envolve a musculatura axial do corpo, o resultado é um desequilíbrio tanto durante a postura estática quanto durante a marcha. O indivíduo afetado oscila e tende a cair e, para evitá-lo, afasta seus pés, aumentando o assim chamado polígono de sustentação.

Inúmeras doenças genéticas manifestam-se como ataxias.

A expressão “ataxia espinocerebelar” tem sido utilizada para designar as doenças genéticas do cerebelo e de suas conexões, tanto as autossômicas recessivas como, principalmente, as autossômicas dominantes. As formas recessivas têm identidades e nomes já muito tradicionais, como a ataxia de Friedreich e a ataxia telangiectasia. Além dessas, novas entidades recessivas têm sido descritas, em consequência da descoberta de seus defeitos metabólicos específicos, e muitas vezes a nova ataxia recessiva acaba recebendo um nome que a remete à condição fisiopatológica de base. É o que sucede com a ataxia por deficiência de vitamina E, com a gangliosidose GM2 do adulto e com a acidemia L-2-hidroxi-glutárica. Trata-se de um procedimento bastante razoável, pois há muito pouco em comum entre essas condições, além da própria ataxia, para mantê-las reunidas sob nomes

semelhantes.

Assim, o uso melhor e mais freqüente do termo “ataxia espinocerebelar” tem sido o de designar as ataxias herdadas de modo dominante. Essas compreendem ao menos 12 entidades, dificilmente distinguíveis por um clínico atento, e que compartilham de um mesmo mecanismo mutacional. Ambas essas semelhanças – a do fenótipo e a da etiologia – são fortemente sugestivas de que muitas dessas doenças neurodegenerativas possam ser reduzidas a uma via patogénica comum. Para elas, então, a expressão “ataxia espinocerebelar” se consagrou, especialmente o seu acrônimo SCA, do inglês *spinocerebellar ataxia*.

1.1 As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes ou SCAs: Notas históricas

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (SCAs) caracterizam-se por serem herdadas de modo vertical, por se apresentarem em geral na vida adulta e por possuírem uma grande heterogeneidade clínica.

As pessoas afetadas apresentam uma série de achados neurológicos cerebelares, como a ataxia axial, a disartria, o nistagmo, a dismetria, a disdiadococinesia, a decomposição de movimentos e o tremor de intenção, resultantes do envolvimento do cerebelo e de suas vias aferentes e eferentes. Embora essas manifestações sejam predominantes, costuma haver alterações também nos gânglios da base, no tronco cerebral, na medula espinal, nos nervos ópticos, na retina e nos nervos periféricos. Em famílias muito grandes onde uma SCA esteja se segregando, pode haver uma extensa gradação de

sintomas, desde manifestações cerebelares puras, até achados cerebelares e de tronco cerebral, ou cerebelares e extrapiramidais, ou cerebelares e de medula espinal, ou cerebelares e de nervos periféricos. Ou seja: a história familiar é consistente com a herança autossômica dominante de um único gene principal, mas os fenótipos resultantes são individualmente tão heterogêneos que não poderiam ser extrapolados para servirem de critério diagnóstico para casos de fora dessa família (Harding, 1984) (3).

Por essas razões, a classificação deste complexo grupo de doenças foi um desafio para o qual os investigadores anteriores à era molecular, desde Holmes (1907) (4), jamais chegaram a um consenso. Classificações acadêmicas divergentes foram produzidas por Greenfield, Konigsmark e Weiner e Harding (3, 5, 6) (Tabelas 1 e 2). A controvérsia repercutiu, por exemplo, na nomenclatura. Esse grupo de distúrbios cerebelares ora foi chamada de ACAD - ataxias cerebelares autossômicas dominantes de início tardio - (Harding, 1984) (3), ora de ataxias cerebelares da vida adulta, ora de ataxias cerebelares “plus” (Baraitser, 1990) (7), ora de ataxias espinocerebelares. Para quem está algo familiarizado com as mesmas, estes “títulos-guarda-chuva” incluíam basicamente a doença dos Açores ou de Machado-Joseph (DMJ) e as atrofia olivo-ponto-cerebelares autossômicas dominantes.

O primeiro sucesso nas tentativas de se ligar algumas famílias com SCA a um marcador genético aconteceu em 1974, quando Yakura e colaboradores relataram a existência de uma ligação entre o genótipo HLA e a ataxia então chamada de ACAD tipo I. Os autores concluíram que o gene mutante estaria a 12 centimorgans do complexo HLA no cromossomo 6 (6p22-p23). O locus da doença foi então chamado de *SCA1* (Yakura *et al*,

1974; Jackson *et al*, 1977; Zoghbi *et al*, 1988) (8, 9, 10).

Em 1990, Orozco e colaboradores descreveram 263 pacientes provenientes da província de Holguín, em Cuba (11). Esses pacientes tinham ancestrais comuns e compunham o maior grupo com ACAD de origem homogênea jamais descrito. Havia considerável variação clínica dentro das diversas famílias. Mesmo assim, enquanto alguns sinais comuns a outras ACAD I eram raros entre os cubanos – rigidez parkinsoniana, atrofia óptica, espasticidade -, uma lentificação das sacadas era caracteristicamente encontrada. Com isso, sugeriu-se que a “ataxia de Holguín” seria diferente da SCA1 e das demais, chamando-se desde então de SCA 2.

O problema básico para o investigador das ACADs ou SCAs era a ausência de um marcador metabólico – por exemplo, um depósito - que indicasse qual seria sua base molecular. Quando a estratégia da análise de ligação foi estendida às relações entre fenótipo (doença) e polimorfismos de restrição de DNA (marcando a localização do gene responsável) , finalmente vários *loci* das ACAD tipo I acabaram por ser mapeados.

Até 1993, as únicas evidências de ligação eram aquelas obtidas da SCA1 com o *locus* HLA. A partir de 1993, porém, houve uma rápida sucessão de descobertas brilhantes, em relação à localização e à identificação de outros genes responsáveis. Orr e colaboradores (1993) (12) confirmaram que a SCA1 se localizava no cromossomo 6p22-23 e demonstraram a presença de uma seqüência repetitiva de codons CAG altamente polimórfica nessa posição, e que se encontrava expandida entre os doentes.

Depois, o locus da SCA2 foi mapeado no cromossomo 12q23-q24.1 (Gispert *et al*, 1993) (13). Takiyama e colaboradores, também em 1993, localizaram o gene da doença de Machado-Joseph no cromossomo 14q24.3-q32 e o denominaram de gene *MJD1* (14).

As descobertas prosseguiram velozmente no ano de 1994. O gene *MJD1* foi clonado e a mutação patogênica identificada era, de novo, uma expansão de seqüência repetitiva CAG (Kawaguchi *et al*, 1994) (15). Em 1994, Koide e colaboradores relataram que a síndrome autossômica dominante conhecida como “atrofia dentato-rubro-pálido-luysiana” (DRPLA) e caracterizada por uma ataxia progressiva, coreoatetose, distonia, convulsões, mioclônus e demência, mapeava-se no cromossomo 12p12-ter (16). Nessa localização, havia uma expansão instável de uma seqüência CAG nos afetados pela DRPLA. Na seqüência de datas, devemos incluir o trabalho de Stevanin e colaboradores (1994) (17), no qual eles sugeriram a existência de um terceiro *locus*, chamado de *SCA3*, em uma família onde eles excluíram ligação com os recém-descobertos *loci SCA1* e *SCA2* (na verdade, o *locus SCA3* era o mesmo do já descoberto *locus MJD1*). Também em 1994, Gardner e colaboradores, usando o marcador microssatélite D16S422, relataram uma família adicional cujo gene se localizava no 16q24-ter e que passou a se chamar de *SCA4* (18). Um grande ramo de descendentes de familiares de Abraham Lincoln nos quais uma ACAD I se manifestava foi também estudado, e o *locus* dos mesmos foi mapeado no cromossomo 11cen, sendo chamado de *SCA5* (Ranum *et al*, 1994a) (19). Demonstrou-se também que famílias com ataxia dominante e retinopatia – a assim chamada ACAD tipo II – não tinham ligação alguma com os loci *SCA1* e *SCA2*, propondo-se chamar sua condição de *SCA7* (Benomar *et al*, 1994; Gouw *et al*, 1994) (20, 21).

Em 1995, o gene da SCA7 foi mapeado no cromossomo 3p (Benomar et al, 1995; Gouw et al, 1995) (22, 23) ; nele, uma repetição CAG expandida e instável foi também identificada (David et al, 1997) (24). Em 1996, a presença de uma expansão CAG foi confirmada no gene da SCA2 (Imbert et al, 1996; Pulst et al, 1996) (25, 26). No ano seguintes, o locus da SCA6 foi mapeado no cromossomo 19p, no qual também uma seqüência repetitiva CAG expandida estava presente (Zhuchenko et al, 1997) (27).

Em 1999, quatro novos *loci* foram localizados e em alguns casos, as mutações foram identificadas. O gene da SCA8 foi mapeado no cromossomo 13q: a mutação era constituída de uma seqüência repetitiva CTG, localizada em uma região não transcrita do gene (Koob et al, 1999) (28). Depois, em uma família mexicana, localizou-se um novo gene, ainda não identificado, no cromossomo 22q, e que foi denominado de *SCA10* (Zu et al, 1999) (29). A SCA11 foi localizada no cromossomo 15q em uma família cujas manifestações eram quase exclusivamente cerebelares (Worth et al, 1999) (30). O último gene identificado, relacionado às SCAs, foi localizado no cromossomo 5q31-33: a mutação responsável era uma seqüência repetitiva CAG, e a entidade foi chamada de SCA12 (Holmes et al, 1999) (31).

As características clínicas e moleculares dessas diferentes doenças serão abordadas nas seções 1.2.3 , 1.2.5 e 1.3 (p. 26, 35 e 47). Pela velocidade e pelo padrão com que essas descobertas vêm se acumulando, é muito provável que a presente revisão se desatualize em questão de meses.

Quase todos (se não todos) os genes associados às SCAs apresentam o mesmo tipo

de mutação, as chamadas mutações dinâmicas, devidas a expansões de repetições CAG. As mesmas também podem ser encontradas em outras doenças neurológicas, como a doença de Huntington (HD) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) (32) e a atrofia muscular espinal e bulbar ligada ao X, ou doença de Kennedy (La Spada *et al*, 1991) (33). Além disso, grandes expansões de outros tripletos repetitivos, localizados em regiões não transcritas do gene, também são responsáveis por várias síndromes de sítios frágeis – CGG e GCC (Willems, 1994) (34) -, pela distrofia miotônica - CTG (Strong e Brewster, 1997) (35) - e pela ataxia de Friedreich - GAA (Campuzano *et al*, 1996) (36).

À exceção da SCA8 e possivelmente da SCA12, em todas as SCAs cujos genes foram clonados, a expansão da seqüência repetitiva CAG localiza-se em uma região transcrita do gene e produz, dentro do peptídeo traduzido, um trato de poliglutaminas. Embora não conheçamos, na maioria dos casos, as funções do peptídeo traduzido, já sabemos que a introdução de um longo segmento de glutaminas no mesmo é a causa da doença. Ratos transgênicos que passaram a traduzir tratos de poliglutaminas, tiveram um quadro de degeneração cerebral bastante semelhante à doença dos humanos (Jones *et al*, 1997) (37). Estudos sobre tratos de poliglutaminas expressados em células COS-7 demonstraram que esses tratos se agregam no citoplasma perinuclear e no próprio núcleo (Paulson, 1999) (38), formando um complexo que parece ser dificilmente degradado. As células que desenvolveram esses agregados degeneraram e morreram. As evidências atuais relacionadas à fisiopatologia das poliglutaminas serão revisadas na seção 1.4 (p. 61).

Embora o nosso conhecimento sobre a fisiopatologia das SCAs ainda seja muito limitado, as fortes semelhanças clínicas encontradas entre elas têm agora uma base comum.

Todas (ou quase) são causadas por uma mutação que confere um ganho de função tóxica ao produto protéico (o trato de poliglutaminas). Em todos os casos, há uma correlação invertida entre a idade de início da doença e o tamanho da expansão CAG encontrada. Em todas, também, a expansão CAG é instável nas mitoses e nas meioses, sendo que a instabilidade meiótica tende a ser maior em um dos genitores. Isso explica o fenômeno da antecipação observado em praticamente todas as doenças causadas por mutações desse tipo: por exemplo, os filhos e filhas de um indivíduo afetado pela DMJ tenderão a começar a apresentar os sintomas mais cedo do que ele mesmo, especialmente se o genitor for homem (DeStefano et al, 1996) (39). As peculiaridades da herança da DMJ serão abordadas na seção 1.2.4 (p. 33), enquanto suas características moleculares o serão na seção 1.2.5 (p. 35).

Apesar de trazer novos fatos que aguardam explicação, é inegável que a caracterização molecular foi a grande e única responsável por uma classificação racional das SCA, (Rosenberg, 1995) (40) sintetizada na Tabela 3. O completo esclarecimento da heterogeneidade clínica e genética desse grupo de doenças ocorrerá quando todos os genes associados às mesmas estiverem plenamente identificados e caracterizados.

1.2 A doença de Machado Joseph

1.2.1 A história da doença de Machado-Joseph e sua definição

A doença de Machado-Joseph é uma degeneração espinocerebelar, autossômica dominante, mais freqüentemente encontrada em pacientes descendentes de portugueses provenientes do arquipélago dos Açores.

Três famílias foram inicialmente descritas, nos anos 70, e todas elas apresentavam substancial variabilidade clínica (Nakano et al, 1972; Woods e Schaumburg, 1972; Rosenberg et al, 1976) (41, 42, 43). A família descrita por Nakano descendia de William Machado, um habitante da ilha de São Miguel, nos Açores: havia uma ataxia progressiva, nistagmo, hiporreflexia, variados graus de amiotrofia e sinais de lesão no cordão posterior da medula. O autor nomeou o distúrbio de doença de Machado: a maioria dos descendentes dessa linhagem ainda mora na ilha de São Miguel. Também em 1972, Woods e Schaumburg descreveram doentes provenientes dessa mesma ilha, vivendo na época em Massachusetts, identificando-os como a “família Thomas” (42). Uma terceira família açoriana, chamada Joseph, nos Estados Unidos, foi a seguir descrita por Rosenberg (1976) (43): em sete gerações, havia a ocorrência de ataxia progressiva, disartria, nistagmo, bradicinesia, fasciculações de língua e de face, posturas distônicas, hiperreflexia e Babinski. Esses doentes viviam na Califórnia e descendiam de um ancestral açoriano que emigrou em 1844 da ilha de Flores para a costa oeste americana. Desde então, tentou-se reunir todas estas doenças descritas isoladamente sob o termo “doença dos Açores” ou “doença de Machado Joseph” (DMJ) (Coutinho e Andrade, 1978) (44).

A partir de 1976, mais e mais doentes afetados pela DMJ foram descritos entre açorianos, portugueses, brasileiros e americanos de origem açoriana (Coutinho e Andrade, 1978; Lima e Coutinho, 1980; Barbeau et al, 1984; Lisboa e Mariotto, 1984; Radvany et al, 1988) (44, 45, 46, 47, 48). Embora a ausência de um marcador biológico até 1994 tornasse difícil o seu diagnóstico, com base apenas nas manifestações clínicas, em doentes de outras origens étnicas, houve autores que o fizeram, entre japoneses (Sakai et al, 1983) (49),

indianos (Bharucha et al, 1986) (50), aborígenes australianos (Burt et al, 1993) (51) e judeus iemenitas (Goldberg-Stern et al, 1994) (52).

Em 1993, o *locus* da doença foi mapeado no cromossomo 14q32.1 em famílias japonesas (Takiyama et al, 1993) (14) e, em 1994, o seu gene foi identificado e denominado de *MJD1*. Demonstrou-se que o gene continha um motivo repetitivo CAG na sua seqüência codificadora e que esse motivo estava expandido (praticamente duplicado) nos doentes (Kawaguchi et al, 1994) (15). A DMJ tornou-se, assim, mais uma doença neurodegenerativa e hereditária a ser causada por uma expansão de seqüência repetitiva CAG. A descoberta da mutação causal tornou também possível o diagnóstico definitivo da condição nos afetados. Pacientes nos quais os médicos hesitariam em suspeitar de DMJ, foram assim cada vez mais diagnosticados. A descoberta da mutação CAG desencadeou também uma série de desdobramentos cujas conseqüências ainda estamos longe de prever - o diagnóstico preditivo dos casos pré-sintomáticos, o estudo molecular das origens das mutações, os estudos sobre a biologia celular da condição, e assim por diante.

1.2.2 Epidemiologia

Os melhores estudos epidemiológicos existentes referem-se às populações onde a DMJ provavelmente se originou, ou seja, às populações portuguesas e açorianas. Em Portugal, as prevalências calculadas para a DMJ são: 3.8/100.000 habitantes em Portugal (continente e ilhas); 36.9/100.000 nos Açores (27.1 na ilha de São .Miguel e 835.2 na de Flores) e 1/100.000 no continente (havendo uma região com freqüência elevada, o

concelho de Chamusca, com 102/100.000 (Sequeiros, 1989 e 1993; Coutinho et al, 1994) (53, 54, 55). Além disso, sabe-se que, nos Açores e na comunidade luso-americana da América do Norte, a prevalência de heterozigotos (o que inclui indivíduos assintomáticos, que são a maioria, e indivíduos já doentes) para a DMJ é de 50/100.000.

Esses valores foram inicialmente calculados a partir do número de pacientes e de seus familiares também afetados e ainda vivos, identificados a partir dos heredogramas (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56). Nos últimos anos, os dados epidemiológicos sobre as ataxias, em Portugal, provêm de um rastreio sistemático, de base populacional, realizado desde 1993 e que até o momento já cobriu quase metade da população total (Sequeiros, comunicação pessoal).

Os primeiros relatos sobre famílias brasileiras com o diagnóstico clínico de DMJ foram apresentados na década de oitenta e no início dos anos noventa (Lisboa e Mariotto, 1984; Radvany et al, 1988; Teive et al, 1991 e 1994; Cassa et al, 1994) (47, 48, 57, 58, 59). Depois deles, dois estudos de casos, baseados em achados moleculares, apresentaram estimativas sobre as freqüências relativas de algumas das SCAs, incluindo a DMJ, entre 54 e 19 famílias afetadas, provenientes de diversas regiões brasileiras (Lopes-Cendes et al, 1997 a e 1997b; Iughetti et al, 1998) (60, 61, 62). Nesses estudos, a mutação *MJD1* foi encontrada em respectivamente 44 e 68% dos doentes com história familiar positiva. Infelizmente, ainda não se dispõe de dados sobre a prevalência da DMJ na população brasileira.

1.2.3 Manifestações clínicas e patológicas

Pode-se dizer que embora nada exista na clínica, ou mesmo na anátomo-patologia, que distinga *com precisão* a DMJ das outras SCAs, há uma constelação de achados neurológicos e familiares que tornam o seu diagnóstico bastante sugestivo (Harding, 1984; Baraitser, 1990; Rosenberg, 1995; Sequeiros e Coutinho P, 1990 e 1993; Lopes-Cendes et al, 1996a) (3, 7, 40, 63, 64). Por exemplo: embora os pacientes com DMJ tenham maior frequência de distonia e de amiotrofia (Coutinho e Andrade, 1978; Coutinho e Sequeiros J, 1981) (44, 65), estes sinais podem também ocorrer nas outras SCAs. Os achados anátomo-patológicos dos pacientes com Machado-Joseph são semelhantes aos dos antigos ACAD tipo I: há degeneração da *substantia nigra*, da ponte e do núcleo denteado. Até há pouco tempo, a maioria dos autores acreditava que as olivas inferiores eram poupadas e que a presença de alterações nas mesmas praticamente excluiria a DMJ. Entretanto, a descrição de dois doentes canadenses com diagnóstico molecular de DMJ, nos quais havia atrofia das olivas inferiores, acabou por descartar esse achado patológico como um critério definitivo de exclusão (Lopes-Cendes et al, 1996b) (64).

Desde as primeiras descrições, a DMJ foi considerada uma doença bastante pleiomórfica. Parte disso se explica pela variação na idade de início, e por três tipos de evolução a ela relacionados. Quanto mais precoce, mais graves e menos periféricos são os sintomas, e vice-versa. A observação de três cursos clínicos diversos substanciou uma classificação clínica que hoje é bem aceita, a qual faremos menção logo mais.

Entre as melhores descrições clínicas da DMJ, estão a de 143 casos portugueses

(Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994) (56, 66) e a de 138 casos de um estudo internacional com o qual colaboraram inúmeros investigadores dessa doença (Barbeau et al, 1984) (46). Vamos tomá-los como base durante um longo trecho dessa revisão.

1.2.3.1 Idade e modo de início, e duração total da doença

A idade de início média varia de acordo com a população. Sabe-se que ela fica entre os 38-40 anos, entre pacientes portugueses ou de ascendência portuguesa, mas que ela tende a ser mais precoce, em torno dos 24 anos, entre indianos, japoneses e afro-americanos (Barbeau et al, 1984; Sequeiros J e Coutinho P, 1993; Coutinho, 1994) (46, 56, 66). Um estudo de 34 casos brasileiros apontou para uma idade de início média de 34 anos (Lopes-Cendes et al, 1997) (60). As idades de início variam, porém, de 1 a 73 anos ou mesmo mais: já houve heterozigotos que chegaram aos 90 anos livres de sintomas (Sequeiros, 1993) (54). Calcula-se que a penetrância seja de 98%. Não há diferença nas idades de início de homens e de mulheres.

Entre os descendentes de açorianos, a idade de início se associa à origem geográfica dos indivíduos. As famílias originárias da ilha de São Miguel (uma das mais orientais), como a família Machado, apresentam idades de início 8 anos mais tardias, em média, do que as famílias originárias da ilha de Flores (a mais ocidental e mais tardiamente colonizada) (Sequeiros, 1989 e 1993) (53, 54).

A ataxia de marcha foi a forma de apresentação em 92% de 143 casos portugueses, enquanto nos demais pacientes a queixa inicial foi a de diplopia. (Sequeiros J e Coutinho P,

1993; Coutinho, 1994) (56, 66).

A duração média da doença – o tempo entre o seu início e a morte do doente – foi de 15,6 anos, entre os portugueses (variando de 7 a 29 anos) (Sequeiros J e Coutinho P, 1993) (56), e de 21 a 25 anos, entre os alemães (Klockgether et al, 1998) (67).

1.2.3.2 Achados cerebelares

Os achados cerebelares, presentes em 97,8% dos casos portugueses, compreenderam a ataxia de marcha, disartria e incoordenação apendicular, nessa ordem de aparecimento e de gravidade (Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994) (56, 66). Os autores notaram, por outro lado, a ausência de tremor de intenção em seus 143 casos.

1.2.3.3 Manifestações oculares

Presente em 90,5% dos casos portugueses, o mais comum era a oftalmoplegia supranuclear, inicialmente limitando o olhar vertical para cima e a convergência, e evoluindo anos depois para a limitação do olhar lateral. Somente em 19,1% dos casos, Sequeiros e Coutinho encontraram oftalmoparesia nuclear e, em menos ainda, o envolvimento das pupilas (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56).

A maioria dos seus pacientes tinha nistagmo horizontal ou pendular, ou ainda sacadas lentas. Aqueles autores entenderam que o nistagmo desapareceria com a piora da oftalmoplegia.

A retração palpebral é considerada um achado típico da DMJ, e esteve presente em 25,7% dos casos portugueses (Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994) (56, 66).

1.2.3.4 Achados piramidais

A hiperreflexia foi vista em 79,2% dos casos de Sequeiros e Coutinho examinados nos primeiros anos da doença. Também foi um achado freqüente em indivíduos ainda assintomáticos. Com o estabelecimento da doença, apareceram também o sinal de Babinski, clônus aquileu e espasticidade. Sinais pseudobulbares foram vistos em 14,3%. Os mesmos autores relataram que os achados piramidais tendem a se esmorecer com o aparecimento dos sinais de lesão dos nervos periféricos (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56).

1.2.3.5 Sinais de neurônio motor inferior e de nervos periféricos (inclusive cranianos)

No estudo que estamos usando como base para a descrição clínica, há uma combinação de achados de neurônio motor inferior e de nervo periférico que pode dificultar um pouco nossa compreensão. No todo, esses achados estavam presentes em 55% dos casos de Sequeiros e Coutinho. A gravidade do envolvimento periférico variou desde a ausência do reflexo aquileu (com exaltação dos demais) até uma marcada amiotrofia distal e fraqueza muscular. Fasciculações foram vistas em 13% dos seus casos. Em 29%, foram encontradas alterações sensoriais – cinético-posturais, vibratórias ou táteis (56).

Oftalmoplegia nuclear ou paresia facial periférica foram vistas ocasionalmente em casos avançados de Sequeiros e Coutinho. Em contrapartida, em 54% dos casos, foram vistas fasciculações de contração da musculatura periocular e perioral; e também fasciculações na língua (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56).

1.2.3.6 Sinais extrapiramidais

Sequeiros e Coutinho acharam distonia em 29% dos seus casos. Ela foi descrita como correspondendo a posturas anormais dos últimos dedos ou do hálux, desencadeadas pelo movimento voluntário (56). A distonia eventualmente também interferia com a fala. Como não são posturas sustentadas, já se sugeriu o uso melhor da expressão “movimentos distônicos”, ao invés de “distonia” (Barbeau et al, 1984) (46).

Em 13% apenas dos pacientes portugueses, observaram-se também outros achados extrapiramidais, como bradicinesia, amimia e rigidez plástica. A característica desses achados nunca foi, porém, parkinsoniana (Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994) (56, 66).

1.2.3.7 Outros achados

A disfagia foi observada em 59% dos casos, relacionada a achados piramidais, no início, e a sinais bulbares, depois. Muitos doentes se engasgavam com a saliva (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56).

Distúrbios do sono – insônia, pesadelos, gritos noturnos e agitação – foram vistos em 47% dos doentes portugueses; também 54% dos pacientes apresentaram importante

perda de peso depois de 5 a 10 anos do início da doença (Sequeiros e Coutinho, 1993) (56).

1.2.3.8 Cronologia dos sintomas e história natural da doença

Segundo os autores portugueses, os sintomas iniciais seriam sempre os piramidais e os cerebelares, seguidos em dois anos pelo aparecimento da oftalmoplegia. Cinco anos depois do início, apareceriam ou sinais extrapiramidais, ou de corno anterior, ou nenhum deles, agravando-se apenas os achados iniciais (Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994) (56, 66). Essas três alternativas correspondiam aos três fenótipos ou tipos clínicos propostos muito tempo antes, por Coutinho e Andrade, em 1978 (44).

A história natural da DMJ ainda não foi investigada por nenhum estudo prospectivo de longa duração. Paula Coutinho relatou ter realizado um *follow-up* de, em média, 3,5 anos em seus doentes, um tempo que é relativamente pequeno, em comparação com a duração da doença (Coutinho, 1994) (66). A maior parte do conhecimento sobre a evolução dos sintomas foi obtida pela comparação dos escores de gravidade dos achados principais – os cerebelares, os piramidais e os periféricos – com a duração da doença, relatada pelo paciente. Usando-se esse artifício, viu-se que todos esses achados principais pioram com a passagem do tempo, até aproximadamente os 20 anos de doença. Nesse ponto da doença, os escores da espasticidade caem vertiginosamente, em consequência da piora dos achados periféricos – ou seja, da neuropatia e da doença do corno anterior da medula (Barbeau et al, 1984; Coutinho, 1994) (46, 66) .

Os assim chamados “sinais secundários” também têm uma evolução pouco

conhecida. Apenas um estudo afirmou ser a oftalmoplegia externa claramente progressiva, enquanto negou que o nistagmo fosse (Barbeau et al, 1984) (46).

1.2.3.9 Fenótipos clínicos

Em 1978, Coutinho e Andrade propuseram a seguinte classificação dos portadores da DMJ (44), classificação que está plenamente em uso:

tipo 1 – de início precoce (24, 6 anos, nas séries portuguesas) e curso mais rápido, seria também o menos comum (12,7% dos casos portugueses). Caracteriza-se, além dos achados cerebelares e oftalmoplégicos, por sinais piramidais e extrapiramidais intensos (Coutinho e Andrade, 1978) (44).

tipo 2 - forma intermediária, tem sua idade de início ao redor dos 40,3 anos, e se caracteriza pela presença de incoordenação, com ou sem achados piramidais e oftalmoplegia progressiva. Os achados periféricos e extrapiramidais são leves ou ausentes. Diz-se que todos os pacientes são do tipo 2, no início da doença, e que somente depois de 5 anos de evolução é que os tipos 1 e 3 se estabelecem, ou não. A classificação de um doente como sendo do tipo 2 deveria aguardar esse prazo, portanto. Os pacientes de tipo 2 correspondiam a 57% dos casos portugueses (Coutinho e Andrade, 1978) (44).

tipo 3 - de início mais tardio, em média aos 47 anos, os pacientes de tipo 3 apresentam, além da ataxia e da oftalmoplegia, sinais periféricos importantes e poucos achados piramidais ou extrapiramidais.

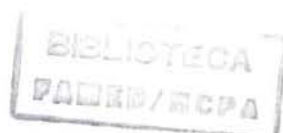
1.2.3.10 Achados patológicos

A Tabela 4 resume os achados neuropatológicos encontrados entre os poucos estudos post mortem realizados em pacientes com DMJ. A partir desses achados, pode-se dizer que a DMJ envolve: (1) vias cerebelares aferentes, ou seja, tratos espinocerebelares, vestibulo-cerebelares e ponto-cerebelares; (2) vias cerebelares eferentes, como a via dentato-rubra; (3) estruturas extrapiramidais como a substantia nigra, o locus coeruleus e o complexo pallidoluisiano; (4) neurônios motores inferiores; e (5) nervos periféricos (Sequeiros e Coutinho, 1993; Barbeau et al, 1984) (46, 56). Pode-se também dizer que a doença poupa o córtex cerebral, o striatum e os tratos corticoespinais. Até há pouco tempo se pensava que o córtex cerebelar e as olivas inferiores estavam sempre livres de envolvimento na DMJ: porém, ambas estavam atroficas nos estudos anátomo-patológicos realizados em dois pacientes mais recentes (Lopes-Cendes et al, 1996a) (64).

1.2.4 Genética clássica da doença de Machado-Joseph

A DMJ é transmitida de modo autossômico dominante. Como o seu início se dá, em geral, depois da idade reprodutiva, a maioria dos heterozigotos portadores acaba tendo filhos antes de se saberem afetados pela doença.

Como já se disse, a penetrância da DMJ é muito elevada, mas é incompleta: ela é estimada em 98% (Sequeiros, 1993) (54). Há alguns casos de portadores comprovados que permaneceram assintomáticos mesmo aos 90 anos de idade. Assim, na DMJ, a distinção entre penetrância incompleta e expressividade variável vai depender da sobrevivência dos



heterozigotos, pois houve casos nos quais a doença se iniciou aos 73 anos (Sequeiros, 1996a) (68).

Nas doenças autossômicas dominantes, se estima em 50% o risco de transmissão à prole. Entretanto, a observação clínica sugere que os gametas que trazem a mutação são, de alguma maneira, favorecidos (Ikeuchi et al, 1996; Iughetti et al, 1998) (62, 69) .

Não existem diferenças importantes entre os sexos nessa doença. Homens e mulheres tendem a ser afetados nas mesmas proporções, com a mesma gravidade e com distribuições de idade muito semelhantes (Dürr et al, 1995; DeStefano et al, 1995) (70, 39).

Os três diferentes tipos clínicos têm sido compreendidos como manifestação da expressividade variável da doença; outras vezes a sua ocorrência pode ser melhor entendida como um caso específico do que se chama, em genética, de *antecipação*.

Os tipos clínicos podem ser entendidos como resultantes da expressividade variável da DMJ, pois podem ocorrer dentro de uma mesma família e até na mesma irmandade. Isso significa que há um único gene mutante principal, comum a todos os doentes e famílias, mas que devem existir outros fatores (igualmente familiares) agindo como modificadores da idade de início e da gravidade da doença. O fenômeno de um ou outro tipo predominar em certas famílias não contradiz essa dedução – ao contrário. Sabe-se que há famílias nas quais o subtipo predominante é o 1 (como na família Joseph); que há outras nas quais ele é o tipo 2 (como na família Thomas); e que há outras nas quais ele é o tipo 3 (como na família Machado) (Barbeau et al, 1984; Sequeiros, 1993) (46, 54).

Há vezes, porém, em que a ocorrência dos três tipos em uma família pode ser melhor compreendida pelo fenômeno da antecipação. Antecipação significa “o aparecimento progressivamente mais precoce e com intensidade aumentada de uma doença em gerações sucessivas” (Thompson, 1993) (72). Até há pouco tempo atrás, antes da descoberta das mutações por expansão de segmentos repetitivos de CAGs, acreditava-se que a antecipação resultasse de um vício de averiguação. Na DMJ, a antecipação sempre foi observada em muitos pares de genitor/filho, os filhos adoecendo numa idade em torno de dez anos menor do que a de seus pais (Maruyama et al, 1995; Harper, 1997; Iughetti et al, 1998) (62, 71, 73). As descobertas moleculares sobre os segmentos repetitivos e expandidos CAG vieram a demonstrar que esse fenômeno tem base biológica. Sabe-se que existe uma tendência de o número de repetições se modificar um pouco, no gene mutante (às vezes diminuindo, mas mais freqüentemente aumentando) ao passar de uma geração para outra, na meiose (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (71, 74). Se a mutação se torna “mais patogênica” (maior), o efeito fenotípico será o de se aumentar a gravidade do quadro. E entre outras coisas, de tornar mais precoce o seu início.

O índice de correlação r entre o tamanho da seqüência CAG expandida e a idade de início é de aproximadamente $-0,68$. Em outras palavras, o tamanho da expansão CAG explica 47% da variação das idades de início, entre diferentes amostras estudadas (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (71, 74). Essa associação parcial, portanto, demonstra que outros fatores modificadores também existam, pois ela não conseguiu explicar toda a variação fenotípica da DMJ.

1.2.5 O gene da DMJ – o gene *MJD1*

Como nenhum marcador bioquímico havia sido identificado até o início dos anos 90 (o que, aliás, acontece até hoje), a identificação do gene mutante foi obtida através da estratégia conhecida como genética reversa ou, mais apropriadamente, clonagem posicional. Por essa estratégia, o investigador tenta encontrar, através do estudo de polimorfismos de DNA, regiões do genoma candidatas a abrigarem o locus procurado.

Para a localização cromossômica do gene foram utilizados primeiro polimorfismos tradicionais (marcadores genéticos proteicos) e, depois, os polimorfismos de restrição do DNA (Sequeiros et al, 1994) (75). Cada enzima de restrição corta o DNA sempre na mesma seqüência. Se essa seqüência for polimórfica, criam-se assim fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, e que são separados por eletroforese e depois reconhecidos por sondas genéticas previamente marcadas. Os polimorfismos de restrição usados mais recentemente foram aqueles gerados a partir dos polimorfismos de repetição de dinucleotídios (usualmente CA), os assim chamados *microsatélites*, e que são altamente polimórficos e informativos.

Em 1993, usando essa estratégia, o gene foi localizado no cromossomo 14q32.1 por Takiyama e colaboradores, em famílias japonesas com DMJ (14). O mapeamento do gene foi também confirmado em pedigrees de portugueses, norte-americanos e brasileiros (Sequeiros et al, 1994; Twist et al, 1995) (75, 76).

Logo a seguir, “um novo tipo de ataxia dominante”, chamada de SCA3, foi descrita em famílias francesas, alemãs e americanas (Stevanin et al, 1994; Schöls et al, 1995) (17,

77) , e foi também localizada no cromossomo 14. Hoje em dia se sabe que essas famílias são de fato portadoras da DMJ, sendo essa a sua denominação mais apropriada (Junck e Fink, 1996) (78).

O gene para a DMJ foi clonado e a mutação patogênica foi identificada, em 1994, por outro grupo japonês (Kawaguchi *et al*, 1994) (15). O gene é constituído por dois exons e por um intron. Descobriu-se que o gene (chamado de *MJD1*) contém uma região com repetições dos nucleotídios CAG perto do início do segundo exon, cujo número de repetições é polimórfico na população geral mas que, a partir de um certo limite, passa a desencadear neurodegeneração. Os indivíduos normais apresentam de 12 a 37 repetições CAG, enquanto os afetados pela DMJ podem apresentar de 61 a 84 repetições.

A mutação da DMJ consiste na expansão desse trato de CAGs (que passaremos a chamar de (CAG)*n*) sempre bem acima dos limites da variação normal, correspondendo a praticamente uma duplicação do tamanho habitual. A presença dessa mutação foi caracterizada em várias famílias com DMJ de origens variadas (Maciel *et al*, 1995) (74). Em centenas de casos já estudados, nunca se demonstrou a existência de pré-mutações – ou de segmentos (CAG)*n* de tamanho intermediário entre a faixa normal e a faixa patogênica.

1.2.5.1 Correlação genótipo-fenótipo e antecipação

Um das características específicas das mutações devidas à expansão de seqüências repetitivas de bases nucleotídicas é o fato de a expansão ser instável durante as divisões celulares, sejam elas mitóticas ou meióticas. Por isso, esse tipo de mutação é também

chamado de mutação *dinâmica*. A instabilidade meiótica foi observada em inúmeras transmissões de genitor-para-filho e explica, em parte, tanto a antecipação como a expressividade variável (Harper et al, 1997) (73).

Em primeiro lugar, há uma correlação negativa entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início. Como já mencionamos antes, essa correlação variou entre $-0,68$ e $-0,87$ (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (71, 74).

O tamanho do (CAG)_n em cromossomos específicos foi acompanhado durante a sua transmissão de pai para filho, e se viu que o segmento CAG mudou de tamanho em 55% de 58 transmissões observadas (Maciel et al, 1995) (74). A mudança de tamanho média foi de $+ 0,84$ repetições, mas a sua variação foi de -5 a 9 repetições. Viu-se também que, quando o cromossomo expandido atravessa uma meiose paterna, ele tende a ser um pouco mais instável.

Com esses achados, tentou-se explicar o fenômeno clínico da antecipação. Nesse mesmo estudo (Maciel et al, 1995) (74), dados sobre a antecipação estavam disponíveis em 22 pares de genitor-e-filho doentes. Surpreendentemente, o que se viu foi uma ausência de correlação entre a variação no tamanho do (CAG)_n e a variação na idade de início, entre o pai (ou mãe) e o filho (ou filha).

A variação no tamanho do (CAG)_n também não explica completamente a existência dos três tipos clínicos – tipos que podem ser compreendidos como uma forma de expressividade variável. Quando os tamanhos do (CAG)_n foram associados aos três tipos

da DMJ, observou-se significância estatística apenas quando se comparou o tipo 1 com os outros dois somados (o tipo 2 mais o tipo 3). Entre os descendentes de açorianos, no tipo 1, a média foi de 76 repetições; no tipo 2, foi de 73; e no tipo 3, de 72 repetições (Maciel et al, 1995) (74). Entre os japoneses, as médias foram respectivamente de 79, 74 e 72, com significâncias estatísticas semelhantes (Maruyama et al, 1995) (71). Embora haja uma diferença significativa, do ponto de vista estatístico, entre ter 76 ou ter 72 repetições CAG, o significado *biológico* desses números parece não ser tão relevante, pois há muitos indivíduos com DMJ de tipo 1 e outros com tipo 3 que têm (CAG)_n de mesmo tamanho.

Assim, a correlação entre o tamanho da expansão e as características clínicas – idade de início e manifestações neurológicas – não é perfeita ou completa. Se “apenas cerca de metade da variabilidade clínica pode ser explicada pela variação no tamanho do (CAG)_n” (Sequeiros, 1996a) (68), outros fatores genéticos e ambientais devem estar influenciando a história natural da doença. Esses fatores são chamados de *fatores modificadores* e serão revisados na seção 1.2.6.

1.2.5.2 Instabilidade meiótica e mitótica

O tamanho da repetição CAG costuma ser bastante estável ao atravessar meioses, quando ele está na faixa de variação normal (de 13 a 44 repetições). Entretanto, quando a repetição CAG está expandida, ela se instabiliza durante a divisão celular. Já se disse que o tamanho do (CAG)_n mudou de tamanho em 55% de 58 transmissões de um genitor para um filho ou filha (Maciel et al, 1995) (74). O (CAG)_n tende a aumentar, em média, uma

repetição por geração (mais precisamente, + 0,84 repetições), mas ele pode aumentar mais ou mesmo se contrair. Conhecem-se dois fatores que influenciam essa instabilidade, embora não se saiba como eles ajam. Em primeiro lugar, a instabilidade é maior quando a meiose atravessada é a paterna, tal como o que acontece (e muito mais intensamente) na HD (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; Takiyama et al, 1995; Iughetti et al, 1998) (62, 71, 74, 79).

Em segundo lugar, o alelo normal do genitor afetado pela DMJ também influencia essa instabilidade. Existe um polimorfismo CGG/GGG na terminação 3' da repetição CAG (a terminação a jusante). Viu-se que o risco relativo de haver uma grande instabilidade intergeracional (de >2 ou <2 repetições) era 7 vezes maior se os haplotipos do genitor fossem [(CAG)_n expandido – CGG] / [(CAG)_n normal – GGG] do que se os mesmos fossem [(CAG)_n expandido – CGG] / [(CAG)_n normal – CGG] ou [(CAG)_n expandido – GGG] / [(CAG)_n normal – GGG] (Igarashi et al, 1996) (80). Essa influência só pode ser devida à interação entre os dois cromossomos nas primeiras fases da meiose, e uma das hipóteses aventadas é a de que haja um fenômeno semelhante ao da conversão gênica atuando nos heterozigotos C/G.

O mosaïcismo somático do trato (CAG)_n foi demonstrado não só na DMJ (Lopes-Cendes et al, 1996b) (81), mas também na SCA1, no DRPLA e na HD (Maciel et al, 1997) (82). Esse mosaïcismo pode ser atribuído a dois períodos mitóticos diferentes. O primeiro seria o da embriogênese e o segundo, o das divisões celulares da glia durante a vida fetal e pós-uterina. Não se sabe o quanto cada uma das possibilidades contribui com o que foi observado. Em todo caso, o mosaïcismo visto entre as diferentes regiões do SNC segue um

mesmo padrão entre todas as doenças devidas à expansão CAG estudadas e não se associa aos padrões patológicos específicos de cada uma delas (Lopes-Cendes et al, 1996b; Takano et al, 1996; Maciel et al, 1997) (81, 82, 83). Ou seja, as regiões encefálicas com maiores (CAG)_n não foram sempre as primeiras a serem afetadas no processo da doença.

1.2.5.3 A transmissão não-mendeliana do alelo mutante

Já existem várias observações, na literatura, de que o número de filhos afetados excede o número dos não afetados, nas famílias com DMJ, o que contraria o princípio mendeliano da segregação randômica dos alelos. Há uma transmissão preferencial do alelo mutante, que é ainda mais significativa quando o transmissor é o pai, nas famílias com DMJ estudadas por Takiyama et al (1995), Ikeuchi et al (1996) e Iughetti et al (1998) (62, 69, 79). O mesmo já havia sido observado na distrofia miotônica e no DRPLA (Ikeuchi et al, 1996, Zatz et al, 1997) (69, 84). Esse fenômeno, chamado de distorção da segregação, costuma sugerir a existência de uma vantagem seletiva do gameta portador do alelo mutante – fenômeno conhecido como deriva meiótica. Há evidências de que algum mecanismo desconhecido que opere na fertilização ou em estágios pós-zigóticos esteja atuando e explique esse fenômeno (Leeflang et al, 1996) (85). Suas repercussões clínicas são muito importantes, pois a chance de um indivíduo em risco ser mesmo portador da DMJ não é de 50 %, mas é maior do que isso.

1.2.6 Fatores modificadores

Uma série de hipotéticos fatores modificadores foram examinados por vários

investigadores e alguns deles já foram comentados na presente revisão. Uma breve menção de cada um deles será feita aqui.

Em primeiro lugar, o próprio agente patogênico – a expansão de sequência reeptitiva CAG – apresenta uma característica variável – o seu tamanho – que pode modificar a expressão do fenótipo. Já se mencionou a existência de uma correlação negativa, incompleta, entre o tamanho da expansão e a idade de início, e a existência de uma associação entre os maiores segmentos CAG e a progressão para o tipo 1 (Kawaguchi et al, 1994; Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; Ranum et al, 1994b; Takiyama et al, 1995) (15, 71, 74, 79, 86).

Em segundo lugar, o também já comentado mosaïcismo somático poderia ser um fator modificador. Poder-se-ia supor que as células que contivessem os maiores tratos de CAG seriam as primeiras a serem afetadas. Entre os pacientes com DMJ, por exemplo, poder-se-ia especular se aqueles com o tipo 3 não teriam as maiores expansões nos neurônios motores inferiores, enquanto teriam as menores expansões nos núcleos da base. Isso infelizmente ainda não foi averigüado. As evidências obtidas sobre o papel do mosaïcismo somático na determinação do fenótipo são, ao contrário, bastante desapontadoras, como foi comentado na seção 1.2.5.2 (p. 39) (Lopes-Cendes et al 1996b; Takano et al, 1996; Maciel et al, 1997) (81, 82, 83).

Um fator modificador poderia ser o sexo do genitor afetado. O termo imprinting refere-se às diferenças fenotípicas entre as transmissões materna e paterna de uma mesma doença. Na DMJ, sabe-se que a transmissão paterna do alelo mutante é mais instável,

sofrendo ele mais contrações e também mais expansões (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (71, 74). Como o mais frequente são as expansões, filhos heterozigotos de pais afetados tendem a adoecer mais precocemente e a desenvolverem o fenótipo mais grave.

Um outro fator modificador poderia ser o alelo normal. Conhece-se ao menos uma característica do alelo normal que afeta o fenótipo da prole, ao modificar a instabilidade meiótica. Na seção 1.2.5.2 (p. 39), comentou-se que um polimorfismo intragênico devido à substituição de uma base ($C^{987}GG/G^{987}GG$) a jusante da repetição CAG, no alelo normal, estava associado às maiores expansões e contrações meióticas (Igarashi et al, 1996; Maciel et al, 1999) (80, 87).

Fatores familiares independentes do gene *MJD1* também influenciam o fenótipo da doença. Se ajustamentos são feitos em relação ao tamanho das repetições CAG, tal que a sua influência no fenótipo seja anulada, ainda assim as idades de início de irmãos e de primos permanecem muito semelhantes, com r de respectivamente 0,43 e 0,28 (DeStefano et al, 1996) (39).

1.2.7 A origem da DMJ e os estudos dos haplotipos do gene *MJD1*

A maioria dos pacientes com DMJ é de ancestralidade açoriana e a sua história acompanha a história da colonização daquelas ilhas. Os primeiros habitantes dos Açores chegaram depois de sua descoberta, pelos portugueses, em 1432. Os colonizadores do arquipélago originaram-se principalmente do norte de Portugal, de regiões conhecidas

como Trás-os-Montes e Beiras. Muito possivelmente, a mutação *MJD1* entrou nos Açores a partir dessa onda migratória, e tornou-se muito mais freqüente no arquipélago por um efeito fundador (Sequeiros, 1993) (54).

Duas linhas de evidência tornam esse suposto efeito fundador um pouco mais complexo. A primeira linha refere-se às diferenças na idade de início da doença, de acordo com a ilha de origem. A DMJ na verdade é uma doença muito prevalente em apenas duas das nove ilhas, as ilhas de São Miguel e de Flores. Essas ilhas localizam-se nos extremos opostos do arquipélago. A prevalência da doença em São Miguel é de 20 / 100.000; a prevalência, em Flores, é de 714 / 100.000. Os indivíduos afetados originários de São Miguel, assim como seus descendentes recentes (da costa leste norte-americana, Por exemplo) têm uma idade média de início que é 8 anos mais tardia do que a dos originários de Flores, o que sugere a introdução de um modificador em uma das duas subpopulações (Sequeiros e Coutinho, 1993; Sequeiros, 1993) (54, 56).

A segunda linha de evidência é aquela devida à demonstração de que os pacientes descendentes de açorianos apresentam ao menos três haplotipos intragênicos diferentes, e portanto três origens distintas (Stevanin et al, 1997) (88).

1.2.7.1 As emigrações dos Açores

Supõe-se que a difusão pelo mundo dos genes mutantes para a DMJ de origem açoriana tenha se dado com a era das grandes navegações portuguesas, nos séculos XV e XVI (Gaspar et al, 1996) (89). Com a descoberta das rotas para as Índias Orientais, os

portugueses estabeleceram entrepostos comerciais em Goa, em Bombaim, em Malaca (na Malásia), em Macau (na China), no Japão e nas Filipinas. Como as relações comerciais ali pressupunham uma convivência pacífica, é muito provável que relacionamentos mistos acontecessem com alguma frequência. (Lembramos que, no mundo contemporâneo, a DMJ foi descrita em indianos, chineses, japoneses e aborígenes australianos.)

No século XVIII, por sua vez, a população brasileira recebeu um significativo aporte especificamente de açorianos, que emigraram de seu arquipélago devido às suas condições de miséria e de falta de alimentos (período conhecido, nos Açores, como o da “Grande Fome”). Entre 1748 e 1752, ao redor de 7.000 colonos açorianos foram trazidos ao sul do Brasil - em especial, para a Ilha de Santa Catarina - para ocupar o território que caberia à Coroa Portuguesa após o Tratado de Madri (Cesar, 1970) (90). Um grupo deles, de aproximadamente 2000 pessoas, foi sendo trazido até o Rio Grande do Sul, às margens do rio Guaíba, onde o seu assentamento deu origem à atual cidade de Porto Alegre (que viria a se tornar capital da província). De Porto Alegre, muitos entraram para o interior. Calcula-se que a população do território que hoje correspondente ao Rio Grande do Sul dobrou de número, naqueles anos, com essa imigração (Piazza, 1992) (91). É de se crer que a atual proporção de pessoas com ancestrais açorianos, no nosso Estado, não seja muito menor do que os 50% dos últimos anos do século XVIII.

No século XIX, os açorianos continuaram emigrando, mas parece que os Estados Unidos teriam sido o seu destino mais freqüente nessa época, através dos seus portos baleeiros tanto da costa leste (em especial os do Massachussets) quanto da oeste (São Francisco). As primeiras famílias descritas com a condição provinham desses mesmos

lugares – a família Machado e a família Thomas, de Massachussets, e a família Joseph (originalmente chamados Bastiana), de São Francisco.

Assim, essa emigração sustentada e difusa pelo mundo explica, em parte, por que a DMJ é diagnosticada em pacientes de origens étnicas as mais variadas: em caucasóides não portugueses (franceses, alemães, etc), em japoneses, em indianos, em afro-americanos, em aborígenes australianos, em chineses e em judeus iemenitas (Sakai et al, 1983; Bharucha et al, 1986; Burt et al, 1993; Goldberg-Stern et al, 1994) (49, 50, 51, 52).

Entretanto, as coisas não se passaram exclusivamente assim.

1.2.7.2 Os estudos dos haplotipos do gene *MJD1*

Os estudos sobre a origem molecular dos genes que contêm a mutação *MJD1* falam, ao contrário da hipótese da origem açoriana única, a favor de 4 ou 5 origens biológicas independentes. Esses estudos se baseiam na análise dos haplotipos circunjacentes e mesmo internos ao locus *MJD1*.

Haplotipo é o grupo de alelos de alguns *loci* estreitamente ligados entre si. Por outro lado, a expressão “haplotipos intragênicos” já foi usada para nomear as variações polimórficas internas ao gene.

Os primeiros estudos pesquisaram os haplotipos de quatro marcadores microssatélites, cobrindo uma distância genética de 3 cM. Demonstrou-se que eles se

localizam muito próximos ao locus *MJD1*, com uma ordem previsível. Desses estudos, deduziu-se a existência de 5 ou 6 origens ancestrais da mutação *MJD* (Takiyama et al, 1995; Stevanin et al, 1995; Gaspar et al, 1996) (79, 89, 92).

A análise dos haplotipos internos ao locus *MJD1* revelou também a existência de vários alelos, não completamente coincidentes com os anteriores. Dentro da região codificadora do gene, até onde sabemos, foram identificados dois polimorfismos: duas mutações de ponto que não afetam o fenótipo. São elas: a 987G→C e a 1118A→C, esta última atingindo o codon de terminação do gene e resultando na adição de um resíduo de 16 aminoácidos no domínio C-terminal do produto gênico (Igarashi et al, 1996; Stevanin et al, 1997) (80, 88). Esses dois polimorfismos geram quatro possíveis haplotipos. As populações normais estudadas tiveram 96% dos seus cromossomos apresentando os haplotipos GC ou CA, ou seja, demonstrou-se um forte desequilíbrio de ligação (LD) entre ambos. Entre os doentes com DMJ de diferentes origens, entretanto, os quatro possíveis haplotipos apareceram – 3 deles entre os de descendência portuguesa açoriana. Como os dois polimorfismos estão separados por apenas 31 nucleotídios, e estão muito perto da mutação CAG, os quatro diferentes haplotipos associados com a expansão CAG mais provavelmente refletem quatro origens diferentes do que recombinações. O quarto haplotipo – o GA – foi encontrado entre pacientes com DMJ descendentes de africanos e, também, na família iemenita.

1.3 As demais SCAs. Sua classificação atual

Entre 1993 e 2000, uma série de *loci* foram relacionados às SCAs (ver também “Introdução”, p. 14). As anormalidades moleculares tornaram-se, a partir de então, o parâmetro de classificação das ataxias dominantes da vida adulta. Entretanto, a etiologia genética de ao menos 20% das ataxias autossômicas dominantes ainda permanece desconhecida (Schöls et al, 1997) (93). As SCAs já identificadas estão representadas na Tabela 3 e serão comentadas a seguir.

1.3.1 SCA1

A primeira descoberta de uma ligação entre um marcador genético e certos portadores de SCAs aconteceu em relação ao genótipo HLA (Yakura et al, 1974) (8). Os autores concluíram que o gene mutante estaria a 12 centimorgans do complexo HLA no cromossomo 6 (6p22-p23). Esse *locus* foi desde então chamado de SCA1.

Somente 17 anos mais tarde, através da técnica da clonagem posicional, foi identificada a presença de uma seqüência repetitiva de codons CAG altamente polimórfica nessa posição, e que se encontrava expandida entre os doentes (Orr et al, 1993) (12).

A idade de início é de, em média, 33 anos (variando dos 21 aos 52 anos). Entre os seus achados clínicos, estão a ataxia axial e apendicular; a espasticidade, a hiperreflexia e o sinal de Babinski; e diversos achados oculomotores, como o nistagmo, a lentidão das sacadas e as oftalmoparesias. Nos estágios finais da doença, aparece o envolvimento dos nervos bulbares, os movimentos distônicos, a amiotrofia e a redução da sensibilidade proprioceptiva. Uma considerável variabilidade intrafamiliar também foi notada. Como se

pode ver, os achados clínicos são superponíveis aos descritos na DMJ (Ranum et al, 1994b; Dubourg et al, 1994) (86, 94).

Os alelos normais contêm entre 6 e 39 repetições CAG, enquanto os alelos mutantes contêm entre 43 e 82 repetições (Kakizuka, 1998) (95). Há uma correlação invertida entre a idade de início e o número de CAGs, com um r igual a 0,81. O fenômeno da antecipação está bastante documentado: é de 11 anos entre uma geração e outra e independe do sexo do genitor afetado (Dubourg et al, 1994) (94). Além disso, também ficou demonstrada a instabilidade meiótica do *locus* SCA1 (Ranum et al, 1994b) (86).

A SCA1 não está entre as mais freqüentes SCAs. Famílias com diferentes origens geográficas e étnicas já foram descritas e parece que ela seja mais comumente encontrada entre descendentes de italianos e de europeus orientais (Ranum et al, 1994b; Silveira et al, 1996; Schöls et al, 1997) (86, 93, 96). Uma família brasileira já foi descrita com essa condição (Lopes-Cendes et al, 1996c) (97).

1.3.2 SCA2

A SCA2, ou “ataxia de Holguín”, foi descrita pela primeira vez em diversas famílias de afetados provenientes da província de Holguín, em Cuba (Orozco Diaz et al, 1990) (11). Esses pacientes tinham ancestrais comuns e compunham o maior grupo com ACAD de origem homogênea jamais descrito. Logo a seguir, o *locus* da SCA2 foi mapeado no cromossomo 12q23-q24.1 (Gispert *et al*, 1993) (13). A presença de uma expansão CAG foi

confirmada com a clonagem do gene (Imbert et al, 1996; Pulst et al, 1996) (25, 26).

Sua idade de início média é de 30 anos. O quadro clínico é dominado por uma ataxia de tronco, uma disartria e uma lentidão das sacadas em praticamente todos os seus doentes. Os achados piramidais são infreqüentes: mais comuns do que eles, são a oftalmoparesia, a neuropatia periférica, os movimentos corêicos e distônicos e, surpreendentemente, a demência. Os achados clínicos tendem a ser homogêneos dentro das famílias, mas a variarem muito entre as mesmas. Por exemplo, em certas famílias o início é precoce (ao redor dos 17 anos) e a evolução é mais grave, incluindo as manifestações demenciais. Em outras, o início é mais tardio (ao redor dos 50 anos) e o fenótipo “é típico de uma DMJ”, com ataxia de tronco, redução da sensibilidade vibratória, retração palpebral e fasciculações de intenção na face (Geschwind et al, 1997) (98).

Os alelos normais contêm entre 14 e 31 repetições CAG, com dois alelos principais na população geral (o de 22 repetições – 86,4% - e o de 23 repetições – 9,7%), enquanto os alelos mutantes contêm entre 35 e 59 repetições (Kakizuka, 1998) (95). A transmissão paterna está associada às maiores antecipações, que são em média de 15 anos. Há também uma alta correlação, invertida, entre a idade de início e o número de repetições CAG – com um r de - 0,81 (Geschwind et al, 1997) (98). Outra característica importante é a marcada instabilidade do trato CAG expandido: em quase todas as transmissões, o número de CAGs aumentou de modo importante (Imbert et al, 1996) (25).

A SCA2 é provavelmente a segunda mais freqüente ataxia dominante encontrada em populações mistas: ela corresponde a 13-24% dos diagnósticos moleculares, tendo sido identificada em pacientes mexicanos, negros norte-americanos, franceses e suecos, entre outros (Stevanin et al, 1996; Geschwind et al, 1997; Schöls et al, 1997) (77, 93, 98).

1.3.3 DRPLA

A atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana, ou DRPLA, é uma doença autossômica dominante que ocorre predominantemente em japoneses. Suas manifestações clínicas podem se iniciar entre os 5 e os 70 anos, o quadro clínico variando de acordo com a idade de início. Os pacientes que apresentam a condição antes dos 20 anos tendem a apresentar uma epilepsia mioclônica progressiva. Os pacientes com início na idade adulta apresentam ataxia cerebelar, coreoatetose e demência. Outra característica marcante da doença era a antecipação, que tendia a ser pior com a transmissão paterna (Takahata et al, 1978; Ikeuchi et al, 1995) (99, 100).

O gene DRPLA foi identificado em 1994 e a mutação responsável pela doença era uma expansão dinâmica de uma seqüência repetitiva CAG (Koide et al, 1994) (16). Os alelos normais contêm entre 7 e 35 repetições CAG, enquanto os alelos expandidos contêm entre 49 e 88 repetições. Como em outras condições, há uma correlação invertida entre a idade de início e o número das repetições CAG, e uma instabilidade meiótica que explica as antecipações (Koide et al, 1994) (16).

1.3.4 SCA4

Em uma família isolada, demonstrou-se a ligação do quadro cerebelar com um marcador genético (D16S422) do cromossomo 16q24-ter. O gene responsável estaria localizado dentro de um segmento de 6 cM, naquela região, e passou a ser chamado de *SCA4* (Gardner et al, 1994; Flanigan et al, 1996) (18, 101). Tratava-se de uma família de origem escandinava, na qual os 38 doentes examinados mostravam, além da ataxia, uma neuropatia axonal sensorial. Como em outras SCAs, documentou-se uma idade de início média de 39 anos, mas o fenômeno da antecipação ou era sutil, ou inexistente. O gene não foi identificado até o presente.

1.3.5 SCA5

Em uma outra família, cujos afetados descendiam dos avós paternos de Abraham Lincoln, demonstrou-se a ligação da ataxia cerebelar com marcadores genéticos (D11S905-GATA2A01-D11S913) da região centromérica do cromossomo 11. O seu gene foi denominado *SCA5* (Ranum et al, 1994a) (19) . Em comparação com as demais SCAs, a *SCA5* parece ser mais benigna, pois afeta primariamente o cerebelo, poupando o tronco cerebral. Uma diminuição na idade de início das gerações mais recentes foi observada, em especial nas transmissões maternas, as quais eventualmente resultaram em formas juvenis um pouco mais graves. O gene ainda não foi identificado.

1.3.6 SCA6

Depois que uma série de doenças neurodegenerativas da vida adulta, com herança dominante, foram associadas às expansões CAG, vários investigadores passaram a procurar essas expansões pelo genoma de famílias de afetados ainda sem diagnóstico molecular. Usando essa estratégia, descobriu-se que o gene *CACNA1A* (ou da subunidade α_{-1A} do canal do cálcio) contém uma seqüência repetitiva CAG que estava expandida em oito famílias com SCA (Zhuchenko et al, 1997) (27). A doença determinada por essa expansão foi chamada de SCA6.

As características clínicas dos doentes eram similares às encontradas na SCA1 e na DMJ, embora fossem mais insidiosas e de longa duração. Havia ataxia cerebelar de tronco e de membros, disartria, nistagmo e leve redução das sensibilidade vibratória e proprioceptiva. Os achados de ressonância nuclear magnética e de necropsia revelaram o envolvimento predominante do cerebelo, com pouca ou nenhuma atrofia do tronco cerebral (Zhuchenko et al, 1997; Schöls et al, 1997) (27, 93).

O gene *CACNA1A* localiza-se no cromossomo 19p13. Nele, a seqüência CAG polimórfica contém entre 4 e 15 repetições, nos alelos normais, e entre 21 e 27 repetições, nos alelos expandidos. Nas oito famílias identificadas, a doença começava na 5ª década nas famílias cuja expansão CAG era de 22 ou 23 repetições, e começava entre os 28-31 anos, nas famílias cuja expansão continha 27 repetições. As expansões CAG da SCA6 pareciam

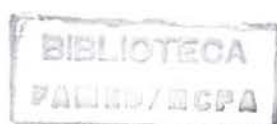
ser estáveis ao atravessar as gerações, ao contrário das demais SCAs.

Os (CAG)_n expandidos são bem menores do que os encontrados nas demais doenças devidas às expansões CAG (Tabela 5). Enquanto na atrofia muscular espinal e bulbar, na HD, nas SCAs 1 e 2, na DMJ e na DRPLA, os limites entre o (CAG)_n e o expandido ficam mais ou menos nas 40 repetições, na SCA6 esses limites se dão nas 20 repetições.

Há duas outras condições alélicas à SCA6, devidas a diferentes mutações que afligem o mesmo gene. São elas a ataxia cerebelar paroxística hereditária (HPCA) e a enxaqueca hemiplégica familiar (FHM) (Ophoff et al, 1996) (102). Os pacientes com essas condições também apresentam ataxia, mas a sua incoordenação é periódica e transitória.

O gene *CACNA1A* codifica um componente importante, transmembrana, de um canal do cálcio presente em todo o encéfalo, mas que é especialmente expressado no cerebelo (Yue et al, 1997) (103). Esse componente – a subunidade α_{-1A} do canal do cálcio – tem quatro domínios homólogos que se encontram face a face dentro do canal propriamente dito. As mutações de ponto associadas às duas doenças de manifestação periódica (HPCA e FHM) foram identificadas nesses domínios ou alças internas ao canal, enquanto a seqüência repetitiva CAG se localiza perto da terminação 3' da matriz de leitura do gene.

Uma das questões mais interessantes levantada pela SCA6 é a de como mutações



estruturalmente diferentes em um mesmo gene provocam doenças também diferentes. É possível que a expansão CAG da SCA6 seja patogênica por razões diferentes das desencadeadas pela presença de uma poliglutamina expandida. O tamanho bem menor do CAG expandido, na SCA6, faz pensar que um outro mecanismo patogênico esteja envolvido (Kakizuka, 1998) (95). A localização diferente das mutações até agora encontradas no gene CACNA1A pode ser uma das explicações. De acordo com essa hipótese, a expansão de glutaminas na terminação carboxila da proteína levaria a uma disfunção contínua do canal de cálcio, levando a uma doença progressiva, enquanto outras mutações provocariam alterações transitórias da função do canal (Zhuchenko et al, 1997; Yue et al 1997) (27, 103).

1.3.7 SCA7

A SCA7, antes chamada de atrofia olivo-ponto-cerebelar tipo III (Konigsmark and Weiner, 1970) (6) ou de ACAD II (Harding, 1984) (3), é uma entidade conhecida desde 1937 e que se caracteriza fundamentalmente pela associação de uma ataxia cerebelar com uma distrofia macular, ambas progressivas (Stevanin et al, 1998) (104). O seu gene foi localizado no cromossomo 3p (Gouw et al, 1995; Benomar et al, 1995) (22, 23), e se sabe que ele contém uma repetição CAG que está expandida nos pacientes afetados (David et al, 1997) (24).

A idade de início média é de 30 anos, embora ela tenha variado entre os 3 meses de vida e os 65 anos. A ataxia cerebelar é o sintoma inicial, se a doença começa depois dos 30 anos. Quando a doença é mais precoce, o primeiro sintoma costuma ser a amaurose. Além

desses, os demais achados encontrados são: disartria; oftalmoparesia ou uma viscosidade do movimento ocular; hiperreflexia, sinal de Babinski e espasticidade; e redução da sensibilidade vibratória. Movimentos distônicos, miocimias faciais e demência são infreqüentes, enquanto a hipoacusia, ausente nas outras SCAs, está presente em 25% dos casos (David et al, 1998; Stevanin et al, 1998) (104, 105). O fenômeno da antecipação costuma ser muito importante: ele é, em média, de 22 anos quando a transmissão é paterna, e de 17 anos, quando a transmissão é materna.

Nos alelos mutantes, o tamanho da repetição CAG varia entre 38 e 130 repetições, enquanto nos alelos normais ele varia entre 7 e 17 repetições (David et al, 1997) (24). Além disso, o alelo expandido é bastante instável ao atravessar meioses. Há também uma forte correlação negativa entre o tamanho da repetição CAG e a idade de início ($r = -0,84$).

Sabe-se da existência de alelos intermediários (AI) entre a faixa de variação normal e a patogênica. Esses AI são raros nas populações já estudadas e nunca foram associados ao fenótipo SCA7. Eles foram encontrados em familiares mais ou menos distantes dos afetados e, em um caso, um AI de 35 repetições deu origem a um alelo expandido SCA7 de 57 repetições (Stevanin et al, 1998) (104). Já foi também possível se reconhecer a presença de um AI em uma família desde o século XVII, cinco a oito gerações antes do aparecimento da doença propriamente dita nas gerações mais recentes (Johansson et al, 1998). O potencial aparecimento de mutações *de novo* a partir dos AI pode explicar porque a doença não desaparece, a despeito de suas graves antecipações (Stevanin et al, 1998; Giunti et al, 1999) (104, 106).

A SCA7 já foi diagnosticada em pacientes de várias origens geográficas: Bélgica, França, Inglaterra, Suécia, Noruega, EUA, Brasil, Israel, Holanda, Marrocos, Argélia, Tunísia, Coreia e África do Sul (Stevanin et al, 1998) (104). Essa pan-etnicidade está de acordo com a hipótese de que a SCA7 tenha um grande potencial de aparecimento *de novo*, na população.

1.3.8 SCA8

Um novo gene, de função desconhecida, foi inicialmente associado a um quadro de ataxia dominante e em seguida denominado *SCA8* (Koob et al, 1999) (28). Localizada no cromossomo 13q, a mutação consistia de uma expansão de uma sequência repetitiva que, entretanto, era diferente das demais SCAs em dois aspectos: a sequência repetitiva era constituída de vários CTG, precedidos de uma série de repetições CTA; e essa região expandida estava localizada em uma região não transcrita do gene (no exon da terminação 3'). Essa condição foi denominada de SCA8.

A SCA8 foi identificada primeiro em 8 famílias (Koob et al, 1999) (28). Ela tinha uma idade de início média de 39 anos. Seus achados clínicos incluíam a ataxia axial e apendicular, disartria, nistagmo, sinais piramidais e redução da sensibilidade vibratória. A herança autossômica dominante nem sempre estava presente: duas das oito famílias iniciais apresentavam vários irmãos afetados, sem que os seus pais o fossem, e em uma família apenas um doente existia (um caso esporádico).

O tamanho dos alelos expandidos variou de 110 a 130 repetições CTA-CTG (ou de

107 a 127 repetições CTG). Mil e duzentos cromossomos normais foram medidos e o tamanho das suas repetições variou entre 16 e 37 repetições CTA-CTG. Porém, 20 familiares assintomáticos dos pacientes com SCA8, cujas idades eram semelhantes às dos doentes, apresentaram alelos com 74 a 94 repetições – ou seja, alelos aparentemente intermediários. A primeira interpretação para esses achados foi a de que o gene da SCA8 teria uma penetrância incompleta, dependente do tamanho da expansão, e que por isso os pacientes afetados nem sempre teriam uma história familiar claramente dominante (Koob et al, 1999) (28).

Esses resultados foram confirmados em um segundo estudo, realizado em pacientes portugueses e brasileiros (Silveira et al, 2000) (107). Nesse estudo, a SCA8 foi encontrada em 5 famílias com SCAs. Além disso, os alelos de 1.818 cromossomos controles apresentaram uma distribuição trimodal: entre 15 a 21 CTGs, entre 22 a 37 CTGs e entre 40 a 91 CTGs (esses últimos correspondendo a 0,7% da população estudada). Como o trato expandido CTG apresentava instabilidade meiótica, os autores levantaram a hipótese de que esses grandes alelos da população normal seriam instáveis e que originariam mutações *de novo* no locus SCA8 (Silveira et al, 2000) (107).

Dois estudos subseqüentes apresentaram a ocorrência de repetições CTG expandidas em controles normais e também em pacientes com outras doenças do sistema nervoso central (Stevanin et al, 2000; Worth et al, 2000) (108, 109). No presente momento, portanto, é duvidoso o real significado da expansão SCA8. Para que ela seja definitivamente reconhecida como patogênica, evidências mais diretas do seu papel fisiopatológico serão necessárias.

1.3.9 SCA10

Em uma família mexicana na qual se segregava uma forma distinta de SCA, localizou-se o gene, através de análise de ligação com marcadores genéticos, no cromossomo 22q (Zu et al, 1999) (29). O gene, ainda não identificado, foi denominado de *SCA10*.

Dez indivíduos afetados foram examinados. Eles apresentavam ataxia axial, disartria e nistagmo. Dois deles também tinham convulsões. Não foram encontrados achados piramidais, sensitivos ou oftalmoparesias. Também a antecipação foi documentada em quatro gerações dessa família. Pelo quadro clínico ser relativamente benigno, os autores o relacionaram à antiga ACAD III (Harding, 1984) (3). Entretanto, essa benignidade é questionável, pois a idade de início da quarta geração foi de 14,5 anos.

1.3.10 SCA11

Em uma família cujas manifestações eram quase exclusivamente cerebelares, mapeou-se através de análise de ligação com marcadores genéticos um novo gene, localizado no cromossomo 15q e a partir daí denominado de *SCA11* (Worth et al, 1999) (30).

A família, de origem inglesa, tinha sete gerações de afetados. Os 14 casos

examinados apresentavam ataxia de marcha e de acompanhamento visual, disartria, nistagmo horizontal e hiperreflexia. Um dos doentes também apresentava diplopia. Sua idade de início média era de 24,7 anos e sua sobrevida, de outros 24 anos.

Os autores sugeriram que, entre as atuais SCAs, ao menos 4 têm quadros quase exclusivamente cerebelares, podendo ser clinicamente diferenciados dos demais: a SCA5, a SCA6, a SCA10 e a presente SCA11, correspondendo todas elas à antiga ACAD III (Harding et al, 1984) (3). Entretanto, há diferenças importantes entre as mesmas, que sugerem diversos mecanismos patogênicos. Por exemplo, a antecipação aconteceu nas famílias SCA5 e SCA10, mas não aconteceu na SCA6, embora essa seja a única delas, até o momento, associada a uma expansão CAG.

1.3.11 SCA12

O último gene identificado, relacionado às SCAs, foi encontrado em uma família de origem alemã (Holmes et al, 1999) (31). Usando uma técnica chamada de “detecção de repetições expandidas”, os autores encontraram uma seqüência de 93 CAG ininterruptas no seu caso índice, que foi clonada, suas regiões flanqueadoras reconhecidas, e que depois foi reencontrada nos 10 familiares também afetados. A nova doença foi chamada de SCA12 (Holmes et al, 1999) (31).

Sua idade de início variou entre os 8 e os 55 anos. A manifestação inicial era, em geral, um tremor dos membros superiores, seguido de tremor cervical e depois de ataxia de marcha, dismetria, hiperreflexia, bradicinesia, anormalidades do movimento ocular e, nos

pacientes mais velhos, demência. Atrofia cerebelar e cerebral foram identificadas nas imagens por ressonância nuclear magnética. Os autores não relataram ocorrência de antecipação.

A expansão CAG localizava-se imediatamente antes do sítio de iniciação de um gene conhecido como *PPP2R2B* e que codifica uma subunidade regulatória da fosfatase de proteínas PP2A, localizado no cromossomo 5q31-33. A região imediatamente circunjacente à repetição CAG não apresenta homologia com nenhum gene conhecido; além disso, não se sabe se a seqüência CAG é transcrita ou não.

Os alelos expandidos tinham entre 66 e 78 repetições CAG. Em 394 pessoas normais e em outros 1099 indivíduos com várias doenças neurológicas, o tamanho da repetição variou entre 7 e 28 repetições. Não se encontrou correlação entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início, nos doentes.

1.4 Fisiopatologia geral das expansões CAGs – os tratos de poliglutaminas

Até o momento, sabe-se que nove doenças neurodegenerativas são causadas pela expansão de uma seqüência repetitiva CAG codificadas dentro de genes independentes, quase todos com função desconhecida (Tabela 5).

As repetições CAG patológicas localizam-se dentro de exons e são traduzidas em tratos de poliglutaminas (embora haja dúvidas quanto à transcrição da SCA12), inseridos

dentro do produto proteico dos genes envolvidos. O agente patogênico comum a essas doenças parece ser essa mudança estrutural das proteínas. Como o tamanho das repetições CAG costuma ficar entre as 40 e as 130 repetições (Tabela 5), supõe-se que os tratos de poliglutaminas sejam patogênicos quando a sua extensão passa das 40 repetições.

Existem inúmeras questões sobre o mecanismo fisiopatológico desencadeado pelas poliglutaminas. Antes de se examinarem as evidências já obtidas sobre esse tema, talvez seja melhor se listarem as características comuns às doenças devidas às poliglutaminas, pois se espera que elas sejam explicadas por futuras descobertas das ciências básicas.

Em primeiro lugar, as doenças devidas às poliglutaminas compartilham:

- a herança autossômica dominante (à exceção da doença de Kennedy, que é ligada ao X recessiva). Duas explicações fisiopatológicas excludentes são possíveis: (1) perda de função devido a haploinsuficiência, ou (2) ganho de função tóxica;
- os achados patológicos, que são os de perda e degeneração de células neuronais (ainda que cada doença possa ter suas regiões mais suscetíveis). Deve-se tentar deduzir como a presença de poliglutaminas desencadeia esse processo, e por que ele se dá exclusivamente sobre tecidos neuronais: seria essa exclusividade devida ao fato de as células neuronais serem pós-mitóticas?
- e o início na vida adulta. O modelo teórico deve explicar por que os efeitos das poliglutaminas sobre as células neuronais são tardios.

E em segundo lugar, o exame das repetições CAG no genoma humano revelou que:

- as repetições CAG são altamente polimórficas em seu comprimento, mas que a sua

extensão não ultrapassa as 40 repetições, nas pessoas normais. Esse limiar de aproximadamente 40 repetições CAG ou 40 glutaminas deve encontrar uma explicação fisiológica;

- em todas as doenças descritas, quanto maior a expansão CAG, mais grave é o quadro clínico. Será por que os neurônios toleram menos as poliglutaminas, quanto mais longas elas forem?
- as seqüências CAG expandidas apresentam instabilidade ao atravessar divisões celulares, notadamente a meiose, nas quais elas mais comumente aumentam de tamanho (a exceção sendo, de novo, a SCA6). A gênese desse fenômeno, que explica a antecipação, deve ser buscada nos eventos que se dão durante a recombinação, nas primeiras fases da meiose.

Ao se sumarizar o que já se conhece sobre a biologia celular das poliglutaminas, vai-se tentar associar os achados laboratoriais com as questões levantadas pelos aspectos clínicos e moleculares comuns às doenças devidas às expansões CAG.

Em 1996, observou-se que as poliglutaminas da DMJ se precipitavam através de uma auto-agregação em células COS cultivadas e assim induziam a morte celular (Ikeda et al, 1996) (110). Essa precipitação só acontecia se as poliglutaminas provinham de uma porção da proteína MJD1 mas não da proteína completa. Vários outros relatos recentes tiveram em comum achados idênticos. Inclusões ou agregados intracelulares foram vistos em neurônios de pacientes, em modelos murinos transgênicos e em modelos *in vitro* da HD, da SCA1, da DMJ, da doença de Kennedy e do DRPLA (Hackam et al, 1998) (111). Embora a composição específica não seja bem conhecida, viu-se que todos os agregados

continham *fragmentos* de proteínas com um trato de poliglutamina expandida.

Nos estudos *in vivo*, as inclusões de poliglutamina eram intranucleares ou estavam no citosol dos neurônios e, em geral, se restringiam às regiões encefálicas afetadas pela doença. Não havia agregados na glia. Em todos os casos, os agregados estavam “ubiquitinizados”, ou seja, demonstravam ter iniciado o processo de proteólise (Davies et al, 1997; DiFiglia et al, 1997; Skinner et al, 1997; Paulson et al, 1997) (38, 112, 113, 114).

Em acréscimo às doenças naturais desencadeadas pelo trato de poliglutaminas, uma “doença nova” foi criada em um modelo murino, ao se inserir uma longa seqüência (CAG)_n em um gene no qual ela jamais esteve presente antes, o da proteína hipoxantina fosforribosiltransferase (HPRT) (Ordway et al, 1997) (115). A presença desse trato de poliglutamina nessa nova proteína, expressada no cérebro do rato, resultou num quadro neurodegenerativo, com inclusões intranucleares neuronais muito semelhantes às encontradas nas doenças humanas (Hackam et al, 1998) (111).

Os achados dos estudos *in vitro* seguiram a mesma linha de evidências dos estudos *in vivo*. Formaram-se agregados somente nas células transfectadas com construtos que expressassem proteínas expandidas, especialmente quando a proteína era truncada ou fragmentada. Por exemplo, os agregados de huntingtina em células 2-2 eram marcados apenas por anticorpos dirigidos contra o término-N e não por anticorpos dirigidos contra epítomos mais distais da proteína huntingtina (o mesmo acontecendo nos agregados intraneuronais dos doentes humanos) (DiFiglia et al, 1997) (113). Muitos dos agregados também estavam “ubiquitinizados”. Não se obteve a formação de agregados se o trato de poliglutamina era menor do que 44 ou 40 glutaminas, enquanto havia tanto mais agregados

quanto maior fosse a expansão do trato (Hackam et al, 1998) (111).

Em resumo, nos estudos *in vivo* e *in vitro*, a presença de agregados de tratos de poliglutaminas, independentemente dos genes envolvidos, estava associada ao estado de doença. Esses agregados eram intraneuronais e predominantemente encontrados nas regiões associadas à patologia. Finalmente, é quase certo que um evento proteolítico prévio seria necessário para desencadear a formação desses agregados.

1.4.1 Por que as poliglutaminas se agregam?

Três diferentes hipóteses foram levantadas para explicar a formação dos agregados resultantes da expansão das poliglutaminas.

A primeira diz que os tratos de poliglutaminas agiriam com zíperes polares, devido à formação de ligações de hidrogênio entre a cadeia principal e as cadeias de amidas colaterais (Perutz, 1995) (116). Ou seja, a interação entre as próprias poliglutaminas seria a força central da sua agregação.

A segunda hipótese sugere que domínios proteicos externos à poliglutamina seriam responsáveis por sua agregação (Burrigh et al, 1997) (117). Como as proteínas que contêm poliglutaminas não têm qualquer outra homologia estrutural, essa hipótese só se sustentaria se elas tivessem homologia funcional. Isso também é improvável, como sugere aquele experimento que inseriu artificialmente uma poliglutamina em uma proteína nova (a HPRT), que dificilmente teria alguma homologia de função com as proteínas naturais, ao

acaso (Hackam et al, 1998) (111).

A terceira hipótese da formação de agregados sugere a necessidade de haver ligações covalentes entre as glutaminas e resíduos de lisina, ligações catalizadas pelas transglutaminases. Essas enzimas também participam da seqüência de eventos da apoptose. Entretanto, entre outras objeções a esse modelo, esse tipo de ligações jamais foi demonstrada nos agregados intraneuronais (Hackam et al, 1998) (111).

1.4.2 Os agregados são tóxicos?

Apesar da expressão das proteínas com o trato expandido de poliglutaminas ser generalizada no SNC, elas produziram agregados apenas nas regiões afetadas pela doença específica (ao menos nos casos estudados) (Hackam et al, 1998) (111). Há, portanto, uma correlação clara entre o agregado e o processo patogênico.

Entretanto, os agregados tanto poderiam ser a causa direta da lesão ou morte celular, como poderiam ser uma resposta defensiva da célula a um processo tóxico e terem, assim, um papel protetor.

1.4.3 O papel da proteólise dos agregados

Os agregados intraneuronais são constituídos de fragmentos das proteínas originais, fragmentos esses contendo o trato de poliglutamina. Parece razoável se supor, então, que um dos eventos iniciais para a formação de um agregado seja a proteólise.

Há evidências de que a proteína da HD, da doença de Kennedy e da DMJ sejam substratos naturais das *caspases*, um grupo de cisteína-proteases que é ativado na medida em que a célula inicia sua morte celular programada (a apoptose) (Hackam et al, 1998) (111). Em todos os casos, a ação das caspases cria fragmentos proteicos que contêm o trato de poliglutamina.

Outro achado indicador de proteólise é a citada ubiquitinação dos agregados (Davies et al, 1997; DiFiglia et al, 1997; Skinner et al, 1997; Paulson et al, 1997; Ordway et al, 1997) (38, 112, 113, 114, 115). A ubiquitina é uma proteína que marca as proteínas para a sua destruição, por essas terem uma má conformação ou por sua remoção ser necessária para o ciclo celular. Não se sabe em qual dos casos colocar as poliglutaminas: se elas são aberrantes, ou se a sua destruição é um processo celular usual. Seja qual for a razão, as poliglutaminas se comportam, logo a seguir, como estruturas resistentes à ação das proteases.

Não se sabe por que esses eventos proteolíticos (ao menos os iniciais) teriam especificidade tecidual, em cada grupo de doenças. No caso das SCAs, a especificidade tecidual desse processo, embora de causa desconhecida, poderia explicar o fenótipo clínico comum que elas compartilham. Os neurônios atingidos seriam poucos mas seriam quase sempre os mesmos, não importando muito o gene portador da expansão CAG. Mais difícil será compreender por que um trato de poliglutamina semelhante ao das SCAs produziria agregados em outra topografia neuronal (por exemplo, o neostriato), com outras consequências sintomáticas (na HD) (Hardy e Gwinn-Hardy, 1998) (118).

1.4.4 O modelo atual de relação entre agregados e morte celular

O modelo atual de relação entre agregados e morte celular propõe ao menos o que se segue. O acúmulo de fragmentos proteicos nos quais haja um trato de poliglutamina expandido seria tóxico para a célula neuronal. Essa toxicidade poderia ser anterior ou subsequente à formação de agregados. Nesse modelo, o processo patológico seria desencadeado, num certo momento, pela proteólise da proteína original, pois as regiões atingidas sempre acumulariam fragmentos da proteína que, por conterem a poliglutamina, tornar-se-iam resistentes à degradação (Hackam et al, 1998) (111).

Esse modelo deve prever que o processo de quebra das proteínas seja diferente em cada região cerebral, para explicar o acúmulo de agregados em topografias tão específicas (Kakizuka, 1998) (95). As razões para que isso aconteça ainda são desconhecidas, embora algumas já tenham sido sugeridas. Por exemplo, é possível que as proteases responsáveis pela degradação das poliglutaminas tenham expressão diferencial no cérebro. Ou então, que os efeitos tóxicos iniciais, prévios à agregação, envolvam apenas determinadas populações de neurônios (Hackam et al, 1998) (111).

Finalmente, esse modelo deve explicar por que há um período pré-sintomático tão longo em todas essas doenças, e por que não só o tempo mas a gravidade são tão diversos em cada indivíduo (Kakizuka, 1998) (95).

Com tantas lacunas ainda a serem preenchidas, é de se compreender a atual ausência de um modelo terapêutico experimental correspondente. Por exemplo, deve-se esclarecer se os agregados intraneuronais são a causa, são uma resposta protetora ou são apenas um marcador de disfunção neuronal iminente. Um agente farmacológico que inibisse a agregação das poliglutaminas teria, em cada caso, efeitos totalmente contrários. Assim, o tratamento das doenças das poliglutaminas segue aguardando por maiores elucidações.

1.5 O cuidado das SCAs em geral e da DMJ em particular

1.5.1 O tratamento dos sintomas neurológicos

Não existe, até o momento, nenhum tratamento eficaz para as SCAs, em geral, e para a DMJ, em particular.

Muito pouco progresso se obteve com o tratamento sintomático farmacológico voltado para as manifestações motoras. Entre outros, tentou-se avaliar o efeito do uso de treonina, sulfametoxazol-trimetropim, L-dopa, buspirona e tetrahidrobiopterina, na DMJ (Subramony et al, 1990; Spinella e Sheridan, 1992; Azulay et al, 1994; Lou et al, 1995; Sakai et al, 1996; Friedman; 1997) (119, 120, 121, 122, 123, 124). A expectativa era que essas substâncias tivessem algum efeito neuroprotetor. Embora algumas vezes houvesse melhora subjetiva, especialmente quando a substância tinha também um efeito antidepressivo, como a buspirona (Lou et al, 1995) (125), não se obteve nenhuma melhora

significativa nas medidas objetivas dos déficits.

Como os ensaios clínicos usando um único fármaco produziram resultados controvertidos ou mesmo negativos, há autores que aconselhem o uso, em experimentos futuros, de um coquetel farmacológico. Esse coquetel combinaria substâncias que tentariam corrigir as deficiências neuroquímicas encontradas nas SCAs, por um lado, e que modificariam os sistemas neurotransmissores cerebelares, em especial, o sistema serotoninérgico (Botez et al, 1998) (125). Os aspectos neuroquímicos mencionados são inespecíficos e incluem a ação excitotóxica do glutamato e a deficiência de tiamina encontrada no líquido céfalo-raquíano de pacientes atáxicos. L-5-hydroxitriptofânio, tiamina e amantadina foram medicamentos sugeridos para esse coquetel (Botez et al, 1998) (125). Mesmo assim, o futuro do tratamento sintomático das SCAs ainda deve ser visto com muitas reservas (Shoulson, 1998) (126).

O tratamento curativo parece estar ainda mais distante, embora algumas especulações já possam ser feitas. Na seção 1.4.2 (p. 66), mencionou-se, por exemplo, que os agregados intraneuronais contendo poliglutaminas poderiam ser ou a causa direta da lesão ou morte celular, ou o inverso, uma resposta defensiva da célula a um processo tóxico e terem, assim, um papel protetor. Também se apresentou o papel da proteólise como o aparente desencadeador da apoptose, na seção 1.4.3 (p. 66). Com o esclarecimento do papel desses fenômenos na gênese dos sintomas, é possível se desenvolverem agentes farmacológicos que influenciem favoravelmente a agregação das poliglutaminas ou que inibam a sua proteólise. Embora ainda rudimentares, alguns experimentos já estão sendo realizados nesse sentido (Aldred, 1998) (127).

1.5.2 Outros cuidados

A manutenção da qualidade de vida diária e bem-estar dos doentes são o objetivo prioritário do atendimento clínico. Isso coloca os cuidados psico-sociais e de prevenção terciária na primeira linha de intervenção, junto dos doentes e de suas famílias (Sequeiros, 1996b) (128).

O tratamento clínico, portanto, se restringe ao suporte físico e emocional dos doentes. Ele inclui atendimentos psicológicos, fisioterápicos e fonoaudiológicos, até onde eles forem úteis e possíveis.

1.5.3 Prevenção

O complexo processo que denominamos de “aconselhamento genético” tornou-se uma questão extremamente importante no manejo das SCAs, uma vez que nele reside a única alternativa de se prevenir a recorrência da doença em uma família (Sequeiros, 1996b) (128).

A finalidade principal do aconselhamento genético (AG) é fornecer a informação genética que ajude cada indivíduo ou casal a tomar as decisões que melhor sirvam às suas necessidades (Kessler, 1979) (129). Três aspectos o constituem: (1) o diagnóstico

firmemente estabelecido; (2) a avaliação precisa dos riscos de recorrência e das técnicas disponíveis para evitá-los; e (3) o processo de comunicação entre o consultor genético e os consultandos. Em outras palavras, a informação genética fornecida aos consultandos só será adequada se se basear em um diagnóstico preciso; se incluir o cálculo correto dos riscos e a apresentação de todas as opções técnicas disponíveis para enfrentá-los; e se for comunicada de uma forma clara e precisa, sem preconceitos nem ambigüidades.

Esse processo, já em si complexo, tornou-se ainda mais delicado, no caso das SCAs, com a descoberta das suas mutações causais. Os ensaios moleculares tornaram possível o diagnóstico pré-sintomático das pessoas em risco, situação na qual eles são usualmente chamados de testes preditivos. Na verdade, usando as mesmas palavras ditas acima, os testes preditivos são a única opção técnica disponível para evitar a recorrência da doença. A possibilidade de se predizer se um indivíduo em risco terá ou não a DMJ abriu uma série de novas interrogações éticas. Uma síntese das questões éticas envolvidas e das possíveis soluções será apresentada a seguir.

A questão inicial é a de quem seriam os indivíduos que se submeteriam aos testes preditivos. As respostas atuais incluem, em um primeiro aspecto, aqueles cujo desejo de receber a informação genética fosse autônomo e livre de qualquer coerção (médica, familiar ou social). Supõe-se que somente indivíduos adultos seriam capazes de se decidir livremente pelo teste. Conseqüentemente, crianças não deveriam ser testadas, em respeito à sua autonomia. Em segundo lugar, somente seriam investigados aqueles indivíduos que tivessem história familiar de uma SCA, cujo diagnóstico tivesse sido confirmado por uma análise molecular: só isso garantiria que um resultado negativo não fosse falso-negativo.

Entretanto, questões para as quais não existem respostas prontas começaram a proliferar. Esse é o caso dos conflitos entre direitos individuais – o direito de saber *versus* o direito de não saber. Por exemplo, quando indivíduos com risco a priori de 25% (netos de afetados, filhos de indivíduos assintomáticos) vêm solicitar o teste preditivo. O diagnóstico positivo de uma pessoa nessa situação revelaria o genótipo do genitor assintomático, mesmo que ele não o quisesse saber.

Há uma série de controvérsias éticas e legais a respeito do diagnóstico pré-natal (DPN) de fetos portadores de mutações de doenças genéticas tardias, entre elas, as SCAs. Através da amniocentese ou da coleta de vilosidades coriônicas, os testes moleculares podem ser feitos no período fetal. Podem, portanto, ser solicitados por um casal em risco que tenha decidido interromper a gestação no caso de um resultado positivo. Um exemplo de contradição entre as autonomias individuais seria o da situação criada se o casal desistisse da interrupção, depois de realizado o DPN, o que determinaria que a criança nascesse com um diagnóstico genético (Sequeiros et al, 1998) (130).

Há um esforço aqui de se definir critérios que evitem malefícios ou injustiças a pessoas indiretamente atingidas pelos testes preditivos. Porém, há uma questão anterior e para a qual as respostas são bastante vagas ou controversas: seriam esses testes benéficos para alguém?

Pode-se supor que não. Sem qualquer alternativa terapêutica, o conhecimento por parte do indivíduo assintomático de ser portador de uma SCA resulta, de fato, na questão da

sua própria morte prematura, antecedida de um longo período de incapacidade física. A esta “notícia”, o indivíduo responderá com sofrimento psicológico, por mais que tenha buscado esse conhecimento de forma autônoma e bem informada (Boutté, 1990; Fleming, 1996) (131, 132). O teste pode, ironicamente, substituir a antiga ansiedade a respeito do futuro desconhecido, pela ansiedade a respeito dos temidos sintomas iniciais da doença; o suicídio é um risco real, embora tenha sido poucas vezes documentado (Bird e Bennett, 1995) (133). Segundo esse ponto de vista, as descobertas moleculares e sua aplicação prática poderiam ser vistas como um “conhecimento proibido”, danoso ou perigoso. Wexler (1992) (134) sugeriu que esse sentimento se chamasse de “complexo de Tiresias”. Diz o velho e cego Tiresias a Édipo: “terrível coisa é a ciência, quando o saber se torna inútil” (Sófocles) (135). Coisa ainda mais terrível seria a ciência, se ela produzisse estigmatização: os testes preditivos, ainda que aliviem as pessoas do estado de incerteza, poderiam algum dia servir para “marcá-las” definitivamente (Boutté, 1990) (131).

Mas também se pode prever que sim, que os testes preditivos sejam benéficos para os envolvidos. A maior parte dos estudos até hoje realizados apontaram para essa conclusão (Paúl, 1996) (136). As vantagens encontradas tinham a ver principalmente com a redução da incerteza das pessoas testadas, uma das principais causas de angústia ao se estar sob risco (Boutté, 1990; Sequeiros, 1996b; Paúl, 1996) (128, 131, 136). Também foram apontados como resultados vantajosos do teste, a capacidade de se planejar o futuro relativamente à reprodução e à própria doença (Sequeiros, 1996b) (128). Esses resultados benéficos só seriam garantidos, entretanto, se a testagem preditiva fosse antecedida de um longo período de AG e de avaliação psicológica, e também sucedida por um programa de seguimento psicológico das pessoas testadas.

Mais estudos longitudinais serão necessários para que as conseqüências psicológicas e sociais dessas testagens sejam realmente compreendidas (Bird e Bennett, 1995) (133). Enquanto isso, é minha opinião pessoal que a atitude geral dos investigadores deveria ser aquela que combatesse qualquer tentativa de exclusão social dos portadores, o que representaria, em outras palavras, o renascimento da eugenia no nosso mundo contemporâneo.

TABELA 1.

Classificação de Konigsmark e Weiner (1970) das atrofia olivopontocerebelares.

Tipo	Início aos	Morte aos	Herança	Características
OPCA* I, tipo de Menzel	14-58 anos	32-60 anos	Dominante	Marcha atáxica, disartria, tremor corporal e de extremidades, perda sensorial, movimentos involuntários, sinais piramidais.
OPCA II, tipo Fickler- Winkler	20-80 anos	33-84 anos	Recessiva	Ataxia cerebelar, hiporreflexia, sensação normal
OPCA III	1-34 anos	1,5-75 anos	Dominante	Ataxia, tremor dos braços e da cabeça, disartria, degeneração retiniana com perda visual
OPCA IV, tipo Schut Haymaker	17-30 anos	26-48 anos	Dominante	Ataxia, disartria, paralisia laringea e facial, disfagia
OPCA V	7-45 anos	11-63 anos	Dominante	Ataxia, disartria, oftalmoplegia, demência, sinais extrapiramidais

Adaptada de Harding, 1984 (3).

*: *OPCA, de olivopontocerebellar atrophy.*

TABELA 2.

**Classificação de Anita Harding,
das Ataxias Cerebelares Autossômicas Dominantes**

ACAD* tipo I	com atrofia óptica, oftalmoplegia, demência, síndrome extrapiramidal, amiotrofia (inclui a Doença dos Açores)
ACAD tipo II	com degeneração retiniana pigmentar, oftalmoplegia e/ou características extrapiramidais
ACAD tipo III	ACAD “pura” e de início tardio
ACAD tipo IV	com mioclônus e surdez

Adaptada de Harding, 1984(3)

*: ACAD: ataxia cerebelar autossômica dominante.

TABELA 3.
Classificação genotípica das ataxias cerebelares autossômicas dominantes.

Nome	<i>Locus</i>	Tipo de mutação	Observações fenotípicas
1. SCA1	6p22-p23	Expansão CAG	
2. SCA2	12q23-24.1,	Expansão CAG	
3. Doença de Machado- Joseph (DMJ), ou SCA3	14q24.3-qter	Expansão CAG	
4. SCA4	16q24-ter		
5. Atrofia dentato-rubro-palido-luysiana (DRPLA)	12p12-ter	Expansão CAG	Mioclônus, convulsões, coreoatetose, distonia, demência e, às vezes, ataxia
6. SCA5	Região centromérica do 11		Semelhante à antiga ACAD tipo III
7. SCA6	19p	Expansão CAG, menor do que o habitual, no gene do <i>CACNA1A</i>	Semelhante à antiga ACAD tipo III; Com formas alélicas
8. SCA7	3p12-13	Expansão CAG	Ataxia com degeneração retiniana. Corresponde à antiga ACAD tipo II.
9. SCA8	13q	Expansão CTG em região não transcrita	
10. SCA10	22q		Semelhante à antiga ACAD tipo III
11. SCA11	15q		Semelhante à antiga ACAD tipo III
12. SCA12	5q31-33	Expansão CAG	Quadro inicial de tremor; demência tardia

TABELA 4
Achados neuropatológicos na DMJ

Estruturas afetadas:
<ul style="list-style-type: none"> - substância negra - núcleo vermelho - fascículo longitudinal medial - núcleos pontinos e dentato, pedúnculos cerebelares superior e médio - núcleos vestibulares - colunas de Clarke e tratos espinocerebelares - cornos anteriores e núcleos motores dos nervos cranianos
Estruturas afetadas em menor intensidade ou frequência:
<ul style="list-style-type: none"> - globo pálido - locus coeruleus - substância cinzenta periaquedutal - teto do mesencéfalo - olivas bulbares
Estruturas poupadas:
<ul style="list-style-type: none"> - córtex cerebral - striatum - córtex cerebelar - tratos corticoespinais

Adaptada de Sequeiros e Coutinho, 1993 (56)

TABELA 5
Doenças genéticas devidas a expansões CAG

Doenças	Herança	Posições cromossômicas	Genes	Número de repetições	
				Normais	Patológicas
Atrofia muscular espinal e bulbar (Doença de Kennedy)	Recessiva ligada ao X	Xq13-q21	<i>Receptor androgênico</i>	7-34	38-68
Doença de Huntington	AD	4p16.3	<i>HD (IT15)</i>	10-35	37-121
SCA1	AD	6p23	<i>SCA1</i>	6-39	43-82
DRPLA	AD	12p13	<i>DRPLA</i>	5-35	49-85
DMJ (SCA3)	AD	14q32.1	<i>MJD1</i>	13-44	65-85
SCA2	AD	12q24.1	<i>SCA2</i>	14-31	35-59
SCA6	AD	19q13	<i>CACNA1A</i>	4-16	21-27
SCA7	AD	3p12-13	<i>SCA7</i>	7-17	38-130
SCA12	AD	5q31-33	<i>PPP2R2B</i> (?)	7-28	66-78

2. JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO

A primeira justificativa para um estudo de casos de SCAs, no nosso meio, é a de que as nossas frequências das diferentes SCAs são ainda desconhecidas. Algumas informações a respeito dos aspectos epidemiológicos da DMJ foram revisadas na seção 1.2.2 (“Epidemiologia”, p. 24). Nesse sentido, as origens açorianas de boa parte da população do Rio Grande do Sul são um grande argumento para se buscar esse tipo de doenças entre nós (ver seção 1.2.7.1, “As emigrações dos Açores”, na p 44).

As justificativas para se realizar um estudo sobre hipotéticos fatores prognósticos na DMJ são de natureza lógica. A grande heterogeneidade clínica e neurológica da DMJ é só parcialmente explicada pela gravidade da mutação (o tamanho das expansões CAG). A hipótese de que modificadores genéticos existam é bastante consistente. Para estudá-la, é necessário se esclarecer melhor quais variáveis clínicas dependem e quais independem de fatores conhecidos ou cognoscíveis – como o curso clínico ou história natural da doença e a gravidade da mutação – para depois se tentar observar sobre elas o efeito desses modificadores.

Se a hipótese de que fatores prognósticos, vale dizer, de que modificadores genéticos estejam atuando na DMJ é consistente, pode-se começar a testá-la através da eleição de genes candidatos, desde que a sua escolha tenha alguma plausibilidade. O raciocínio apresentado aqui é o de que, se as SCAs têm semelhança fenotípica, se quase todas são causadas por poliglutaminas e se faz parte da patogênese a agregação das mesmas, tratos de glutaminas de diferentes origens proteicas poderiam também se agregar com a

poliglutamina da DMJ e influenciar o seu desfecho clínico. Assim, elegeu-se estudar o efeito dos tamanhos das repetições CAG dos loci *SCA2*, *SCA6* e *DRPLA* sobre o fenótipo da DMJ.

3. HIPÓTESES

- Entre as famílias de afetados por ataxias espinocerebelares, no Rio Grande do Sul, teríamos uma grande proporção de casos devidos à doença de Machado-Joseph.
- Entre os pacientes afetados pela doença de Machado-Joseph, certas variações fenotípicas estariam associadas ao efeito modificador de algum dos segmentos CAG dos demais genes SCAs – no presente, os disponíveis para análise seriam os segmentos CAG dos *loci SCA2*, *SCA6* e *DRPLA*. Estes *loci* agiriam como “genes modificadores” sobre o fenótipo DMJ.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

- 1) Estabelecer as frequências relativas das diferentes ataxias espinocerebelares (SCAs) entre os casos (famílias) selecionados a partir do ambulatório do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Objetivos específicos

- 1) Determinar as características clínicas dos doentes portadores de SCAs que vierem à avaliação médica.
- 2) Descrever as manifestações neurológicas encontradas nos doentes.
- 3) Caracterizar as mutações responsáveis por cada família de afetados por SCAs, através da análise molecular dos gene *SCA1*, *SCA2*, *MJD1*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA8* e *DRPLA*.
- 4) Entre os pacientes portadores da DMJ, delinear as possíveis associações entre as variações fenotípicas e os polimorfismos CAG encontrados nos *loci* *SCA2*, *SCA6* e *DRPLA*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 DeJong R. The neurologic examination: incorporating the fundamental of neuroanatomy and neurophysiology. Quarta edição. Cambridge: Harper & Row; 1979.
- 2 Caldas Aulete. Dicionário contemporâneo da língua portuguesa. Segunda edição. Rio de Janeiro: editora Delta; 1964.
- 3 Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. First edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1984.
- 4 Holmes G. An attempt to classify cerebellar disease, with a note on Marie's hereditary cerebellar ataxia. Brain 1907; 30: 545-567.
- 5 Greenfield JG. The spino-cerebellar degenerations. First edition. Oxford: Blackwell; 1954.
- 6 Konigsmark BW, Weiner LP. The olivopontocerebellar atrophies: a review. Medicine 1970; 49: 227-241.
- 7 Baraitser M. The genetics of neurological disorders. Segunda edição. Oxford: Oxford Medical Publications; 1990.
- 8 Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S, Itakura K. Hereditary ataxia and HLA genotypes. N Engl J Med 1974; 291: 154-5.
- 9 Jackson JF, Currier RD, Terasaki PI, Morton NE. Spinocerebellar ataxia and

- HLA linkage: risk prediction by HLA typing. *N Engl J Med* 1977; 296: 1138-41.
- 10 Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP, Beaudet AL (1988). Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. *Ann Neurol* 1988; 23: 580-4.
 - 11 Orozco Diaz G, Nodarse Fleites A, Cordovés Sagaz R, Augurger G. Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology* 1990; 40: 1369-1375.
 - 12 Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY. Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet* 1993; 4: 221-6
 - 13 Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillermann R, Lunkes A, Khati C, Stevanin G, Hernandez A, Magarino C, Klockgether T, Durr A, Chneiweiss H, Enczmann J, Farrall M, Beckmann J, Mullan M, Wernet P, Agid Y, Freund H-J, Williamson R, Augurber G, Chamberlain S. Chromosomal assignment of the second (Cuban) locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to human chromosome 12q23-24.1. *Nature Genet* 1993; 4: 295-9.
 - 14 Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y,

- Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993; 4: 300-3.
- 15 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221- 8.
- 16 Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji S. Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentatorubralpallidoluyisian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 1994; 6: 9-13.
- 17 Stevanin G, LeGuern E, Ravise N, Chneiveiss H, Dürr A, Cancel G, Vignal A, Bovh A-L, Ruberg M, Penet C, Pothin Y, Lagroua I, Haguenu M, Rancurel M, Weissenbach J, Agid Y, Brice A. A third locus for autosomal dominant cerebeller ataxia type 1 maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 11-20.
- 18 Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptacek L (1994) Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a

- distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred [abstract]. *Neurology* 1994; 44(2): A361.
- 19 Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet* 1994 (a); 8: 280-284.
- 20 Benomar A, Le Guern E, Dürr A, Ouhabi H, Stevani G, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y and Brice A. Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA type II) is genetically different from ADCA type I. *Ann Neurol* 1994; 35: 439-444.
- 21 Gouw LG, Digre KB, Harris CP, Aines JH, Ptacek LJ. Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration: clinical, neuropathologic, and genetical analysis of a large kindred. *Neurology* 1994; 44: 1441-1447.
- 22 Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Dürr A, Zaim A, Ravise N, Burque C, Penet C, Van Regemorter N, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Van Broeckhoven C e Brice A. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. *Nat Genet* 1995; 10: 84-88.
- 23 Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY e Ptacek LJ. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat Genet* 1995; 10: 89-93.

- 24 David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, enomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel J e Brice A. Cloning the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 1997; 17: 65-70.
- 25 Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier J-M, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y and Brice A . Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 1996; 14: 285-291.
- 26 Pulst S-M, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunke A, DeJong P, Rouleau G, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996; 14: 269-276.
- 27 Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ahizawa T, Stockton D, Amos C, Dobyns W, Subramony SH, Zoghbi H and Lee CC . Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet* 1997; 15: 62- 68.
- 28 Koob M, Moseley ML, Schut LJ, Benzow K, Bird TD, Day JW and Ranum L.

An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 1999; 21: 379-384.

- 28 Zu L, Figueroa KP, Grewal R, et al. Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22. *Am J Hum Genet* 1999; 64:594-9
- 30 Worth PF, Giunti P, Gardner-Thórpe C, Dixon PH, Davis MB and Wood NW. Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3 *Am J Hum Genet* 1999; 65: 420-426.
- 31 Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth R, Sherr M, Sumner A, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieira-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA and Margolis R. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12 [letter] *Nat Genet* 1999; 23:391-2
- 32 The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's Disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-83.
- 33 La Spada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Petruszewicz IH, Yee W-C, et al. Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of

the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.
Nature Genet 1992; 2: 301-4.

- 34 Willems PJ. Dynamic mutations hit double figures. Nature Genet 1994; 8: 213-5.
- 35 Strong PN e Brewster BS. Myotonic dystrophy: molecular and cellular consequences of expanded DNA repeats are elusive. J Inher Met Dis 1997; 20: 158-170.
- 36 Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, cavalcanti F, et al. Friedreich ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 1996; 271: 1423-27.
- 37 Jones AL, Wood JD e Harper PS. Huntington disease: advances in molecular and cell biology. J Inher Metab Dis 1997; 20: 125-138.
- 38 Paulson HL. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. Am J Hum Genet 1999; 64: 339-345.
- 39 DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod PM, Sequeiros J, Rouleau GA, Farrer LA. Familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 1996; 59:119-127.
- 40 Rosenberg RN. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. Neurology 1995; 45: 1-5.

- 41 Nakano KK, Dawson DM e Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 1972; 22: 49.
- 42 Woods BT and Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear opthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 1972; 17: 149-166.
- 43 Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26 1976; 703-714.
- 44 Coutinho P e Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 1978; 28: 703-709.
- 45 Lima L and Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology* 1980; 30: 319-322.
- 46 Barbeau A, Roy M, Cunha L, et al. The natural history of Machado-Joseph disease. *Can J Neurol Sci* 1984; 11: 510-525.
- 47 Lisboa MFS e Mariotto GSS. Síndrome de Joseph: observação de uma família [Abstract]. *Arq Neuropsiquiatr* 1984; (supl): 45.
- 48 Radvany J, Avila JO, Gabbai AA, Bacheschi LA. Doença de Machado-Joseph no Brasil: o relato das primeiras duas famílias [Abstract]. *Arq Neuropsiquiatr* 1988; (supl.): 46B.
- 49 Sakai T, Ohta M, Ishino H. Joseph disease in a non-portuguese family. *Neurology* 1983; 33: 74-80.

- 50 Bharucha NE, Bharucha EP, Bhabha SK. Machado-Joseph-azorean disease in India. *Arch Neurol* 1986; 43: 142-144.
- 51 Burt T, Blumbergs P, Currie B. A dominant hereditary ataxia resembling Machado-Joseph disease in Arnhem Land, Australia. *Neurology* 1993; 43: 1750-1752.
- 52 Goldberg-Stern, D'jaldeiti R, Melamed E, Gadoth N. Machado-Joseph (azorean) disease in a yemenite jewish family in Israel. *Neurology* 1994; 44: 1298-1301.
- 53 Sequeiros J. Epidemiologia genética da doença de Machado-Joseph. *Arq Inst Nac Saúde* 1989; 14:75-104.
- 54 Sequeiros J . Machado-Joseph disease - Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. In: Lechtenberg R , editor. *Handbook of Cerebellar diseases*. Primeira edição. New York: Marcel Decker Publ; 1993.p. 354-351
- 55 Coutinho P, Siva CC, Freire Gonçalves A, Graça RI, Lourenço E, Sequeiros J, Leal Loureiro J, Guimarães J, Ribeiro P. Epidemiologia da doença de Machado-Joseph em Portugal. *Rev Port Neurol* 1994; 3: 69-76.
- 56 Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S, editores. *Hereditary Ataxias*. *Adv Neurol*, vol. 61. New York: Raven Press; 1993. P. 139-153.
- 57 Teive HAG, Arruda W, Trevisol-Bittencourt PC. Doença de Machado-Joseph.

- Descrição de cinco membros de uma família. *Arq Neuropsiquiatr* 1991; 49: 172-179.
- 58 Teive HAG, Arruda WO e Trevisol PCB. Machado-Joseph disease in South Brazil. Proceedings of the 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease; 7 a 9 de abril de 1994; Furnas, São Miguel, Açores..
- 59 Cassa E, Souza PS e Jardim E. The epidemiology of Machado-Joseph disease at region of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. A preliminary study [Abstract]. Proceedings of the 3rd International Workshop on Machado-Joseph Disease; 7 a 9 de abril de 1994; Furnas, São Miguel, Açores.
- 60 Lopes-Cendes I, Teive HGA, Cardoso F, Viana EM, Calcagnotto ME, Costa JC, Trevisol-Bittencourt PC, Maciel JA, Rosseau M, Santos A, Araújo AQC e Rouleau GA. Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz J of Genet* 1997; 20: 717-724.
- 61 Lopes-Cendes I, Teive HGA, Calcagnotto MA, Costa JC, Cardoso F, Maciel JA, Radvany J, Arruda WO, Trevisol-Bittencourt PC, Rosa-Neto P, Silveira I, Steiner C, Pinto-Junior W, Santos AS, Correa Neto Y, Werneck LC, Araújo AQC, Carakushansky G, Mello LR, Jardim LB e Rouleau GA. Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; 55:519-529.
- 62 Iughetti P, Otto PA, Zatz M e Passos-Bueno MR. Different behavior in the

- paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet* 1998; 77: 246-248.
- 63 Sequeiros J, Coutinho P. Machado-Joseph Disease (#2996). In: Buyse ML, editor. *Birth Defects Encyclopedia*. Primeira edição. Cambridge: Blackwell Sci Publ; 1990. p. 1093-1094.
- 64 Lopes-Cendes I, Silveira I, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Chitayat D, Babul G, Stewart J, Dollivier M, Robitaille Y, Rouleau GA, Sequeiros J. Limits of clinical assessment in the accurate clinical diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 1996 (a); 53:1168-1174.
- 65 Coutinho P, Sequeiros J. Aspects cliniques, génétiques et pathologiques de la maladie de Machado-Joseph. *J Génét Hum* 1981; 29 (3): 203-209.
- 66 Coutinho P. *Doença de Machado-Joseph*. Porto: Laboratórios Bial, 1994.
- 67 Klockgether T, Lüdtke R, Kramer B, Abele M, Bürk K, Schöls L, Riess O, Laccone F, Boesch S, Lopes-Cendes I, Brice A, Inzelberg R, Zilber N and Dichgans. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 1998; 121: 589-600.
- 68 Sequeiros J. Genética Clássica e Genética Molecular da Doença de Machado-Joseph. In: Sequeiros J, editor. *O Teste Preditivo da Doença de Machado-Joseph*. Primeira edição. Porto: UnIGENE, IBMC; 1996 (a). p. 33-48.
- 69 Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, Onodera O, Oyake M, Takano H, Koide R, Tanaka H and Tsuji S. Non-mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is

- preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 730-733.
- 70 Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Cheiweiss H, Agid Y, Feingold J, Brice A. Gender equality in Machado-Joseph disease. *Nat Genet* 1995; 11: 118-119.
- 71 Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura T, M, Saida Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A and Kawakami H. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestatin of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 807-812.
- 72 Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genética Médica*. Quinta edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993.
- 73 Harper P. Trinucleotide repeat disorders. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 122-124.
- 74 Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. Correlation between CAG repeat lenght and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.

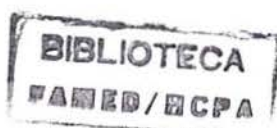
- 75 Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimarães J, Tanaka H, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizawa M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Melki J, Munnich A. Genetic linkage of Machado-Joseph disease to chromosome 14q SRTPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics* 1994; 21: 645-648.
- 76 Twist EC, Causaubon LK, Ruttledge M, Rao VS, MacLeod PM, Radvany J, Zhao Z, et al. Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J Med Genet* 1995; 31: 823-9.
- 77 Schöls L, Vieira-Saecker AM, Schols S, Przuntek H, Epplen JT e Riess O. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1001-5.
- 78 Junck L e Fink JK. Machado-Joseph disease and SCA3: the genotype meets the phenotypes. *Neurology* 1996; 46: 4-8.
- 79 Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al. Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1137-1146.
- 80 Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, Rogaeva EA, Sasaki H, Wakisaka A, Zhou Y-X, Takano H, Endo K, Sanpei K, Oyake M, Tanaka H, Stevanin G, Abbas N, Dürr A, Rogaev EI, Sherrington R, Tsuda T, Ikeda M, Cassa

- E, Nishizawa M, Benomar A, Julien J, Weissenbach J, Wang G-X, Agid Y, St George-Hyslop PH, Brice A, Tsuji S. Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 923-932.
- 81 Lopes-Cendes I, Maciel P, Kish S, Gaspar C, Robitaille Y, Clark HB, Koeppen AH, Nance M, Schutt L, Silveira I, Coutinho P, Sequeiros J, Rouleau GA. Somatic mosaicism in the central nervous system in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 1996 (b) 40:199-206.
- 82 Maciel P, Lopes-Cendes-I, Kish S, Sequeiros J, Rouleau GA. Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients (lett). *Am J Hum Genet* 1997; 60:993-996.
- 83 Takano H, Onodera O, Takahashi H, Igarachi S, Yamada M, Oyake M, Ikeuchi T, Koide R, Tanaka H, Iwabuchi K, Tsuji S. Somatic mosaicism of expanded CAG repeats in brains of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy: cellular population-dependent dynamics of mitotic instability. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1212-1222.
- 84 Zatz M, Cerqueira A, Vainzof M, Passos-Bueno MR. Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy locus. *J Med Genet* 1997; 34: 790-791.

- 85 Leeflang EP, McPeck MS, Arnheim N. Analysis of meiotic segregation, using single sperm typing: meiotic drive at myotonic dystrophy locus. *Am J Hum Genet* 1996; 896-904.
- 86 Ranum LPW, Chung M, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, et al. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. *Am J Hum Genet* 1994 (b)55: 244-52.
- 87 Maciel P, Gaspar C, Guimarães L, Goto J, Lopes-Cendes I, Hayes S, Arvidsson K, Dias A, Sequeiros J, Souza A, Rouleau G. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 147-156.
- 88 Stevanin G, Lebre AS, Mathieux C, Cancel G, Abbas N, Didierjean O, Dürr A, Trottier Y, Agid Y e Brice A. Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/Machado Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1548-1552.
- 89 Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, Silveira I, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, Farrer L, Rouleau G. Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet* 1996; 98: 620-624.
- 90 Cesar G. História do Rio Grande do Sul. Período Colonial. Segunda edição. Porto

Alegre: Editora Globo; 1970.

- 91 Piazza WF. A epopéia açórico-madeirense 1748-1756. Primeira edição. Florianópolis: Editora da UFSC; 1992.
- 92 Stevanin G, Cancel G, Didierjean O, Dürr A, Abbas N, Cassa E, Feingold J, Agid Y e Brice A. Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral portuguese-azorean mutation. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1247-1250.
- 93 Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen J, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 1997; 42: 924-932.
- 94 Dubourg O, Dürr A, Cancel G, Stevanin G, Chneiweiss H, Penet C, Agid Y, Brice A . Analysis of the SCA1 CAG repeat in a large number of families with dominant ataxia: clinical and molecular correlations. *Ann Neurol* 1995; 37: 176-180.
- 95 Kakizuka A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics* 1998; 14: 396-402.
- 96 Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Júnior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg RN, MacLeod PM, Sequeiros



- J, Rouleau GA: Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidolusian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 1996; 46:214-218.
- 97 Lopes-Cendes I, Steiner C, Silveira I, Pinto-Junior W, Maciel J, Rouleau G. Clinical and molecular characteristics of a Brazilian family with spinocerebellar ataxia type 1. *Arq Neuropsiquiatr* 1996 (c) ; 54:421-418.
- 98 Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst S. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 842-850.
- 99 Takahata N, Ito K, Yoshimura Y, Nishihori K, Suzuki H. Familial chorea and myoclonus epilepsy. *Neurology* 1978; 28: 913-919.
- 100 Ikeuchi T, Koide R, Tanaka H, Onodera O, Igarishi S, Takahashi H, Kondo R, et al. Dentato-rubral-pallidopuysian atrophy (DRPLA): clinical features are closely related to unstable expansions of trinucleotide (CAG) repeat. *Ann Neurol* 1995; 37: 769-775.
- 101 Flanigan K, Gardner K, Alderson K, Galster B, Otterud B, Leppert MF, Kaplan C, Ptáček. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1 *Am J Hum Genet* 1996; 59: 392-399.
- 102 Ophoff RA, terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman

- SMG, Lamerdin JE, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNA1A . Cell 1996; 87: 543-552.
- 103 Yue Qing, Jen J, Nelson S, Baloh R. Progressive ataxia due to a missense mutation in a Calcium-channel gene. Am J Hum Genet 1997; 61: 1078-1087.
- 104 Stevanin G, David G, Abbas N, Dürr A, Holmberg M, Duyckaerts C, Giunti P, Cancel G, Ruberg M, Mandel J-L, Brice A . Spiocerebellar ataxia type 7 (SCA7). In: Rubinsztein DC and Hayden MR, editores. Analysis of triplet repeat disorders. First edition. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1998.
- 105 David G, Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Benomar A, Belal S, Lebre A, Abada-Bendib M, Grid D, Holmberg M, Yahyaoui M, Hentati F, Chkili T, Agid Y and Brice A. Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). Hum Molec Genet 1998; 7: 165-170
- 106 Giunti P, Stevanin G, Worth PF, David G, Brice A, Wood NW. Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. Am J Hum Genet 1999; 64: 1594-1603.
- 107 Silveira I, Alonso I, Guimarães L, Mendonça P, Santos C, Maciel P, Fidalgo de Matos JM, Costa M, Barbot C, Tuna A, Barros J, Jardim L, Coutinho P

- and Sequeiros J. High germinal instability of the (CTG)_n at the SCA8 locus of both expanded and normal alleles. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 830-840.
- 108 Stevanin G, Herman A, Dürr A, Jodice C, Frontali M, Agid Y and Brice A. Are (CTG)_n expansions at the SCA8 locus rare polymorphisms? *Nature G* 2000; 24: 213.
- 109 Worth P, Houlden H, Giunti P, Davis M and Wood NW. Large, expanded repeats SCA8 are not confined to patients with cerebellar ataxia. *Nature Genet* 24: 214-215.
- 110 Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka ^a Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 1996; 13: 196-202.
- 111 Hackam AS, Wellington CL e Hayden MR. The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. *Clin Genet* 1998; 54(Suppl 1): 23-32.
- 112 Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997; 90: 537-548.
- 113 DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vontassel JP, Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997; 277: 1990-1993.

- 114 Skinner PJ, Koshy BT, Cummings CJ, Klement IA, Helin K, Servadio A, Zoghbi HY. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 1997; 389: 971-974.
- 115 Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst C-A, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure L, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997; 91: 753-763.
- 116 Perutz MF. Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Molecular Medicine* 1995; 1: 718-721.
- 117 Burright EN, Davidson JD, Duvick LA, Koshy B, Zoghbi HY, Orr HT. Identification of a self-associated region within the SCA1 gene product, ataxin-1. *Hum Mole Genet* 1997; 6: 5113-518.
- 118 Hardy J e Gwinn-Hardy K. Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 1998; 282: 1075-1078.
- 119 Subramony SH, Currier RD, Jackson JF, Collins GM. Presumed Joseph disease: three new kindred and response to anti-Parkinson drugs [abstract]. *Ann Neurol* 1990; 28: 233 (P49).
- 120 Spinella GM and Sheridan PH. Research initiatives on Machado-Joseph disease: National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop summary. *Neurology* 1992; 42: 2048-2051.
- 121 Azulay JP, Blin O, Mestre D, Sangla I, Serratrice G. JP Contrast sensitivity

- improvement with sulfamethoxazole and trimethoprim in a patient with Machado-Joseph disease without spasticity. *J Neurol Sci* 1994; 123:1-2, 95-9
- 122 Lou JS, Goldfarb L, McShane L, Gatev P, Hallet M. Use of buspirone for treatment of cerebellar ataxia. An open-label study. *Arch Neurol* 1995; 52: 982-988.
- 123 Sakai T; Antoku Y; Matsuishi T; Iwashita H. Tetrahydrobiopterin double-blind, crossover trial in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci*, 1996; 136:1-2, 71-2.
- 124 Friedman JH. Machado-Joseph disease / spinocerebellar ataxia 3 responsive to buspirone. *Mov Dis* 1997; 12: 613-614.
- 125 Botez MI; Botez-Marquard T; Mayer P; Marchand L; Lalonde R; Reader TA. The treatment of spinocerebellar ataxias: facts and hypotheses. *Med Hypotheses* 1998;51:381-4
- 126 Shoulson I. Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs. *Science* 1998; 282: 1072-1074.
- 127 Aldred M. Therapy for CAG-repeat diseases? *Mol Med Today* 1998; p. 187-188.
- 128 Sequeiros J . Aconselhamento Genético e Teste Preditivo na Doença de Machado-Joseph. In: Sequeiros, editor. *O Teste Preditivo da Doença de Machado-Joseph*. Primeira edição. Porto: UnIGENE, IBMC; 1996 (b). p. 97-112.
- 129 Kessler S. *Genetic Counseling. Psychological dimensions*. Primeira edição.

New York: Academic Press; 1979.

- 130 Sequeiros J, Maciel P, Taborda F, Ledo S, Rocha JC, Lopes A, Reto F, Fortuna AF, Rousseau M, Fleming M, Coutinho P, Rouleau GA, Jorge CS. Prenatal diagnosis of Machado-Joseph disease by direct mutation analysis: questions raised in dominant ataxias and other late-onset disorders. *Prenatal Diagnosis* 1998; 18:611-617.
- 131 Boutté MI. Waiting for the family legacy: the experience of being at risk for Machado-Joseph disease. *Soc Sci Med* 1990; 30: 839-847.
- 132 Fleming M. Intervenção psicológica na crise – a experiência com a Paramiloidose. . In: Sequeiros J, editor. *O Teste Preditivo da Doença de Machado-Joseph*. Primeira edição. Porto: UnIGENE, IBMC; 1996. p. 123-149.
- 133 Bird TD e Bennett RL. Why do DNA testing? Practical and ethical implications of new neurogenetic tests. *Ann Neurol* 1995; 38: 141-146.
- 134 Wexler NS. The Tiresias complex: Huntington's disease as a paradigm of testing for late-onset disorders. *FASEB J* 1992; 2820-2825.
- 135 Sófocles. *Rei Édipo*: p. 89. *Tragédias gregas*. Rio de Janeiro: Edições de ouro.
- 136 Paúl C. Reacções esperadas aos resultados do teste preditivo – a experiência dos programas da doença de Huntington. . In: Sequeiros J, editor. *O Teste Preditivo da Doença de Machado-Joseph*. Primeira edição. Porto: UnIGENE, IBMC; 1996. p. 123-149.

6. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS

6.1 Artigo 1

A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 49 new families with Machado-Joseph disease or SCA7.

Running head: Spinocerebellar ataxias in South Brazil

Laura Bannach Jardim ^{1, 2}, Isabel Silveira ⁵, Maria Luiza Pereira ^{1, 3}, Anabela Ferro ⁵, Isabel Alonso ⁵, Maria do Céu Moreira ⁵, Pedro Mendonça ⁵, Fátima Ferreirinha ⁵, Jorge Sequeiros ⁵ and Roberto Giugliani ^{1, 4}.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departments of ² Internal Medicine, ³ Biochemistry and ⁴ Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and ⁵ UniGENe, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.

Address correspondence to:

Laura B. Jardim

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, Brazil

Phone + 55 51 316 8011, Fax + 55 51 316 8010

e-mail laurajardim@terra.com.br

1. Abstract

The autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a clinical and genetically heterogeneous group of debilitating, neurodegenerative diseases, related to twelve different *loci* - SCAs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 and 12, Machado-Joseph disease (MJD / SCA 3), and DRPLA. The aims of the present investigation were: (1) to verify the frequency of SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6, SCA7 and SCA8 in a case series of new SCA patients from South Brazil and (2) to compare their molecular and clinical characteristics with other patients previously described. One hundred and ten patients were included in the present study: 96 patients from 52 families and 14 sporadic cases. We have found that 81 % of all patients (and 92 % of families with autosomal dominant inheritance) segregated the MJD1 mutation, 3 % of patients (corresponding to 2 % of families) segregated the SCA7 mutation, 1 % of all patients showed the SCA8 mutation, while 15 % (or 6 % of families) remained undiagnosed. Clinical and molecular findings were similar to those already described in literature, but revealed (1) one SCA7 patient with eyelid retraction, a sign usually related to MJD; and (2) one sporadic case of SCA8, a finding probably related to the existence of a pre-mutational range of the CTG repeat tract. The estimated frequency of affected individuals with MJD, in our region, was 1.8 / 100,000, and of SCAs other than MJD, 0.2 / 100,000.

Key Words: Machado-Joseph disease; Polyglutamine diseases; SCA 7; SCA 8; Spinocerebellar ataxias.

2. Introduction

The autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a clinical and genetically heterogeneous group of debilitating and often fatal neurodegenerative diseases characterized by a generalized incoordination of gait, speech and limb movements^{1, 2}. Extracerebellar deterioration also occurs in most patients, presenting as variable nuclear or supranuclear ophthalmoparesis, slow saccades, pyramidal or extrapyramidal signs, neuropathy, or decreased vibration sense. Typical onset of symptoms occurs between 30 to 40 years, and symptoms progress slowly. In successive generations, onset may be earlier and progression more severe, a phenomenon known as anticipation².

Twelve different *loci* related to SCAs have been identified so far: SCA1 at 6p^{3,4}, SCA2 at 12q^{5,6}, Machado-Joseph disease (MJD1) at 14q^{7,8,9}, DRPLA at 12p¹⁰, SCA4 at 16q¹¹, SCA5 at 11cen¹², SCA6 at 19p¹³, SCA7 at 3p¹⁴, SCA8 at 13q¹⁵, SCA10 at 22q¹⁶, SCA11 at 15q¹⁷ and SCA12 at 5q¹⁸. SCA1, SCA2, MJD1, SCA6, SCA7 and DRPLA are caused by expanded CAG repeats that are translated into polyglutamine tracts, while SCA8 is associated with a non-coding CTG expansion. Both CAG and CTG expansions are dynamic mutations, and clinical anticipation has been observed in the majority of cases^{4,9, 19, 20, 21, 22, 23}. However, while the polyglutamine tract is thought to exert its effect through a toxic gain of function of the corresponding protein, the effect of an expanded CTG tract on an untranslated region of a gene is still unknown^{15, 23}.

The availability of direct gene testing for the majority of SCAs has permitted the determination of their frequencies in several populations. In many of them, especially in

those of Portuguese, German and Japanese ancestries, the MJD1 mutation accounts for the majority of diagnoses ^{24, 25, 26, 27}.

The aims of the present investigation were: (1) to verify the frequency of SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6, SCA7 and SCA8 in a case series of SCA patients from Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil and (2) to verify if their molecular and clinical characteristics are similar to other patients previously described.

3. Materials and Methods

A total of 110 patients were included in the present study: 96 patients from 52 unrelated families and 14 sporadic cases, all with a homogeneous geographic origin: the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul, located around parallel 30, where 10,000,000 people live. Forty-four families and 5 sporadic cases were of Portuguese ancestry, 5 families and 1 sporadic case were Afro-Brazilian, 2 families and 1 isolated case had German ancestry, and 1 family and 7 sporadic cases had Italian ancestry.

The diagnosis of SCA in the probands was determined by clinical history and examination. Inclusion criteria of SCA were progressive cerebellar ataxia of adulthood in association with at least one of the following signs: ophthalmoplegia, optic atrophy, pyramidal signs, decreased vibration and/or tactile and/or algesic senses, dementia, extrapyramidal signs. Patients with an autosomal dominant inheritance were called familial cases. When patient had no affected ancestors, he (she) was classified as an sporadic case, after excluding the adult forms of lysosomal storage disorders and adrenoleukodystrophy.

Data about clinical histories, heredograms, neurologic examination and molecular analyses were plotted on data files Microsoft Excel and SPSS for Windows.

Peripheral blood was collected from patients and their relatives; written informed consent was obtained from each individual. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by standard techniques²⁸.

Molecular analysis of the trinucleotide repeat *loci* were performed by PCR amplification using the published primer sequences ^{4, 9, 13, 15, 29, 30} ; PCR was carried out with 1 μ M of each primer; 200 μ M of dNTPs; 1,0 mM MgCl₂; 10 mM Tris, pH 9.0; 50 mM KCl; 1 U of *Taq* polymerase, and 2% formamide, in a final volume of 25 μ l. Samples were processed as previously described ^{13, 23, 25, 30} . PCR products were analysed on 6% polyacrylamide gels. Allele sizes were determined by comparing migration relative to an M13 sequencing ladder. Both the CTA and the CTG repeats on the SCA8 gene are polymorphic and PCR assay determines the combined size of the two repeats.

4. Results

Among the 52 investigated families, we have found 48 families with expansions at the MJD1 locus and 1 family with an expansion at the SCA7 locus. Among the 14 sporadic patients, one showed an expansion at the SCA8 locus. In the present sample, 81% of all patients (and 92% of families with autosomal dominant inheritance) segregated the MJD1 mutation, 3% (and 2% of families) segregated the SCA7 mutation, 1% of all patients segregated the SCA8 mutation and 15% (6% of the families) remained undiagnosed (Table 1).

MJD families had 178 living affected persons. After excluding MJD cases, 21 living persons with other SCAs (with or without family history) were found. These numbers give a frequency of affected persons with MJD, in our region, of 1.8 / 100,000, and of SCAs other than MJD, of 0.2 / 100,000 (Table 1).

4.1 MJD cases

MJD comprises for the absolute majority of diagnoses of the present series. Their clinical and genetic data will be presented with details elsewhere (unpublished data).

Eighty-nine patients, belonging to 48 families, had a CAG expansion detected at MJD1 locus. Normal MJD1 alleles contained from 14 to 38 repeats, the most frequent being the allele with 24 repeats. The affected chromosomes had an expansion showing from 69 to 85

CAG repeats, the most frequent being the allele with 73 repeats.

4.2 The SCA 7 family

One Afro-Brazilian family segregated CAG expanded alleles in the SCA7 locus. Three of its affected relatives were examined. The index case, patient J, was a 44 years-old woman whose disease started when she was 35 with gait ataxia and dysarthria. Her neurologic examination showed: a pseudobulbar dysarthria; limb and gait ataxia, with independence still preserved; a mild, generalized spasticity and hyperreflexia with flexor plantar responses and preserved muscle power; a reduction in the vibratory sense to 7 seconds in her ankles; a mild peripheral facial paresis in the right side; bilateral optic atrophy, sluggish photomotor responses, and limitations on vertical gaze and on convergence. It is important to note that this patient had a marked eyelid retraction.

Her brother, patient M, was a 47 years-old man, who had been ataxic since his 44. His neurologic signs were milder, including a mild dysarthria; mild limb and gait ataxia, with independence still preserved; dystonic posturing on upper limbs while maintaining upper limb extension; generalized hyperreflexia, with flexor plantar responses; reduction in the vibratory sense to 5 seconds in his toes; mild paresis of convergence, with normal eyelids and fundoscopy.

Patient R was the 24 years-old son of patient M. His disease started with gait ataxia and a sudden visual loss when he was 17. At the time of his examination, he was able to read (capital letters). His neurologic examination revealed dysarthria; an important gait ataxia,

with independence still preserved, limb movements being also dysmetrics; a mild and generalized spasticity, with hyperreflexia, but with flexor plantar responses and preserved muscle power; well-delineated muscles; a borderline vibration sense; bilateral optic atrophy and decreased pigmentation of the fundus, without any limitation of ocular movements, or nystagmus, or eyelid retraction. His visual evoked potentials also showed a bilateral, axonal and myelinic blockade in his visual tracts.

None of them showed decrease mentation, amyotrophies, abnormal involuntary movements or abnormalities of their saccades and pursuit movements.

Normal CAG lengths in the SCA7 gene ranged from 12 to 15 repeats, in a control population of 83 ataxic patients without diagnosis that have been studied by our laboratory (Porto). The positive results of the present pedigree were as follows: patient J had one allele with 12 and other with 42 repeats; patient M, 12 and 44 repeats; and patient R, 12 and 53 repeats.

4.3 The SCA 8 case

A 41 years-old woman, with a negative familial history, was found carrying a CTG expansion in the SCA8 *locus*; her molecular findings were already reported²³. She started having dysarthria when she was 31 years-old, followed by gait ataxia. The neurologic examination showed both of these findings, and also: mild limb ataxia; a reduction in vibratory sense in her toes; ataxic ocular movements, on pursuit, and nystagmus on lateral gaze. There were no pyramidal, extrapyramidal or lower motor neuron findings, and her

mentation and fundoscopy were normal.

Normal CAG lengths in the SCA8 gene ranged from 15 to 91 CTG repeats, in 909 individuals studied by us ²³. On the other hand, the molecular studies performed in DNA from this patient showed one allele with 23 and another with 104 repeats.

5. Discussion

Several reports estimated the relative frequencies of different SCAs among patients from Portugal, United States, Germany, United Kingdom and of multiple origins^{21, 24, 25, 26, 31}. In all but British population, MJD was the most frequent dominant ataxia, being responsible for 17% of autosomal dominant non-Portuguese families²⁵, for 50% of German families²⁶, for 43% of Japanese families²⁷ for 74% of families from mainland Portugal and for 89% of families from Azores²⁵.

The first reports of Brazilian families with the clinical diagnosis of MJD were presented in 1984 and 1988^{32, 33}. Two subsequent studies, based on molecular findings, gave estimations of the relative frequencies of some SCAs among 54 and 19 Brazilian families from several geographic origins^{34, 35}. In these studies, MJD1 mutation was responsible for 44 and for 68%, respectively, of familial cases. The present study disclosed the highest proportion of new MJD diagnosis among new Brazilian patients, or 92% of the 52 studied SCA families, the same proportion of MJD found in the Azores³⁶. This finding could be the result of our ethnic origin. Portuguese occupation of southern territory of Brazil – from where our cases originated – started in the XVI Century and became more important with the first Azorean settlement, in 1752³⁷. Portuguese, Azorean and Spanish ancestries still remain as the main components of our population, followed by African (XVII Century), German and Italian (XIX Century) ancestries.

Data about the prevalence of SCAs, in general, are very sparse. It is expected that it would exhibit great variations, according to the studied population and its gene frequencies, and

also to method of case-ascertainment. For example, the prevalence ratio of SCAs in North Italy has been calculated as 1 / 100,000³⁸. On the other hand, data about the prevalence of MJD in populations of Portuguese and Azorean ancestry are well known. The prevalence of SCAs and of MJD can be calculated from the number of living patients counted from pedigrees and family information³⁹ and this method was used in the present study. The prevalence ratio of MJD among the Portuguese of the most endemic areas – Azores, Massachusetts, Rhode Island, and California – is very similar and amounts to about 25 / 100,000. This prevalence falls to 1 / 100,000 when the population comes from mainland Portugal³⁶.

In the present study, we calculated the frequency of MJD, in South Brazil, as being 1.8 / 100,000, a number which may reflect a founder effect of Azorean origin. The frequency of other SCAs are very small, amounting to 0.2 / 100,000, and consisting, in the present series, of 3 patients with SCA7; 1 patient with SCA8; and 17 patients (4 familial and 13 sporadic cases) without SCA2, MJD, SCA6, DRPLA, SCA7 or SCA8 mutations. However, we are aware that these numbers are probably underestimated, since it is unlikely that all affected families of the population had been studied.

The CAG length of expanded and normal MJD alleles, found in the present cases, agreed with the range previously described^{23, 34}. Other clinical and molecular characteristics of MJD patients will be discussed elsewhere (unpublished data).

SCA7, formerly known as ADCA II⁴⁰, is a clinical and genetically distinct SCA, whose gene, mapped to the short arm of chromosome 3^{14, 41}, contains a CAG repeat that was

expanded in affected patients ⁴². On mutant alleles, CAG repeat size is highly variable, ranging from 38 to 130 repeats, whereas on normal alleles it ranges from 7 to 17 repeats ⁴².

The following signs were the most frequently found among SCA7 ⁴³: gait ataxia (100%), limb ataxia (98%), dysarthria (98%), decreased visual acuity (85%), slow eye movements (88%), hyperreflexia (78%), decreased vibration sense (62%), ophtalmoplegia (53%), extensor plantar reflexes (52%), lower limb spasticity (41%), and facial myokymia (16%).

The present patients had clinical characteristics, neurological findings and molecular results, all comparable with those found in the literature ^{42, 43, 44}. They probably constitute the second Brazilian SCA7 family which has been reported ⁴⁵.

SCA7 has the particular characteristic of affecting the retina, so that it can be suspected on clinical grounds – if loss of vision is present in the patient. However, the index case of the present report was a woman with optic atrophy but without loss of vision; and with eyelid retraction, a sign which characterise MJD pedigrees. This fact emphasizes that clinical assessment of individual cases is limited to the suspicion of SCAs in general, including MJD ^{1, 2, 46}.

A new ataxia related gene, named SCA8, was localised in chromosome 13q in 1999 ¹⁵. The mutation consists in the expansion of an untranslated composite (CTA)_n (CTG)_n, present in the 3' terminal exon of a gene of unknown function. It was associated with a disease which starts, on average, at 39 years (ranging from 18 to 65 years), and whose clinical findings included spastic and ataxic dysarthria, nystagmus, limb and gait ataxia, limb spasticity and

diminished vibration perception. Repeat length of pathogenic alleles ranged from 110 to 130 combined CTA-CTG repeats (107-127 CTG repeats alone), while more than 99% of the control population (1,200 chromosomes) ranged from 16 to 37 combined repeats. Within the SCA8 families, 20 symptom-free individuals, with ages similar to those of affected people, carried an expanded allele with repeat lengths between 74 to 94 repeats, shorter than those found among affected persons. From the eight kindreds in which this mutation was identified, 2 families showed multiple affected siblings with unaffected parents, and 1 consisted of a sporadic ataxic patient. It was suggested that the SCA 8 expanded gene would have an incomplete penetrance, according to both age and repeat length, and for this reason affected individuals did not always have an obvious dominant family history of ataxia ¹⁵.

The present sporadic patient showed neurologic manifestations and molecular findings similar to those previously described ¹⁵. Her lack of family history could be explained by a possible existence of a pre-mutational range of CTG repeat tract, varying from 40 to 91 repeats, a range in which they are particularly unstable ^{15,23}.

The association of (CTG)_n expansions in the SCA8 locus with the disease determination was questioned by the recent findings of expanded SCA8 repeats in healthy controls and in patients with other central nervous system disorders ^{47, 48}. Therefore, in the actual state of knowledge, we believe that the definite establishment of the SCA8 expansions as the determinant of disease, in this and other detected pedigrees, should wait until a pathological mechanism be proved.

In conclusion, our findings indicated that MJD is the main form of the SCAs diagnosed in South Brazil, comprising 81% of patients, giving a frequency of 1.8 / 100,000 inhabitants in this area. The clinical and molecular features of MJD patients were similar to previous reports. Other forms of SCA are too rare, although one SCA7 family and one sporadic case with SCA8 were also detected. The presence of eyelid retraction in one SCA7 patient, a neurological feature usually associated to MJD, points to the importance of the molecular diagnosis for these conditions.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank Drs. Ana C. S. Puga and Leticia R. Mello, for helping in organising the clinical material. This work was supported in part by FAPERGS.

7. References

- 1 Harding AE. 1993. Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol*: 61: 1-14.
- 2 Rosenberg RN. 1995. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology*: 45: 1-5.
- 3 Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S, Itakura K. 1974. Hereditary ataxia and HLA genotypes. *N Engl J Med*: 291: 154-5.
- 4 Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AI, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY. 1993. Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet*: 4: 221-6
- 5 Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, et al. 1993. Chromosomal assignment of the second (Cuban) locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to human chromosome 12q23-24.1. *Nature Genet*: 4: 295-9.
- 6 Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier J-M, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y and Brice ^a 1996. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet*: 14: 285-291.
- 7 Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M,

- Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O and Tsuji S. 1993. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet*: 4: 300-3.
- 8 Stevanin G, Le Guern E, Ravisé N, Chneiweiss H, Dürr A, Cancel G, Vignal A, et al. 1994. A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type I maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. *Am J Hum Genet*: 54: 11-20.
- 9 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S and Kakizuka A . 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* : 8: 221- 8.
- 10 Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, TomodaA, Miike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji S. 1994. Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentatorubralpallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet*: 6: 9-13.
- 11 Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M, Ptacek L. 1994. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred [abstract]. *Neurology*: 44(2): A361.
- 12 Ranum LP, Shut LJ, Lundgren JK, Orr HT, Livingston DM . 1994a . Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet*: 8: 280-284.

- 13 Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ahizawa T, Stockton D, Amos C, Dobyns W, Subramony SH, Zoghbi H and Lee CC . 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} - voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet*: 15: 62- 68.
- 14 Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY and Ptacek LJ. 1995. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat Genet*: 10: 89-93.
- 15 Koob M, Moseley ML, Schut LJ, Benzow K, Bird TD, Day JW and Ranum L. 1999. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet*: 21: 379-384.
- 16 Zu L, Figueroa KP, Grewal R, et al. 1999. Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22. *Am J Hum Genet*: 64: 594-9.
- 17 Worth PF, Giunti P, Gardner-Thórpe C, Dixon PH, Davis MB and Wood NW. 1999. Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3 *Am J Hum Genet*: 65: 420-426.
- 18 Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth R, Sherr M, Sumner A, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieira-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA and Margolis R. 1999. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12 [letter] *Nat Genet*: 23:391-2 .
- 19 Chung M, Ranum L, Dudvick L, Servadio A, Zoghbi HY and Orr HT. 1993. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*: 5: 254-258.

- 20 Ranum LPW, Chung M, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH, Goldfarb L, Gomez C, Sandkuijl LA, Orr Ht and Zoghbi HY. 1994b . Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. *Am J Hum Genet*: 55: 244-52.
- 21 Ranum LPW, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman JÁ, Bird TD, Gomez C, Orr HY . 1995. Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with Dominant, recessive or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet*: 57: 603-608.
- 22 Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura M, Saida T, Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A and Kawakami H. 1995 . Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestatin of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*: 4: 807-812.
- 23 Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. 1995. Correlation between CAG repeat lenght and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*: 57: 54-61.
- 23 Silveira I, Alonso I, Guimarães L, Mendonça P, Santos C, Maciel P, Fidalgo de Matos JM, Costa M, Barbot C, Tuna A, Barros J, Jardim L, Coutinho P and Sequeiros J. 2000. High germinal instability of the (CTG)_n at the SCA8 locus of both expanded and normal alleles. *Am J Hum Genet* 66: 830-840.
- 24 Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A, Guimarães J, Loureiro L,

- Sequeiros J, Rouleau GA . 1998. Molecular genetic studies in spinocerebellar ataxias: analysis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in patients from 48 Portuguese ataxia families *Am J Med Genet (Neuropsychiat Genet)*: 81:134-138.
- 25 Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Júnior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg RN, MacLeod PM, Sequeiros J, Rouleau GA. 1996. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology*: 46:214-218.
- 26 Schöls L, Vieira-Saecker AMM, Schöls S, Przuntek H, Epplen JT, Riess O . 1995. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet* 4: 1001-1005.
- 27 Takano H; Cancel G; Ikeuchi T; Lorenzetti D; Mawad R; Stevanin G; Didierjean O; Durr A; Oyake M; Shimohata T; Sasaki R; Koide R; Igarashi S; Hayashi S; Takiyama Y; Nishizawa M; Tanaka H; Zoghbi H; Brice A; Tsuji S. 1998. Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations *Am J Hum Genet* 63(4):1060-6.
- 28 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 29 Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis S, Boss CA. Novel triplet repeat containing

- genes in human brain? Cloning, expression, and length polymorphisms. *Genomics*: 16: 572-579.
- 30 Pulst S-M, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau G, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. 1996. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* :14: 269-276.
- 31 Leggo J, Dalton A, Morrison PJ, Dodge A, Connarty M, Kotze M and Rubinsztein DC . 1997. Analysis of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6, dentaturubral-pallidolusian atrophy, and Friedreich's ataxia genes in spinocerebellar ataxia patients in the UK. *J Med Genet*: 34: 982-985.
- 32 Lisboa MFS and Mariotto GSS. 1984 [Joseph Syndrome: report of one family]. Abstract (Portuguese). *Arq Neuropsiquiatr*: 42 (S): 45.
- 33 Radvany J, Avila JO, Gabbai AA, Bacheschi LA. 1988.[Machado-Joseph disease: the first two reported families from Brazil]. Abstract (Portuguese). *Arqu Neuro-Psiquiat*: 46 (S): 152.
- 34 Lopes-Cendes I, Teive HGA, Cardoso F, Viana EM, Calcagnotto ME, Costa JC, Trevisol-Bittencourt PC, Maciel JA, Rosseau M, Santos A, Araújo AQC and Rouleau GA. 1997. Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz J of Genet*: 20: 717-724.
- 35 Iughetti P, Otto PA, Zatz M and Passos-Bueno MR. Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families.

- Am J Med Genet 1998; 77: 246-248.
- 36 Sequeiros J. 1989. Epidemiologia genética da doença de Machado-Joseph. *Arq Inst Nac Saúde*: 14:75-104.
- 37 Cesar G. História do Rio Grande do Sul. Período Colonial. Porto Alegre: Editora Globo, p: 101, 118, 126-128.
- 38 Leone M, Bottacchi E, D'Alessandro G and Kustermann S. 1995. Hereditary ataxias and paraplegias in Valle d'Aosta, Italy: a study of prevalence and disability. *Acta Neurol Scand*: 91: 183-187.
- 39 Sequeiros J, Coutinho P. 1993. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds): "Hereditary Ataxias". *Adv Neurol*, vol. 61, pp. 139-153, Raven Press, New York, NY.
- 40 Harding AE. 1984. The hereditary ataxias and related disorders. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- 41 Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, Le Guern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Dürr A, Zaim A, Ravise N, Busque C, Penet C, Van Regemorter N, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Van Broeckhoven C and Brice^a 1995. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. *Nat Genet*: 10: 84-88.
- 42 David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel J and Brice A. 1997. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet*: 17: 65-70.

- 43 David G, Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Benomar A, Belal S, Lebre A, Abada-Bendib M, Grid D, Holmberg M, Yahyaoui M, Hentati F, Chkili T, Agid Y and Brice A. 1998. Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Molec Genet*: 7: 165-170.
- 44 Benomar A, Le Guern E, Dürr A, Ouhabi H, Stevani G, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y and Brice A. 1994. Autosomal-dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration (ADCA type II) is genetically different from ADCA type I. *Ann Neurol*: 35: 439-444.
- 45 Stevanin G, David G, Abbas N, Dürr A, Holmberg M, Duyckaerts C, Giunti P, Cance Ruberg M, Mandel JL, Brice A. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7). In Rubins: DC and Hayden MR, eds. *Analysis of triple repeat disorders*. Oxford: BIOS Scier Publishers Ltd, 1998.
- 46 Lopes-Cendes I, Silveira I, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Chitayat D, Babul G, Stewart J, Dollivier M, Robitaille Y, Rouleau GA, Sequeiros J. 1996. Limits of clinical assessment in the accurate clinical diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*: 53:1168-1174
- 47 Stevanin G, Herman A, Dürr A, Jodice C, Frontali M, Agid Y and Brice A. 2000. Are (CT) expansions at the SCA8 locus rare polymorphisms? *Nature Genet*: 24: 213.
- 48 Worth P, Houlden H, Giunti P, Davis M and Wood NW. 2000. Large, expanded repeat SCA8 are not confined to patients with cerebellar ataxia. *Nature Genet*: 24: 214-215.

Table 1 – Diagnoses found in this sample

	Machado-Joseph disease	SCA 7	SCA 8	No diagnosis	Totals
Number of familial cases (number of families)	89 (48)	3 (1)	-	4 (3)	96 (52)
Number of living affected persons with family history	178	3 a	-	4 b	
Sporadic cases	-	-	1 ^c	13 d	14
Relative frequency of patients in the present sample	81 %	3 %	1 %	15 %	
Relative frequency of families of the present sample	92 %	2 %	-	6 %	
Estimated prevalence	1.8 / 100,000	0.2 / 100,000 (a + b + c + d / population)			

Um estudo das ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes no sul do Brasil – achados clínicos e moleculares de 49 novas famílias com doença de Machado-Joseph ou SCA7.

(Versão em Português do artigo:

“A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 49 new families with Machado-Joseph disease or SCA7”)

1. Resumo

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (SCAs) constituem um grupo de doenças neurodegenerativas muito debilitantes, com grande heterogeneidade clínica e genética. Elas estão associadas a doze diferentes *loci* - SCAs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 12, doença de Machado-Joseph (MJD/SCA 3), e DRPLA. Os objetivos da presente investigação foram: (1) verificar a frequência da SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6, SCA7 e SCA8 em uma série de casos de pacientes com SCAs, provenientes do sul do Brasil e (2) comparar suas características clínicas e moleculares com as de pacientes previamente descritos. Cento e dez pacientes foram incluídos: 96 pacientes de 52 famílias e também 14 casos esporádicos. Resultou que 81% de todos os casos (ou 92% das famílias com herança dominante) apresentavam a mutação MJD1; que 3% dos pacientes (ou 2% das famílias) apresentavam a mutação SCA7; que 1% dos pacientes apresentavam a mutação SCA8; e que 15% dos casos (ou 6% das famílias) não tiveram um diagnóstico molecular. Os achados clínicos e moleculares foram semelhantes àqueles já descritos na literatura, mas revelaram (1) que uma paciente portadora da mutação SCA7 apresentava retração palpebral, um sinal habitualmente associado à doença de Machado-Joseph; e (2) um caso esporádico de SCA8, achado esse provavelmente explicável pela existência de pré-mutações na sequência repetitiva CTG. Com esses resultados, a frequência estimada da doença de Machado-Joseph, na nossa região, foi de 1,8 / 100.000, e a das outras SCAs, de 0,2 / 100.000 habitantes.

Palavras-chave: doença de Machado-Joseph ; doenças devidas às poliglutaminas; SCA 7; SCA 8; ataxias espinocerebelares.

2. Introdução

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (SCAs) constituem um grupo de doenças neurodegenerativas muito debilitantes, com grande heterogeneidade clínica e genética, e caracterizadas por uma incoordenação generalizada da marcha, dos membros e da fala (Harding, 1993; Rosenberg, 1995). Na maioria dos pacientes, uma deterioração extracerebelar também acontece, incluindo as oftalmoparesias nucleares e supranucleares, sacadas lentas, achados piramidais e extrapiramidais, neuropatia periférica e redução da sensibilidade vibratória. O início do quadro dá-se, em geral, entre os 30 e os 40 anos, sendo a sua progressão bastante lenta. Nas sucessivas gerações, observa-se que a doença se inicia mais precocemente e que a sua progressão se torna mais rápida, fenômeno conhecido como “antecipação” (Rosenberg, 1995).

Doze *loci* diferentes, relacionados às SCAs, foram identificados até o presente: SCA1 no cromossomo 6p (Yakura et al, 1974; Orr et al, 1993), SCA2 no 12q (Gispert et al, 1993; Imbert et al, 1996), MJD1 (de *Machado-Joseph disease*) no 14q (Takiyama et al, 1993; Stevanin et al, 1994; Kawaguchi et al, 1994), DRPLA no 12p (Koide et al, 1994), SCA4 no 16q (Gardner et al, 1994), SCA5 no 11cen (Ranum et al, 1994a), SCA6 no 19p (Zuchenko et al, 1997), SCA7 no 3p (Gouw et al, 1995), SCA8 no 13q (Koob et al, 1999), SCA10 no 22q (Zu et al, 1999), SCA11 no 15q (Worth et al, 1999) e SCA12 no.5q (Holmes et al, 1999). As mutações SCA1, SCA2, MJD1, SCA6, SCA7 e a DRPLA caracterizam-se por serem repetições CAG expandidas traduzidas em tratos de poliglutaminas, enquanto a SCA8 está associada a uma expansão CTG em uma região não codificadora do gene. Ambas as expansões CAG e

CTG são mutações dinâmicas, sendo que o fenômeno da antecipação foi observado na maioria das diferentes SCAs (Orr et al, 1993; Chung et al, 1993; Kawaguchi et al, 1994; Ranum et al, 1994b, 1995; Maruyama et al, 1995; Maciel et al, 1995). Enquanto se supõe que os tratos de poliglutaminas produzam um ganho de função “tóxica” para a célula, não existe ainda uma boa hipótese para se explicar como uma expansão CTG fora da região codificadora do gene produziria a doença (Koob et al, 1999; Silveira et al, 2000).

A disponibilidade de uma testagem direta dos genes envolvidos permitiu a determinação das frequências de diversas SCAs em diferentes populações. Na maioria delas, e especialmente nas de ascendência portuguesa, a mutação MJD1 é a mais freqüente (Silveira et al, 1998; Silveira et al, 1996).

Os objetivos da presente investigação foram: (1) verificar a freqüência da SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6, SCA7 e SCA8 em uma série de casos de pacientes com SCAs, provenientes do sul do Brasil e (2) comparar suas características clínicas e moleculares com as de pacientes previamente descritos.

3. Material e métodos

Cento e dez pacientes foram incluídos nesse estudo: 96 deles pertenciam a 52 famílias, enquanto os outros 14 eram casos esporádicos, sem história familiar. Todos eles tinham uma origem geográfica comum: o Rio Grande do Sul, o mais meridional dos Estados brasileiros, localizado no paralelo 30, onde aproximadamente 10 milhões de pessoas vivem. Quarenta e quatro famílias, além de cinco casos esporádicos, eram de ascendência portuguesa; cinco famílias e um caso isolado eram afro-brasileiros; duas famílias e um paciente isolado eram de origem alemã; e uma família, além de 7 casos isolados, eram de origem italiana.

O diagnóstico clínico de uma SCA foi determinado pela história clínica e pelo exame físico dos casos índice. O critério de inclusão foi a presença de uma ataxia cerebelar progressiva da idade adulta associada com um dos seguintes achados: oftalmoparesia, atrofia óptica, sinais piramidais, sinais de neurônio motor inferior, redução das sensibilidade vibratória, tátil e/ou algésica, demência e sinais extrapiramidais. Os pacientes com uma história de herança autossômica dominante foram chamados de casos familiares; os pacientes sem essa história eram classificados como esporádicos – depois de se excluírem outros diagnósticos genéticos.

Os dados das histórias clínicas, dos heredogramas, dos exames neurológicos e das análises moleculares foram arquivados nos bancos de dados Microsoft Excel® e SPSS for Windows®.

Com o consentimento informado dos pacientes envolvidos, colheu-se uma amostra de sangue periférico de cada um deles, da qual se isolou o DNA nuclear através de técnicas *standard* (Sambrook et al., 1989).

Realizou-se então a análise molecular das seqüências repetitivas de interesse, através da amplificação por PCR, usando-se seqüências de inicialização já publicadas (Orr et al., 1993; Li et al., 1993; Kawaguchi et al., 1994; Pulst et al., 1996; Zhuchenko et al., 1997; Koob et al., 1999). A PCR foi realizada com 1 μ M de cada *primer*; 200 μ M dos dNTPs; 1,0 mM de MgCl₂; 10 mM de Tris, pH 9.0; 50 mM de KCl; 1 U da *Taq* polimerase, e 2% de formamido, chegando-se a um volume final de 25 μ l. As amostras foram processadas segundo técnicas previamente descritas (Silveira et al., 1996; Pulst et al. 1996; Zhuchenko et al., 1997; Silveira et al., 2000). Os produtos das PCR foram analisados em géis de poliacrilamida a 6%. Os tamanhos dos alelos foram determinados comparando-se as migrações obtidas com uma seqüência M13. No gene SCA8, o ensaio da PCR determinou o tamanho combinado das duas seqüências repetitivas CTA e CTG.

4. Resultados

Quarenta e oito das 52 famílias em estudo apresentaram expansões no *locus* MJD1, enquanto 1 das 52 famílias apresentou a expansão no *locus* SCA7. Entre os 14 casos esporádicos, um deles apresentou uma expansão no *locus* SCA8. Portanto, no presente estudo, 81% do total dos casos (e 92% das famílias com herança dominante) apresentavam a mutação MJD1, 3% (e 2% das famílias) apresentavam a mutação SCA7, 1% apresentavam a mutação SCA8 e 15% (6% das famílias) permaneceram sem diagnóstico molecular (Tabela 1).

Nas famílias com a doença de Machado-Joseph (DMJ), havia 178 pessoas afetadas vivas, segundo o relato dos propósitos. Excluindo-se os casos portadores de DMJ, havia ainda ao menos 21 pessoas vivas com outras SCAs (com ou sem história familiar), na nossa região. Esses números correspondem a uma frequência de indivíduos afetados pela DMJ, nessa região, de 1,8 / 100.000, e, de pessoas afetadas por outras SCAs, de 0,2 / 100.000 (Tabela 1).

4.1 Casos com DMJ

A DMJ correspondeu à maioria dos diagnósticos realizados na presente série de casos. Os seus aspectos clínicos e genéticos serão apresentados em detalhe, em outra publicação (Jardim et al, 2000).

Oitenta e nove pacientes, pertencentes a 48 famílias, apresentaram uma expansão

CAG no *locus* MJD1. Os seus alelos normais MJD1 continham entre 14 e 38 repetições, o mais freqüente sendo o alelo com 24 repetições. Os cromossomos afetados continham expansões que variaram entre 69 e 85 repetições, o mais freqüente sendo o alelo com 73 repetições.

4.2 A família SCA7

Uma família negra apresentou alelos expandidos no *locus* SCA7. Três de seus afetados foram examinados. O caso índice, denominado de paciente J, era uma mulher de 44 anos cuja doença se iniciara aos 35 anos, com uma ataxia de marcha e disartria. O seu exame neurológico demonstrou a presença de: disartria pseudobulbar; ataxia axial e apendicular, sendo a paciente ainda capaz de caminhar sem auxílio; espasticidade leve e difusa, com hiperreflexia, respostas plantares flexoras e força preservada; redução da sensibilidade vibratória para 7 segundos nos seus maléolos tibiais; paresia facial periférica à direita; atrofia óptica bilateral, reflexos fotomotores lentos, e limitação do olhar vertical e da convergência. É importante salientar que essa paciente apresentava uma marcada retração palpebral.

Seu irmão, o paciente M, era um homem de 47 anos, atáxico desde os 44 anos. Os seus achados neurológicos eram mais leves, e incluíam disartria leve; ataxia de membros e de marcha, com independência de movimentos preservada; posturas distônicas nos membros superiores, ao mantê-los estendidos; hiperreflexia difusa, com respostas plantares flexoras; redução da sensibilidade vibratória para 5 segundos nos seus primeiros artelhos; leve paresia da convergência, com pálpebras e fundoscopia normais.

O paciente R era o filho de 24 anos do paciente M. A sua doença começou com uma ataxia de marcha e perda visual súbita aos 17 anos. Ao ser examinado aos 24 anos, ele ainda era capaz de ler letras grandes, como títulos de jornal. O seu exame neurológico revelou a presença de disartria; marcha atáxica, sendo ele ainda capaz de caminhar sem apoio; ataxia apendicular; espasticidade leve difusa, com hiperreflexia, respostas plantares flexoras e força preservada; musculatura hipertrófica; sensibilidade vibratória limítrofe; atrofia óptica bilateral com manchas hipopigmentares na retina; e ausência de oftalmoparesias, nistagmo ou retração palpebral. Os seus potenciais evocados visuais também revelaram um bloqueio da condução bilateral, axonal e mielínica, nos seus tratos ópticos.

Nenhum deles apresentou demência, amiotrofia, movimentos involuntários anormais ou anormalidades dos movimentos oculares sacádicos e de acompanhamento.

Os comprimentos das seqüências CAG normais variaram de 12 a 15 repetições, em uma população controle de 83 pacientes atáxicos sem diagnóstico definido, estudados em um de nossos laboratórios (Porto). Os resultados positivos encontrados nessa família foram os seguintes: a paciente J tinha um alelo com 12 e outro com 42 repetições; o paciente M, um alelo com 12 e outro com 44 repetições; e o paciente R, um alelo com 12 e outro com 53 repetições.

4.3 O caso com SCA8

Uma mulher de 41 anos, com história familiar negativa, revelou-se ser portadora de

uma expansão CTG no *locus* SCA8; os seus achados moleculares já foram relatados (Silveira et al, 2000). O seu quadro se iniciou aos 31 anos com uma disartria, a qual se seguiu uma ataxia de marcha. O seu exame neurológico demonstrou a presença de ambos esses sinais, e também: ataxia apendicular leve; uma redução da sensibilidade vibratória em seus artelhos; movimentos oculares atáxicos, no acompanhamento, e nistagmo ao olhar extremo lateral. Não havia achados piramidais, extrapiramidais ou de neurônio motor inferior, e tanto sua fundoscopia como suas funções mentais superiores eram normais.

O comprimento das repetições CTG no gene SCA8 variou entre 15 e 91 repetições, em 909 indivíduos estudados por nós (Silveira et al, 2000). Por outro lado, os estudos moleculares realizados nessa paciente revelaram a presença de um alelo com 23 e de outro com 104 repetições.

5. Discussão

Uma série de estudos estimaram a frequência relativa das diversas SCAs entre pacientes de Portugal, dos Estados Unidos, da Alemanha, da Grã-Bretanha e de origens geográficas mistas (Ranum et al, 1995; Silveira et al, 1998; Silveira et al, 1996; Schöls et al, 1995; Leggo et al, 1997). Em todas as populações exceto a britânica, a DMJ é a ataxia autossômica dominante mais frequente, sendo responsável, por exemplo, por 17% dos casos de origem não-portuguesa estudados em Montreal (Silveira et al, 1996), por 50% das famílias alemãs (Schöls et al, 1995), por 74% das famílias de Portugal continental e por 89% das famílias açorianas (Silveira et al, 1996).

Os primeiros relatos de famílias brasileiras com o diagnóstico clínico de DMJ foram apresentados em 1984 and 1988 (Lisboa and Mariotto, 1984; Radvany et al, 1988). Dois estudos subseqüentes, baseados em achados moleculares, deram estimativas das frequências relativas de algumas SCAs entre respectivamente 54 e 19 famílias brasileiras de diversas origens geográficas (Lopes-Cendes et al, 1997; Iughetti et al, 1998). Nesses estudos, a mutação *MJD1* foi responsável por 44 e 68% dos diagnósticos entre os casos familiares. Assim, o presente estudo revela a proporção mais alta de diagnósticos de DMJ entre brasileiros, ou seja, 92% das 52 famílias estudadas, uma proporção semelhante à encontrada nos Açores (Sequeiros, 1989). Esse achado poderia ser explicado por nossa origem étnica, uma vez que a ocupação portuguesa do território sul do Brasil – ou seja, de onde nossos casos se originaram – iniciou-se no século XVI mas se tornou realmente importante com o assentamento de colonos açorianos, ao redor de 1752 (Cesar, 1970). Até hoje, os principais

componentes étnicos da nossa população são o português, o açoriano e o espanhol, seguidos de perto pelo africano (introduzido do século XVII em diante), pelo alemão (século XIX) e pelo italiano (século XIX).

Os dados sobre a prevalência das SCAs, em geral, são bastante escassos. É de se esperar que eles variem bastante, de acordo com a população estudada e com as suas frequências gênicas, mas também com o método de seleção de casos. Por exemplo, a prevalência das SCAs em geral, no norte da Itália, foi calculada como sendo de 1 / 100.000 (Leone et al, 1995). Por outro lado, conhece-se um pouco mais sobre a prevalência especificamente da DMJ em populações de origem portuguesa e açoriana. A prevalência tanto da DMJ como das SCAs em geral pode ser calculada a partir do número de pacientes vivos nos heredogramas obtidos dos propósitos e de sua história familiar (Sequeiros and Coutinho, 1993). Nós seguimos esse método simples, no presente estudo. As prevalências da DMJ entre as populações portuguesas das áreas mais endêmicas - Açores, Massachusetts, Rhode Island e California – são muito semelhantes umas às outras, girando ao redor de 25 / 100.000. Essa prevalência cai para 1 / 100.000 quando a população estudada é a de Portugal continental (Sequeiros, 1989).

No presente estudo, calculou-se a frequência da DMJ, no sul do Brasil, como sendo 1,8 / 100.000, achado que pode estar refletindo um efeito fundador de origem açoriana. A frequência das outras SCAs foi, ao contrário, muito pequena, ou de 0,2 / 100.000, número esse constituído de 3 pacientes com SCA7, uma paciente com SCA8 e 17 pacientes (4 com e 13 sem história familiar) sem diagnóstico, nos quais foram excluídas as mutações SCA2, MJD, SCA6, DRPLA, SCA7 e SCA8. Como é

improvável que tenhamos detectado todas as famílias e doentes afetados da nossa população, esses números possivelmente subestimam a frequência real dessas doenças.

Os comprimentos das seqüências repetitivas CAG encontrados nos presentes pacientes com DMJ estão de acordo com o encontrado na literatura (Maciel et al, 1995; Lopes-Cendes et al, 1997). Outras características moleculares, bem como os achados clínicos, serão discutidos em outro lugar (Jardim et al, 2000).

A SCA7, anteriormente denominada ADCA II (Harding, 1984), é uma SCA diversa das demais, por afetar a retina. Seu gene, localizado no braço curto do cromossomo 3 (Gouw et al, 1995; Benomar et al, 1995), contém uma repetição CAG que está expandida nos indivíduos afetados (David et al, 1997). Nos alelos mutantes, o tamanho da seqüência repetitiva CAG é bastante variável, ficando entre 38 e 130 repetições, enquanto nos alelos normais, ele fica entre 7 e 17 repetições (David et al, 1997).

Os seguintes achados clínicos foram os mais freqüentemente encontrados entre os afetados pela SCA7 (David et al, 1998): ataxia axial (100%), ataxia apendicular (98%), disartria (98%), redução da acuidade visual (85%), movimentos oculares lentos (88%), hiperreflexia (78%), redução da sensibilidade vibratória (62%), oftalmoplegia (53%), respostas plantares extensoras (52%), espasticidade de membros inferiores (41%) e miocimias faciais (16%).

Os pacientes aqui apresentados tinham características clínicas, neurológicas e

moleculares, todas comparáveis com aquelas encontradas na literatura (David et al, 1997; David et al, 1998; Benomar et al, 1994). Até onde sabemos, eles devem ser a segunda família brasileira relatada com essa condição (Stevanin et al, 1998).

A SCA7 tem a particularidade de afetar a retina, e portanto pode-se suspeitar dela a partir dos achados clínicos de seus doentes – se alguma perda visual estiver presente. Porém, o caso índice aqui relatado era uma mulher sem redução da acuidade visual (embora com atrofia óptica), mas com retração palpebral, um sinal característico da DMJ. Esse achado reforça a impressão de que a avaliação clínica, a partir de casos individuais, pode errar se ela pretender especificar mais do que o quadro geral de uma SCA (Harding, 1993; Rosenberg, 1995; Lopes-Cendes et al, 1996).

Um novo gene relacionado às ataxias dominantes, denominado SCA8, foi localizado no cromossomo 13q em 1999 (Koob et al, 1999). Sua mutação consistia de uma expansão de uma seqüência mixta (CTA)_n (CTG)_n em uma região não codificadora, presente na região 3' do exon terminal de um gene de função desconhecida. Essa expansão foi associada com uma doença que começa aos 39 anos, em média, e cujos achados clínicos incluem: disartria espástica e atáxica, nistagmo, ataxia axial e apendicular, espasticidade e redução da sensibilidade vibratória. O tamanho dos alelos expandidos variou de 110 a 130 repetições combinadas CTA-CTG (107-127 repetições CTG, sozinhas), enquanto mais de 99% da população controle estudada (ou 1.200 cromossomos) apresentou um seqüência entre 16 e 37 repetições CTA-CTG. Nas primeiras famílias descritas, 20 indivíduos assintomáticos, da mesma idade dos afetados, tinham também alelos bastante longos (mas mais curtos do que os dos doentes), entre 74 e 94 repetições. Das oito famílias inicialmente identificadas, 2

apresentavam irmãos afetados com pais sadios e em uma delas, o doente não tinha qualquer outro familiar igualmente afetado (era esporádico). Com esses achados, sugeriu-se que o gene expandido da SCA8 teria uma penetrância incompleta, dependente tanto da idade como do tamanho da expansão. Isso explicaria por que os indivíduos afetados nem sempre teriam uma história familiar claramente autossômica dominante (Koob et al, 1999).

A paciente esporádica que aqui relatamos apresentava manifestações neurológicas e moleculares semelhantes às de outros pacientes descritos (Koob et al, 1999). A falta de uma história familiar, no seu caso, pode ser explicada pela hipótese acima mencionada, que prevê a existência de uma faixa de expansão CTG pré-mutacional, entre 40 e 91 repetições, na qual a seqüência repetitiva seria particularmente instável (Koob et al, 1999, Silveira et al, 2000).

A associação de expansões CTG no *locus* SCA8 com a determinação da doença foi colocada em dúvida, recentemente, por autores que identificaram expansões SCA8 em controles normais e em pacientes com outras doenças neurológicas (Stevanin et al, 2000; Worth et al, 2000). Portanto, a confirmação de que as expansões SCA8 sejam causadoras de doença deve aguardar mais esclarecimentos sobre o seu mecanismo patogênico.

Em síntese, nossos achados indicam que a DMJ é a mais freqüente SCA encontrada no sul do Brasil, correspondendo a 81% dos pacientes examinados e a uma prevalência de 1,8 / 100.000 habitantes, nessa região. Os achados clínicos e moleculares de seus afetados são semelhantes aos da literatura. Outras formas de

SCA, na nossa região, são bastante raras, tendo sido encontradas uma família com SCA7 e uma doente isolada com SCA8. Por fim, a presença de retração palpebral em um dos pacientes com SCA7 aponta novamente para a importância do diagnóstico molecular como sendo o definitivo para essas condições.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem às Dras. Ana C. S. Puga e Leticia R. Mello, por ajudarem na organização do material clínico.

Parte desse trabalho foi realizado com o auxílio da FAPERGS.

Tabela 1 – Diagnósticos realizados na presente amostra de doentes

	Doença de Machado-Joseph	SCA 7	SCA 8	Sem diagnóstico	Totais
Número de casos familiares (ou número de famílias)	89 (48)	3 (1)	-	4 (3)	96 (52)
Número de indivíduos afetados com história familiar	178	3 ^a	-	4 ^b	
Casos isolados	-	-	1 ^c	13 ^d	14
Frequência relativa de pacientes, na presente amostra	81%	2%	1%	15%	
Frequência relativa de famílias, na presente amostra	92%	2%	-	6%	
Prevalência estimada	1,8 / 100.000	0,2 / 100.000 (a + b + c + d / população)			

6.3 Artigo 2

Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil.

Running head: Machado-Joseph disease in South Brazil

Laura B. Jardim ^{1,2}, Maria Luiza Pereira ^{1,3}, Isabel Silveira ⁵, Anabela Ferro ⁵, Jorge Sequeiros ⁵ and Roberto Giugliani ^{1,4}.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departments of ² Internal Medicine, ³ Biochemistry and ⁴ Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and ⁵ UniGENe, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.

Address correspondence to Laura B. Jardim

Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, Brazil

Phone + 55 51 316 8011, Fax + 55 51 316 8010 e-mail laurajardim@terra.com.br

1. Abstract

Machado-Joseph disease (MJD) is one of the most frequent forms of spinocerebellar ataxia, caused by an expanded CAG tract in the coding sequence of the gene, which is located on chromosome 14q32.1. We have analysed 62 individuals from 35 families from the Southern part of Brazil, and found that these patients had an earlier age of onset, on average, than European cases (mainly of Portuguese and Azorean origin). Their survival, proportion of types, average anticipation, proportion of affected versus non-affected siblings, neurological signs and molecular findings are similar to those observed in patients previously described in Portugal, Japan and United States . The disease duration of the present cases was quite long, allowing a probably correct type classification. MJD type 1 patients with male transmission showed the worst anticipations, in the present series. Patients with type 1 had also larger CAG expansions than other patients. We emphasise that there was no explanation to the development of types 2 or 3, since both are similar when considering age of onset, disease duration and length of CAG repeats.

Key Words

Machado-Joseph disease; Polyglutamine diseases; Spinocerebellar ataxias

2. Introduction

Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant multisystem degeneration manifested as a form of spinocerebellar ataxia. MJD was first reported in North American families of Portuguese-Azorean ancestry (1, 2, 3). Besides being the main SCA diagnosed among Portuguese descendants, MJD has also been reported in Japan, China, India, Australia, France, and Germany, being considered the most frequent dominant ataxia (4). In Portuguese patients the mean age of onset is 40.5 years and the mean survival is 15.6 years (4). In Brazilian patients the mean age of onset was reported as 34 years (5).

Clinically, MJD is characterized by a progressive cerebellar ataxia with associated features, including progressive ophthalmoplegia, pyramidal signs, dystonic posturing, distal muscular atrophies, eyelid retraction, faciolingual fasciculations, and no mental involvement. The different clinical expressions of MJD resulted in its classification into 3 clinical types: type 1 shows an early onset and a rapid course, and patients have marked pyramidal and extrapyramidal signs besides ataxia and ophthalmoplegia; type 2, the most common subtype, starts in the fourth decade of life and is limited to cerebellar ataxia and ophthalmoplegia, with or without pyramidal signs, and peripheral and extrapyramidal signs being mild or absent; and type 3 shows the latest onset, with a clinical picture that adds peripheral signs to those found in type 2 (4, 6).

The MJD1 *locus* was mapped to chromosome 14q (7). The gene was identified and contains a CAG repeat in the 5' region of the coding sequence, which is expanded in

MJD patients (8). Normal alleles show between 12 and 40 CAG repeats, whereas mutant alleles show between 61 and 84 repeats (9). The disease often shows unstable CAG transmission between generations, a significant onset anticipation, and a strong inverse correlation between length of repeat and age of onset. Among the clinical types, type 1 is associated with larger repeats (9, 10).

The purpose of the present study was to examine the clinical, genetic, and molecular characteristics of a group of MJD patients recently identified in the southernmost state of Brazil, and compare these data with studies from the literature.

3. Subjects and Methods

3.1 Subjects

Sixty-two MJD patients from 35 families were identified in a previous survey (11). Patients included in the present study were submitted to clinical interview, neurological examination and molecular investigation. Fifty-four of them had a CAG expansion detected at MJD1 *locus*.

To study some variables, like age of onset within different generations and the effect of gender of affected parent, we added information from 93 well-documented affected relatives, to whom we did not have direct access, totalising 155 cases - 76 men and 79 women.

3.2 Methods

All patients were interviewed and examined by the same physician (LBJ). A standardized procedure included age of onset determination, disease duration, first sign of onset and a thorough neurological examination. Onset was considered as being the time when the patient or a close relative was able to date the appearance of the first symptom.

The MJD1 polymorphic expanded regions were analysed according to conditions previously described (12).

Statistical analyses of data on clinical histories, heredograms, neurologic examination and molecular results, were performed using SPSS for Windows.

Differences in ages at onset between sexes and between parent-and-sib, as well as sex proportions, disease duration and repeat number of CAGs in the MJD allele among the three clinical types, were assessed by analysis of variance or by chi-square test, according to the type of variables under study. When there were only two independent groups to be compared and the variable was continuous, differences were assessed by t test . When the standard deviations differed too much, the nonparametric Mann-Whitney U test was used. Correlations between two quantitative traits, like ages at onset and number of CAG repeats, were assessed by Pearson's correlation test.

4. Results

4.1 Ages at onset, types, disease duration, survival, effects of gender of affected parent, anticipation and proportion of affected versus non-affected sibs

The identified MJD patients belonged to 31 families of Portuguese ancestry, to 3 Afro-Brazilian families, and to 1 family of German ancestry.

The average age of onset was calculated as 32.1 years (sd = 11.9), and was similar among men (31.4) and women (32.8) (t test ns), ranging from 8 to 56 years.

Among the deceased cases with well-documented data (10 men and 10 women), the mean survival was of 17 years (range = 5 to 30 years; sd = 7) and did not differ among sexes.

The 62 examined patients were classified based only on neurological criteria, irrespective of their ages at onset. Patients with severe pyramidal and extrapyramidal findings were classified as MJD type 1. Individuals with significant lower motor neuron findings – amyotrophy or fasciculations - and / or sensitive loss on lower extremities – patients unable to discriminate between tactile and algescic stimulations, or with a vibration sense smaller than 11 seconds on their first toes - , were classified as type 3. Patients with none of the above mentioned findings in a severe form were classified as type 2.

Among the 62 examined patients, we found 8 with MJD type 1 (13%), 26 with MJD type 2 (42%), and 21 with MJD type 3 (34%). We were unable to classify 7 cases

(11%), because patients presented simultaneously with severe extrapyramidal and peripheral findings, and for this reason we referred to them as “unclassified”.

A significant difference was observed between the average ages at onset of type 1 patients and the other two subtypes ($p < 0.0001$, ANOVA). The mean age of onset was 15.2 years-old (sd = 2.15 years) in type 1 patients, 33 years-old (sd = 11.3 years) in type 2 patients and 37 years-old (sd = 7.4 years) in type 3 patients. “Unclassified” patients showed a mean age of onset of 26.8 years (sd = 10.5).

Since it has been stated that all patients are type 2 at the time of onset of MJD, and that only after 4 to 5 years the real type is finally established (4), we looked at differences in the duration of the disease among our patients. The mean duration of the disease in the total sample was of 9.8 years (sd = 6), and did not differ between men and women: it was of 10.8 years (sd = 6.9) for men, and 9.9 years (sd = 6.6) for women. Among the types, there were statistically significant differences between type 1 and type 3 ($p < 0.05$, ANOVA) and between type 1 and “unclassified” cases ($p < 0.02$) (Figure 1). The mean duration of types 2 and 3 did not differ significantly in any comparison, but especially when one is compared to another (Figure 1).

Among patients classified as type 2, there were 4 cases with an early onset of the disease – 13, 19, 20 and 22 years of age. Their disease durations were of 6, 23, 15 and 4 years, respectively. At least in two cases with long disease duration, it seems unlikely that their phenotype would change to type 1 with time.

The effect of gender of affected parent on phenotype of the affected child was

evaluated, comparing ages at onset and clinical types in their respective sons and daughters. The phenomenon of anticipation was also examined.

The mean ages at onset, according to sex of the proband and of the affected parent, are shown in Table 1. No significant differences were found, although a tendency to an earlier onset could be seen among men with male transmission (29.9 years), when compared with women with female transmission (33.7 years).

The distribution of clinical types according to the gender of affected parent was also homogeneous, fathers and mothers with the same proportion of children with types 1, 2 and 3 (chi-square ns).

In order to study anticipation, we followed 60 pairs of affected parent-child with well-documented ages at onset. In the majority of cases, there were important anticipations. The mean difference between age of onset of parent and child was of 7.7 years (sd = 8.3), in the total sample (Figure 2). The standard deviation was larger than the mean value, because there were some instances where the parent's disease started at a more precocious age than the child's disease. When looking for differences due to the gender of affected parents and/or of affected children, we found no significant differences, although there was a tendency to relate the smaller anticipations to mother-son pairs (mean of 4.8 years) and the larger anticipations to father-son pairs (mean of 9.6 years) (Table 1).

When anticipation was compared among the three classical types, it was found that the results did not significantly differ (ANOVA) (Table 1), although there might exist

a tendency to correlate the worst anticipations with type 1 MJD.

We also looked for differences in anticipations, according to the gender of the affected parent and, simultaneously, to the type of the proband. Among patients with type 1 MJD, the anticipation was really worse if the affected parent was the father (16.2 years), than if the affected parent was the mother (2.6 years) ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U test) (Table 1).

Most of the 35 MJD pedigrees showed large sibships and comprised 4 or 5 adult generations. The variable age of onset of MJD turns doubtful to characterise an asymptomatic individual, from a pedigree collected in a medical interview, as a non-carrier of the mutation. However, it would be interesting to appreciate the proportions of affected versus non-affected sibs over 50 years of age – after excluding the index cases. It was found that 84 sibs were affected and 40 were not affected; or, on the other hand, that 68% of sibs over 50 years of age were affected, a result that is statistically different from expected ($p < 0.0001$, chi-square).

4.2 Neurological findings

Gait ataxia was the initial sign in all patients. The neurological signs found in the present series were shown in Table 2. Some findings deserve further comments. In 58/62 patients (93,5%), limb ataxia was noticed, but it was much less severe than the gait ataxia. Dysarthria was noticed in 53/62 patients (85, 5%): its nature was cerebellar, pyramidal or pseudobulbar, and in 3 cases it progressed to anarthria.

Pyramidal findings were present in 46/62 patients (74%), the majority of them being limited to hyperreflexia and Babinski sign, spasticity appearing in 11 cases and paresis in none of them. Fasciculations were found in 25/61 patients (41%), occurring more frequently in periocular and peribuccal regions during intentional movements, and less, in resting limbs. Although fasciculations were common, amyotrophy, the other sign of lower motor neuron disease, was surprisingly infrequent in this sample: only two patients showed it. The contrary was strikingly present: well delineated muscles with preserved strength and power were seen in 15 patients (24%).

4.3 Molecular findings

Figure 3 shows the frequencies of different CAG repeat lengths in normal and MJD1 chromosomes of 54 studied patients. The relationship between the trinucleotide repeat length in the MJD allele and age of onset of the disease is shown in figure 4. A correlation coefficient of -0.68 was obtained ($p < 0.001$, Pearson's correlation test), assuming a linear relationship between age of onset and repeat length for the MJD allele.

When repeat length of patients of different clinical types were compared, a significant difference was seen between type 1 and the other two classical types, with the expected tendency for increase severity with larger repeat sizes ($p < 0.0001$, ANOVA) (Figure 5).

5. Discussion

5.1 Clinical aspects of MJD

In the present study, the mean age of onset of MJD patients was 32.1 years, similar to those found by another study of Brazilian patients (5). Therefore, it is reasonable to say that onset in Brazilian patients is usually earlier than in Portuguese and Azorean patients (4) (Table 3), but is later than in Indian, Japanese and Black American patients (4).

Genetic background influences the age of onset in MJD. One of the best known is the difference among Azorean people of Flores island and São Miguel (4). MJD patients originated from Flores have an earlier average onset than those originated from São Miguel. However, these findings do not explain the earlier average onset found among the Brazilian patients analysed by this study. The majority of present cases could have Azorean Portuguese ancestry, dated mainly from the Azorean settlements in South America, *circa* 1750-55. In those years, around 7,000 Azorean people emigrated to South Brazil, 2,000 of them to our region, where they doubled the local population (14). Historical documents pointed that around 4% of the settlers originated from São Miguel island, and none from Flores (14).

Definitions of the three types usually include generic statements about age of onset (4, 6). In the present study, we chose to classify cases according only to their neurological picture, allowing to look to ages at onset as an outcome variable. As with the mean age of onset of the total group, the resulting ages of onset for the three

types are 7 to 10 years earlier than those found in the Portuguese and Azorean descents (Table 3). The differences in age of onset were statistically significant between type 1 and other types, but were not different between type 2 and 3. Although it has already been found by others (10), this similarity (or absence of statistical difference) between types 2 and 3 is usually overlooked or interpreted as the result of a small sample.

Disease duration was estimated among the clinical types, and statistic differences were found only between type 1 and type 3, and again between type 1 and “unclassified” cases. The mean disease duration of types 2 and 3 were comparable, and quite long. After several years of disease, some patients remained only with the main neurological findings of type 2, while others developed peripheral signs of type 3. These two outcomes, probably reflecting diverse selective vulnerability of neurons to MJD1 polyglutamin, are clearly not associate with disease duration nor with the CAG repeat length, and, we are tempted to say, not even with the time at onset.

Among 4 early onset cases classified as type 2, two men called more attention: in one, the disease started at 19 years of age and lasted 23 years until the present investigation; the other became sick when he was 20 years-old and had a disease duration of 15 years. Although rare, these cases illustrate that not every patient with an early onset of the disease will develop type 1 phenotype.

It was impossible to classify 7 of the 62 examined cases (11%), because they presented simultaneously with severe extrapyramidal and peripheral findings. The clinical picture was more severe than the average: for instance, two of them were

unable to articulate speech (anarthria). Their mean age of onset was 26.8 years, but in fact they had a bimodal distribution of ages at onset, 3 cases starting between 15 and 21 years-old, and 4 cases starting between 30 and 41 years-old. The “unclassified” patients of the present series had the longest disease duration (15 years), and one can speculate if their severe clinical picture would be attributed to their relative long survival.

The effect of gender of affected parent over the phenotype was evaluated in several ways. No statistical associations were found between sex of affected parent and age of onset, proportion of clinical types and anticipation. The same can be said when the combination of sexes of parent-child pairs was examined. There were only suggestions, or tendencies, (a) to relate an early age of onset and (b) bad anticipation to sons of affected fathers, and (c) to relate bad anticipations to type 1 patients rather to the other two types.

At first, it seems that genders and clinical types are not confounding variables, since there were as much types 1, 2 and 3 in female transmissions as there were in the male transmissions. If sex and clinical types were independent, their independent effects on anticipation could be added. It was found that, among type 1 patients, the anticipation in male transmission (16.2 years – 5 cases) was worse than in female transmission (2.6 years – 5 cases). Of course, these numbers showed that the affected mothers had early onset of their diseases and suggest that, probably, they were also of type 1, but we can not be sure of this, because these women were not examined. It has been suggested that, among juvenile onset of MJD, an excess of female transmission could happen (9). We were not able to prove that, since the present type 1 patients

with male transmission had ages at onset as early and juvenile as those with female transmission. In the present sample, it seems that a patient could have a type 1 evolution if his/her mother was already an early onset case, while male transmission somehow accelerated the appearance of this outcome in a given family.

Affirming that the proportion of affected versus non-affected sibs over 50 years of age was of 84 : 40 is risky, since some of the present non-affected could become symptomatic with time. Keeping in mind that it is an underestimation, even so it reaches a quite higher proportion than expected in an autosomal dominant disorder – 68% . This finding is not surprising in MJD, a disorder in which evidences of preferential transmission of expanded over normal alleles have been already reported (13, 15).

5.2 Molecular findings

The CAG length of expanded and normal alleles, found in the present cases, agreed with the range already described in literature (5, 9, 10).

The significant inverse correlation found between the trinucleotide repeat length in the MJD allele and age of onset of the disease (Figure 4) is also very similar (and sometimes equal) to other reports (9, 10). As expected, about 47% of the variability in age of onset can be explained by the length of the expanded allele. The observed relationship between type 1 and repeat expansion was also not surprising. However, this instability of the expanded CAG repeat provides only a partial explanation to the disease's great variability of clinical presentation, since there were patients with type

1 whose CAG repeat had the same length of several found among types 2 and 3 (Figure 5). Other factors – genetic, environmental or both – therefore influence the natural history of MJD. The three clinical outcomes, as well as age of onset, should be determined by the association of the CAG repeat length with other, unknown, modifier factors.

In summary, it was found that MJD patients originated in the southernmost state of Brazil have an earlier age of onset, on average, than Portuguese and Azorean cases, and that this finding could not be explained by their origin among the diverse Azorean Islands. Their survival, the proportion of types, the average anticipation, the proportion of affected versus non-affected siblings, neurological signs in general and molecular findings are similar to patients already described in Portugal, Japan and United States. The disease duration of the present cases were quite long, which permitted a probably correct classification into the three types. Type 1 MJD patients with male transmission showed quite bad anticipations, in the present series. Patients with type 1 had the larger CAG expansions, as expected. Even having so many expected results and some apparent lack of novelty, this paper emphasises that there was no explanation to the development of types 2 or 3, since both types were similar in age of onset, disease duration and CAG repeat length.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Ana C. S. Puga, Dr. Leticia R. Mello and Ms. Elisabete Weber, for helping in organising the clinical material. This work was supported in part by FAPERGS.

7. References

- 1 Nakano KK, Dawson DM and Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 1972; 22: 49.
- 2 Woods BT and Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear opthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 1972; 17: 149-166.
- 3 Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 1976; 26: 703-714.
- 4 Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds): "Hereditary Ataxias". *Adv Neurol*, 1993; vol. 61, pp. 139-153, Raven Press, New York, NY.
- 5 Lopes-Cendes I, Teive HGA, Cardoso F, Viana EM, Calcagnotto ME, Costa JC, Trevisol-Bittencourt PC, Maciel JA, Rosseau M, Santos A, Araújo AQC e Rouleau GA. Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz J of Genet* 1997; 20: 717-724.
- 6 Lima L and Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology* 1980; 30: 319-322.
- 7 Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993; 4: 300-3.
- 8 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221- 8.
- 9 Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.
- 10 Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura T, M, Saida Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A and Kawakami H. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestatin of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 807-812.

- 11 Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Moreira MC, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J and Giugliani R. A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 39 families with Machado-Joseph disease, SCA7 and SCA8. Submitted to publication, 2000.
- 12 Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A, Guimarães J, Loureiro L, Sequeiros J, Rouleau GA. Molecular genetic studies in spinocerebellar ataxias: analysis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in patients from 48 Portuguese ataxia families *Am J Med Genet (Neuropsychiat Genet)* 1998; 81:134-138.
- 13 Iughetti P, Otto PA, Zatz M and Passos-Bueno MR. Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet* 1998; 77: 246-248.
- 14 Piazza WF. *A epopéia açóricico-madeirense 1748-1756*. 1992. Florianópolis: Editora da UFSC.
- 15 Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, Onodera O, Oyake M, Takano H, Koide R, Tanaka H and Tsuji S. Non-mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 730-733.

8. Legends

Figure 1 – The disease duration among the clinical types, in this sample. The mean duration of the disease was 5.37 years (sd = 3.4) in type 1, of 8.4 years (sd = 5.7) in type 2, 11.6 years (sd = 5.8) in type 3 and 15 years (sd = 5.6) in “unclassified” cases. Types 2 and 3 did not differ significantly in any comparison, but especially when one is compared to another.

Figure 2 – Distribution of anticipation, according to the gender of the affected parent.

Figure 3 – Frequencies of different CAG repeat lengths in normal and MJD1 chromosomes. Normal chromosomes had alleles containing from 14 to 38 repeats, the most frequent being the allele with 24 repeats. The affected chromosomes had an expanded allele with 71 to 85 CAG repeats, the most frequent being the allele with 73 repeats.

Figure 4 – Correlation of CAG repeat length in the MJD chromosomes with age of onset. A squared linear correlation coefficient of $r^2 = 0.48$ was obtained.

Figure 5 – Distribution of CAG repeat sizes among the clinical types. Type 1 patients had large alleles - mean of 80 (sd = 3) CAGs, n = 8 - than type 2 and 3 patients – mean of 75.3 (sd = 2), n = 24, and 74.2 (sd = 1.6), n = 20, respectively (p<0.0001, ANOVA).

Figure 1

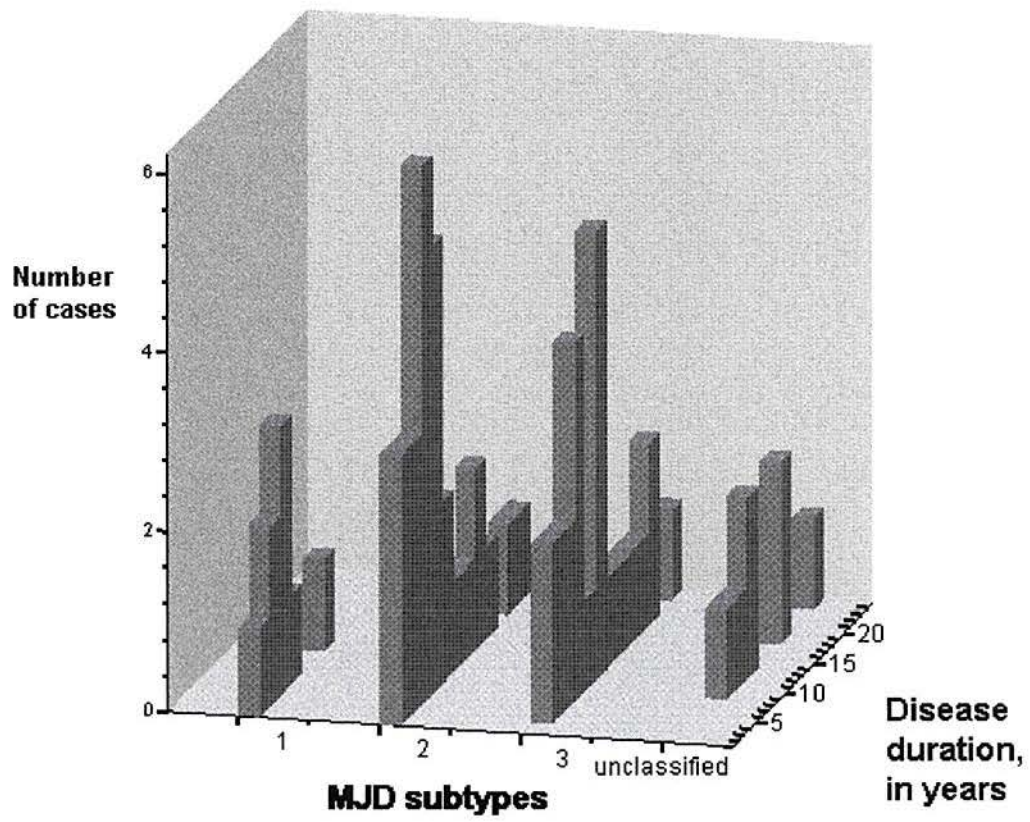


Figure 2

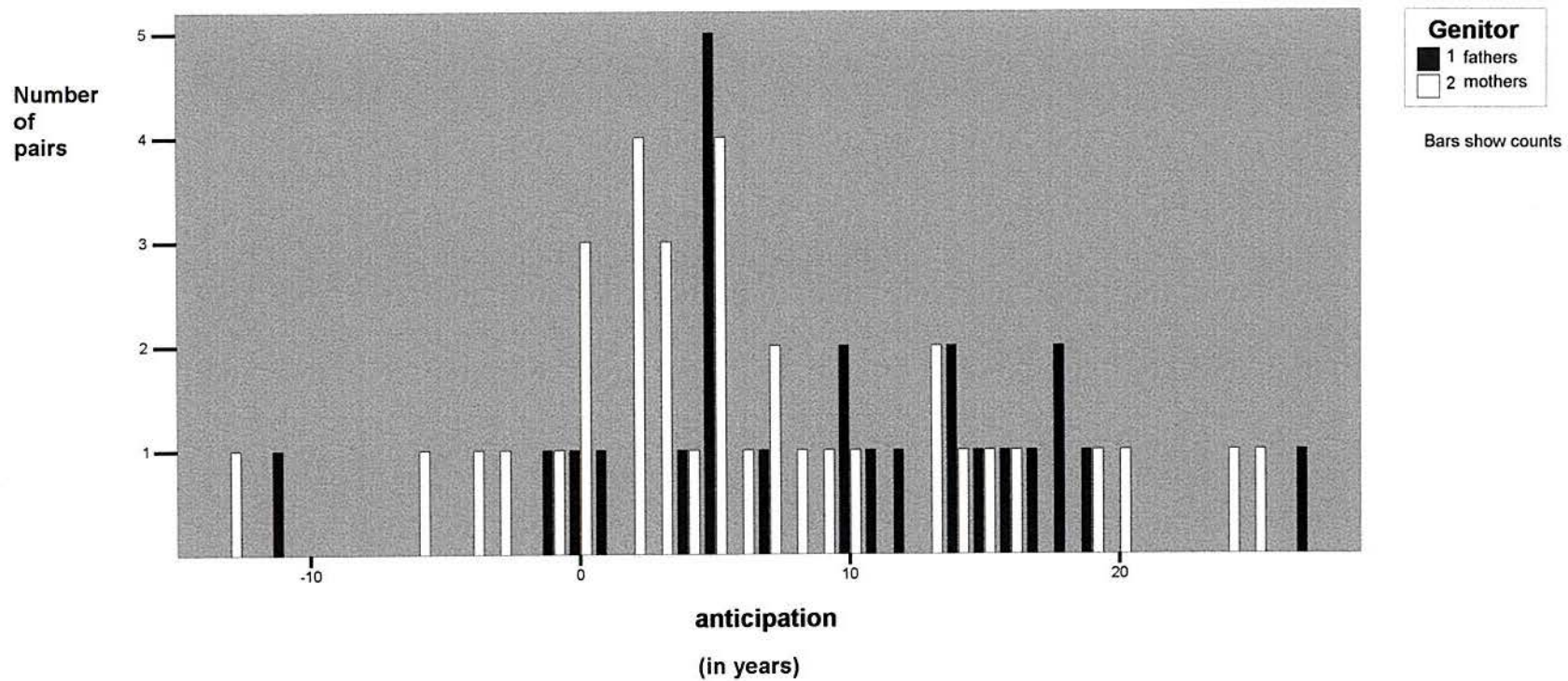


Figure 3

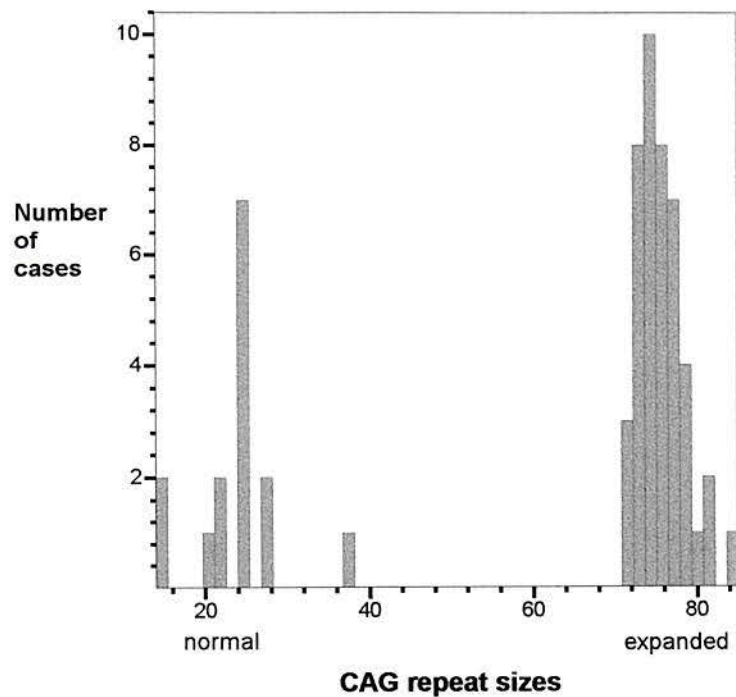


Figure 4

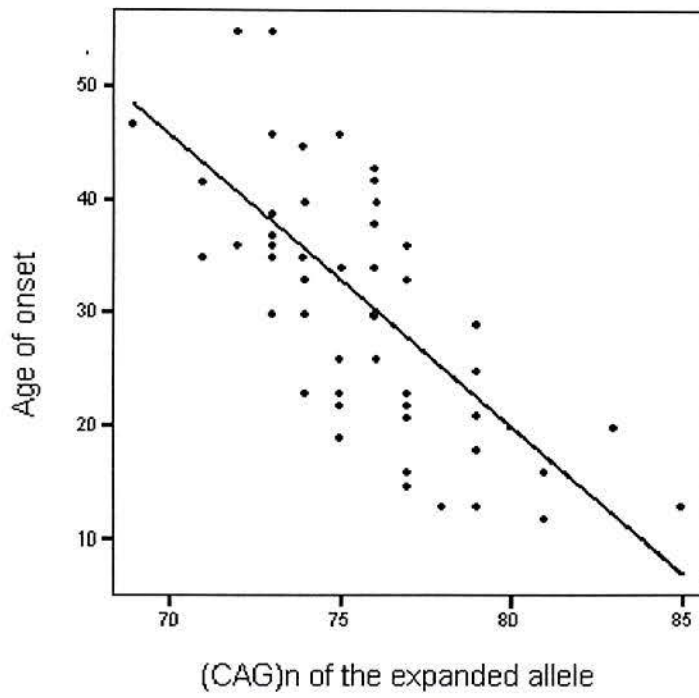


Figure 5

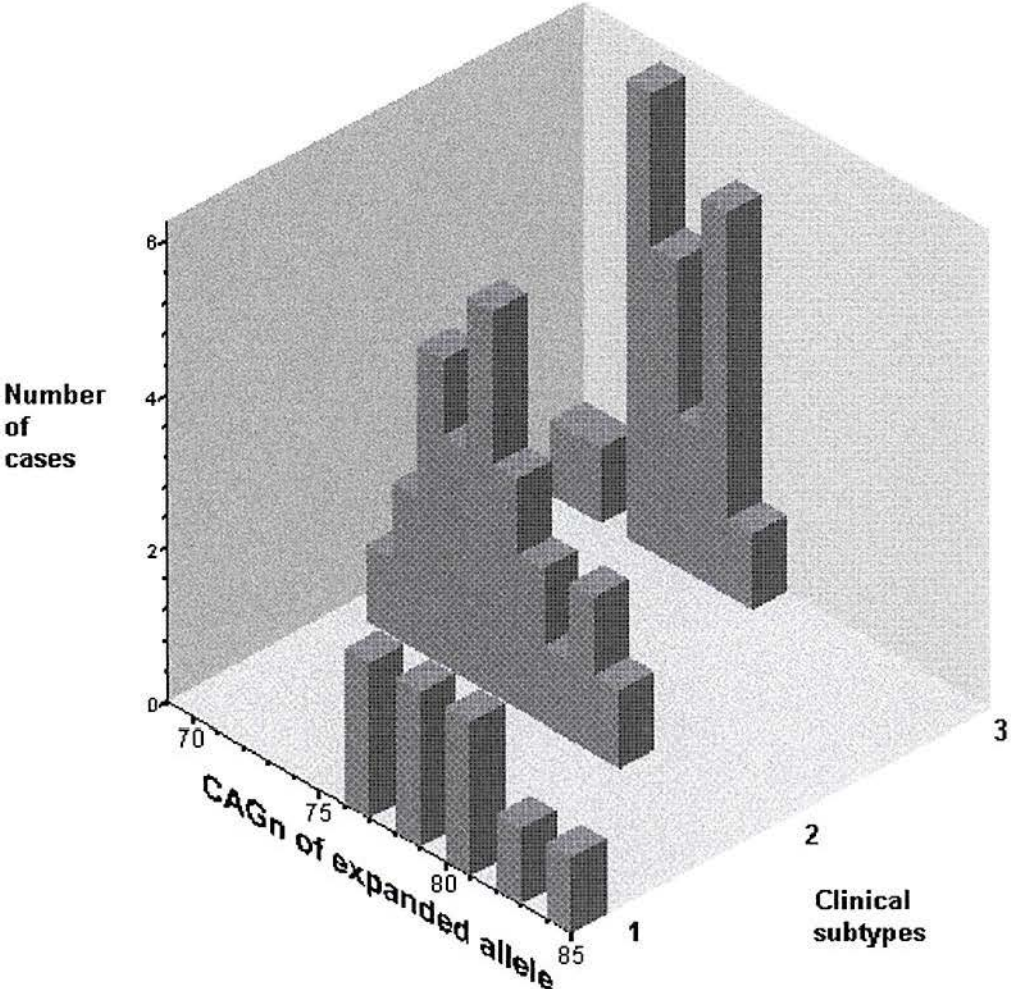


Table 1 – Age at onset and anticipation in MJD patients, according to gender, to affected parents and to clinical types.

		Mean (standard deviation) (years)	N	Significance
Age at onset	Age of onset in general	32.1 (11.9)	101	-
	Age of onset of patients with maternal transmission	32.9 (12.6)	60	Ns (t test)
	Age of onset of patients with paternal transmission	30.9 (10.9)	34	
	Age of onset of sons of affected mothers	31.8 (13)	26	Ns (Anova)
	Age of onset of daughters of affected mothers	33.7 (12.4)	34	
	Age of onset of sons of affected fathers	29.9 (7.8)	17	
	Age of onset of daughters of affected fathers	31.9 (13.5)	17	
	Anticipation (age of onset of the affected parent minus age of onset of the affected child)	Anticipation in general (Parent-child)	7.7 (8.3)	60
Parent-son		7.1 (6.4)	27	Ns (t test)
Parent-daughter		8.1 (9.7)	33	

Table 1 – (Continuation)

		Mean (standard deviation) (years)	N	Significance
Anticipation (age of onset of the affected parent minus age of onset of the affected child)	Father-child	9.4 (8)	24	Ns (t test)
	Mother-child	6.3 (8.3)	35	
	Father-son	9.6 (4.6)	11	Ns (Anova)
	Father-daughter	9.2 (10)	13	
	Mother-son	4.8 (6.7)	15	
	Mother-daughter	7.4 (9.3)	20	
	Among patients with type 1 MJD	9.4 (9.1)	8	Ns (Anova)
	Among patients with type 2 MJD	6.1 (8.1)	26	
	Among patients with type 3 MJD	6.1 (5.9)	21	
	Between father-child with MJD type 1	16.2 (7.6)	5	P < 0.0001 (Mann-Whitney U test)
	Between mother-child with MJD type 1	2.6 (3.5)	5	
	Between father-child with MJD type 2	- 2.3 (8)	3	Ns (Mann-Whitney U test)
	Between mother-child with MJD type 2	7.9 (7.1)	20	
	Between father-child with MJD type 3	7 (5)	10	Ns
	Between mother-child with MJD type 3	5.4 (6.7)	11	

Ns: not significant.

Table 2 – Neurological findings among MJD patients

Neurological finding	N	Relative frequency
Gait ataxia	62/62	100 %
Minimal (A)	3/62	4.8%
Moderate (B)	37/62	59.7%
Walking if helped (C)	14/62	22.6%
Wheelchair bound (D)	8/62	12.9%
Limb ataxia	58/62	93.5%
Nystagmus	57/62	92%
Dysarthria	53/62	85.5%
Pyramidal signs	46/62	74%
Sensitive loss	39/57	68.5%
Dysphagia	30/47	63.5%
Supranuclear ophtalmoplegia	26/61	52.5%
Nuclear ophtalmoplegia	6/61	
Fasciculations	25/61	41%
Eyelid retraction	17/62	27.4%
Dystonia	14/61	23%
Rigidity/bradykinesia	14/61	23%
Optic atrophy	13/57	22.8%

Table 3 – Comparison between the present Brazilian patients and Portuguese Azorean cases already described.

Finding	Portuguese and Azorean ancestry (Sequeiros and Coutinho, 1993) (4)	Brazilian patients from diverse geographic origins (Lopes-Cendes et al, 1997) (5)	Brazilian patients from Southern region (the present study)
Mean age of onset, in years (sd) (n)	39 (n=306)	34 (n=34)	32.1 (11.9) (n=101)
Mean age of onset of type 1 (sd) (n)	24.6 (18)		15.2 (2.1) (8)
Mean age of onset of type 2 (sd) (n)	40.3 (81)		33 (11.3) (25)
Mean age of onset of type 3 (sd) (n)	47.1 (45)		37 (7.4) (21)
Proportion of types 1, 2, 3, and “unclassified” cases, in %	1 - 12.7 2 - 57 3 - 30.3 “unclassified” – not mentioned		1 - 13 2 - 42 3 - 34 “unclassified” - 11

A doença de Machado-Joseph: caracterização clínica e molecular de novas famílias provenientes do sul do Brasil

(Versão em português do artigo:

“Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil”)

1. Resumo

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma das mais freqüentes ataxias espinocerebelares. Ela é causada por uma seqüência repetitiva CAG na região codificadora do gene, que está expandida nos doentes. Nós estudamos 62 doentes de 35 famílias provenientes do sul do Brasil e observamos que esses pacientes tiveram uma idade média de início relativamente mais precoce do que a dos casos europeus (principalmente os de origem portuguesa e açoriana). A sua sobrevivência, a proporção dos tipos, a média de antecipações, a proporção de irmãos afetados *versus* os não afetados, os sinais neurológicos e os achados moleculares são semelhantes aos de outros pacientes já descritos em Portugal, Japão e Estados Unidos. A duração média da doença dos pacientes estudados foi bastante longa, o que provavelmente permitiu a sua correta classificação. Os pacientes com DMJ tipo 1 e que sofreram transmissão paterna foram os que tiveram as mais graves antecipações. Os pacientes com o tipo 1 foram os que também tiveram as maiores expansões CAG. Nós enfatizamos que não foi encontrada uma explicação para o desenvolvimento dos tipos 2 ou 3, uma vez que os pacientes de ambos os tipos foram semelhantes quanto às suas idades de início médias, às suas durações de doença e ao tamanho médio das repetições CAG expandidas.

Palavras-chave

Doença de Machado-Joseph; poliglutaminas; ataxias espinocerebelares

2. Introdução

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma degeneração encefálica multissistêmica, manifesta como uma forma de ataxia espinocerebelar (SCA) autossômica dominante. Ela foi primeiro relatada em famílias norte-americanas com ascendência açoriana (1, 2, 3). Além de ser a mais freqüente SCA diagnosticada entre descendentes de portugueses, a DMJ também já foi relatada no Japão, China, Índia, Austrália, França e Alemanha, sendo considerada a mais comum das SCAs (4). Nos pacientes portugueses, a idade de início média é de 40,5 anos e a sobrevida média é de 15,6 anos (4). Em pacientes brasileiros, a idade de início média foi relatada como sendo de 34 anos (5).

A DMJ caracteriza-se, clinicamente, por uma ataxia cerebelar progressiva com características associadas e que incluem oftalmoplegia progressiva, achados piramidais, posturas distônicas, atrofia muscular distais, retração palpebral, fasciculações de face e de língua, e ausência de comprometimento intelectual. As diferentes expressões clínicas da DMJ resultaram na seguinte classificação: a DMJ tipo 1 apresenta uma idade de início precoce e um curso rápido, os pacientes tendo marcada síndrome piramidal e extrapiramidal, além da ataxia e da oftalmoplegia; a DMJ tipo 2 é a mais comum e se inicia na quarta década de vida, sendo mais restrita às manifestações cerebelares e de movimento ocular, com pouco ou nenhum envolvimento piramidal, extrapiramidal e periférico; e a DMJ tipo 3 é a de início mais tardio, com um quadro clínico que combina os achados periféricos àqueles encontrados no tipo 2 (4, 6).

O *locus* MJD1 foi localizado no cromossomo 14q (7). O gene foi identificado e contém uma seqüência repetitiva CAG na região 5' da seqüência codificadora, que está expandida nos pacientes com DMJ (8). Alelos normais contêm entre 12 e 40 repetições CAG, enquanto os alelos mutantes contêm entre 61 e 84 repetições (9). Dois fenômenos são bem conhecidos: há uma freqüente antecipação na idade de início dos doentes, por um lado, e a transmissão do alelo expandido é instável, por outro. Entre o tamanho da seqüência repetitiva e a idade de início existe uma forte correlação negativa. Entre os subtipos clínicos, o tipo 1 encontra-se associado às maiores repetições (9, 10).

O objetivo do presente estudo foi o de se examinar as características clínicas, genéticas e moleculares de um grupo de pacientes com DMJ, recentemente identificados no estado mais meridional do Brasil (Rio Grande do Sul), e compará-las com os dados da literatura.

3. Materiais e métodos

3.1 Pacientes

Sessenta e dois pacientes de 35 famílias com DMJ foram identificados em um estudo prévio (11). Os pacientes incluídos foram submetidos à entrevista clínica, ao exame neurológico e à investigação molecular. Cinquenta e quatro deles também tiveram uma expansão CAG detectada no *locus* MJD1.

Para se estudar melhor algumas variáveis, como a idade de início nas diferentes gerações e o efeito do sexo do genitor afetado, nós acrescentamos outros 93 casos de familiares cujas informações eram confiáveis, mas a quem nós não tivemos acesso direto. O número total de casos estudados foi de 155 – 76 homens e 79 mulheres.

3.2 Métodos

Todos os pacientes foram entrevistados e examinados pelo mesmo médico (LBJ). Um protocolo standard incluía a determinação da idade de início, da duração da doença e do primeiro sintoma, além de um exame neurológico padrão. Considerou-se o início como sendo o momento no qual o paciente ou um familiar próximo passaram a notar o primeiro sintoma.

As regiões polimórficas, expandidas, do gene MJD1 foram analisadas segundo

condições previamente descritas (12).

As análises estatísticas dos dados de história clínica, dos heredogramas, dos exames neurológicos e dos resultados moleculares, foram realizadas usando-se o SPSS for Windows ®.

As diferenças entre as idades de início dos sexos e entre os pares de pai-e-filho, assim como as proporções sexuais, a duração da doença e o comprimento das repetições CAG dos 3 tipos clínicos, foram avaliadas pela análise de variância ou pelo teste do qui-quadrado, de acordo com o tipo de variável que estivesse em estudo. Quando dois grupos independentes fossem comparados em relação a uma variável contínua, as diferenças eram avaliadas pelo teste t de Student. No caso de os desvios-padrões diferirem muito, optou-se pelo teste U, não-paramétrico, de Mann-Whitney. Possíveis correlações entre dois traços quantitativos, como idades de início e número de repetições CAG, foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson.

4. Resultados

4.1 Idades de início, tipos, duração da doença, sobrevida, efeito do sexo do genitor afetado, antecipação e proporção de irmãos afetados versus não-afetados

Os pacientes identificados pertenciam a 31 famílias de origem portuguesa, a 3 famílias afro-brasileiras e a uma família de origem alemã.

A idade de início média foi de 32,1 anos ($dp = 11,9$) e foi semelhante entre homens (31,4) e mulheres (32,8) (teste t ns), variando entre 8 e 56 anos.

Entre os casos já falecidos com dados bem documentados (10 homens e 10 mulheres), a sobrevida média foi de 17 anos (variação de 5 a 30 anos; $dp=7$ anos) e não diferiu entre os sexos.

Os 62 pacientes examinados foram classificados apenas conforme os critérios neurológicos, independentemente da idade de início. Os pacientes com achados piramidais e extrapiramidais graves foram classificados como tendo DMJ tipo 1. Os pacientes com achados significativos de neurônio motor inferior – fossem amiotrofias ou fasciculações – e / ou com perdas sensoriais nas extremidades inferiores – como uma incapacidade de discriminar estímulos táteis de algésicos, ou como uma sensibilidade vibratória menor do que 11 segundos nos primeiros artelhos – foram classificados como tendo o tipo 3. Os pacientes sem quaisquer dos critérios acima mencionados foram classificados como tendo o tipo 2.

Entre os 62 pacientes examinados, encontramos 8 com o tipo 1 (13%), 26 com o tipo 2 (42%), e 21 com o tipo 3 (34%). Não foi possível classificar 7 pacientes (11%), pois eles apresentavam simultaneamente intensos sintomas extrapiramidais e periféricos. Por essa razão, nós os chamamos de “inclassificáveis”.

Uma diferença significativa foi observada entre as idades de início médias dos pacientes com tipo 1 e as dos demais ($p < 0,0001$, ANOVA). Elas foram de 15,2 anos ($dp=2,15$) para o tipo 1, de 33 anos ($dp=11,3$) para o tipo 2 e de 37 anos ($dp=7,4$) para o tipo 3. Os “inclassificáveis” adoeceram, em média, aos 26,8 anos ($dp=10,5$).

Diz-se que todos os pacientes, no início da sua doença, são como o tipo 2 e que somente após 4 ou 5 anos de evolução é que o seu verdadeiro fenótipo ficará estabelecido (4). Por isso, procurou-se observar se não haveria diferenças nas durações das doenças entre os 3 grupos. A duração média da doença, na amostra total, foi de 9,8 anos ($dp= 6$), homens e mulheres apresentando valores equivalentes (10,8 anos, $dp= 6,9$, e 9,9 anos, $dp= 6,6$, respectivamente). Os grupos, entretanto, diferiram entre si: isso aconteceu entre os tipos 1 e 3 ($p < 0,05$, ANOVA) e entre o tipo 1 e os “inclassificáveis” ($p < 0,02$) (Figura 1). As durações médias da doença dos pacientes de tipo 2 e 3 não diferiram em qualquer comparação que se fizesse: mas especialmente não se diferenciaram uma da outra (Figura 1).

Entre os pacientes classificados como tipo 2, houve 4 casos com uma idade de início precoce: 13, 19, 20 e 22 anos de idade. Esses pacientes estavam doentes há 6, 23, 15 e 4 anos, respectivamente. É improvável, ao menos nos dois casos com as mais longas durações de doença, que o fenótipo dos mesmos venha a mudar para o tipo 1 no

futuro.

O efeito do sexo do genitor afetado sobre o fenótipo do(a) filho(a) foi avaliado, comparando-se as idades de início e os tipos clínicos encontrados nesses filhos e filhas. O fenômeno da antecipação também foi examinado.

As idades de início médias, de acordo com os sexos dos propósitos e de seus genitores afetados, estão apresentadas na Tabela 1. Nenhuma diferença significativa foi encontrada, embora parecesse haver uma tendência de que a idade de início fosse um pouco mais precoce entre os homens com transmissão paterna (29,9 anos) do que a das mulheres com transmissão materna (33,7 anos).

A distribuição dos tipos clínicos de acordo com o sexo dos pais afetados também foi homogênea, pais e mães afetados tendo as mesmas proporções de filhos(as) com os tipos 1, 2 e 3 (qui-quadrado ns).

Para se estudar a antecipação, 60 pares de genitor-filho(a) afetados, com idades de início bem documentadas, foram avaliados. Na maioria das vezes, aconteceram antecipações bastante importantes. Na amostra total, os(as) filhos(as) adoeceram em média 7,7 anos ($dp=8,3$) mais cedo do que os seus progenitores (Figura 2). O desvio padrão é maior do que o valor médio da diferença, porque houve algumas situações nas quais a doença do genitor começou antes do que a do filho(a). Ao se procurarem por diferenças devidas ao sexo do genitor ou do filho(a) afetados, nada apareceu de significativo, embora houvesse uma aparente tendência de os pares de mãe-filho apresentarem menores antecipações (média de 4,8 anos) do que os pares de pai-filho

(média de 9,6 anos) (Tabela 1).

A antecipação também foi semelhante entre os 3 tipos clínicos (ANOVA) (Tabela 1), embora fosse aparentemente mais grave entre os indivíduos com o tipo 1.

As únicas diferenças significativas, no que diz respeito à antecipação, aconteceram quando o sexo e o tipo clínico foram simultaneamente utilizados para se estratificar a amostra. Entre os pacientes com tipo 1, a antecipação era significativamente mais grave se o genitor afetado fosse o pai (16,2 anos) do que se fosse a mãe (2,6 anos) ($p < 0,0001$, teste U de Mann-Whitney) (Tabela 1).

A maioria das 35 famílias estudadas era constituída de 4 ou 5 gerações adultas e apresentava irmandades bastante extensas. É claro que a variação na idade de início da DMJ torna bastante duvidosa a afirmação de que um indivíduo assintomático, em um heredograma colhido durante uma entrevista, seja caracterizado como não portador da mutação. Mesmo assim, seria interessante se observar as proporções de irmãos afetados *versus* os não afetados, entre os indivíduos com mais de 50 anos de idade – excluídos, naturalmente, os propósitos. Com essas condições, encontraram-se 84 irmãos afetados *versus* 40 não afetados nos 35 heredogramas estudados. Ou seja, 68% dos irmãos com mais de 50 anos eram afetados pela DMJ, o que foi estatisticamente diferente do esperado ($p < 0,0001$, qui-quadrado).

4.2 Achados neurológicos

A ataxia de marcha foi a queixa inicial de todos os pacientes entrevistados, sendo o desequilíbrio razoavelmente bem datado. Os achados dos exames neurológicos estão apresentados na Tabela 2. Entretanto, alguns achados merecem ser melhor comentados. Em 58/62 casos (93,5%), a ataxia apendicular estava presente, mas ela era muito menos importante do que a ataxia axial. A natureza da disartria, presente em 85,5% dos casos, era algo entre cerebelar, piramidal e/ou pseudobulbar, e em 3 pacientes ela era tão grave que impedia completamente a fala (anartria). Os achados piramidais, presentes em 74% dos casos, eram limitados, na maioria das vezes, à hiperreflexia e ao sinal de Babinski, a espasticidade aparecendo em 11 casos (24%) e a paresia em nenhum. Fasciculações foram vistas em 25/61 pacientes (41%), ocorreram predominantemente ao redor dos olhos e dos lábios e durante o movimento voluntário, tendo sido menos vistas nos membros em repouso. Embora as fasciculações fossem comuns, a amiotrofia (outro sinal de doença do neurônio motor inferior) foi surpreendentemente rara entre os nossos doentes: somente dois deles a apresentavam. O exato oposto, ou seja, músculos bem delineados e até mesmo hipertróficos, foram vistos em 15 pacientes (24%).

4.3 Achados moleculares

A figura 3 mostra as frequências dos comprimentos das seqüências repetitivas CAG nos cromossomos normais e nos portadores da expansão no gene MJD1, em 54 pacientes estudados. A relação entre o comprimento CAG do alelo expandido e a idade de início está apresentada na Figura 4. Observou-se um coeficiente de correlação de $-0,68$ entre ambas ($p < 0,001$, teste de correlação de Pearson),

assumindo-se a existência de uma relação linear entre as duas variáveis.

Quando os comprimentos CAG dos pacientes com os 3 diferentes tipos clínicos foram comparados, uma diferença significativa foi observada entre o tipo 1 e os outros dois tipos clássicos, os pacientes de tipo 1 apresentando repetições CAG mais longas do que os demais ($p < 0,0001$, ANOVA) (Figura 5) .

5. Discussão

5.1 Aspectos clínicos da DMJ

No presente estudo, a idade de início média foi semelhante àquela encontrada em outro trabalho realizado a partir de pacientes brasileiros (5). Pode-se dizer que a DMJ, nos pacientes brasileiros, começa em geral mais cedo do que nos pacientes portugueses e açorianos (4) (Tabela 3), e mais tarde do que nos pacientes indianos, japoneses e negros americanos (4).

O *background* genético influencia a idade de início, nessa doença. É bem conhecida a diferença entre os açorianos provenientes da ilha de Flores e os provenientes da ilha de São Miguel (4). Os pacientes provenientes de Flores tem uma idade de início média 8 anos mais precoce do que os de São Miguel. Entretanto, não se pode atribuir a precocidade de início dos brasileiros aqui apresentados a um maior contingente de Flores entre os seus ancestrais. A maioria dos nossos doentes provavelmente tinha ascendência açoriana, ascendência que recua à primeira onda de colonização açoriana da América do Sul, entre 1750 e 1755. Naqueles anos, ao redor de 7.000 açorianos emigraram para o sul do Brasil, 2.000 dos quais para a nossa região, onde eles representaram uma duplicação da população, na época (14). Os documentos históricos mencionam especificamente que 4% dos colonos açorianos de então eram originários de São Miguel e que os demais provinham de outras ilhas. Nenhum deles provinha da ilha de Flores (14).

As definições dos 3 tipos clínicos habitualmente incluem afirmações genéricas sobre

as suas idades de início (4, 6). No presente trabalho, decidiu-se classificar os casos nos 3 tipos usando-se apenas o quadro neurológico, o que nos permitiu examinar as idades de início como uma variável independente. Tal como acontecera com a idade de início média do grupo como um todo, as idades de início resultantes, nos 3 tipos, foram 7 a 10 anos mais precoces do que aquelas encontradas entre os 3 tipos nos casos portugueses e açorianos (Tabela 3). As diferenças encontradas entre as idades de início do tipo 1 e os demais somados foram estatisticamente significantes, enquanto não o foram as diferenças entre o tipo 2 e o 3. Embora já tivesse sido observada por outros autores (10), essa semelhança (ou ausência de diferença estatística) entre os tipos 2 e 3 costuma receber pouca atenção, ou então ser interpretada como resultado de uma pequena amostragem (erro de tipo II).

A duração da doença foi estimada nos 3 tipos distintos e diferenças estatísticas foram encontradas entre as médias dos tipos 1 e 3 e entre as do tipo 1 e a de pacientes “inclassificáveis”. A duração média da doença dos tipos 2 e 3 foi semelhante e bastante longa. Depois de muitos anos de doença, alguns pacientes permaneceram apresentando os sinais da DMJ tipo 2, enquanto outros desenvolveram os sinais periféricos característicos do tipo 3. Esses dois desfechos, prováveis reflexos de diferentes vulnerabilidades neuronais à poliglutamina MJD1, foram claramente independentes da duração da doença e do tamanho das repetições CAG. E mais: também não foram dependentes, na nossa amostra bem como nas de outros, da idade de início (10).

Dois pacientes, classificados como apresentando o tipo 2, chamaram também atenção: em um deles, a doença se iniciou aos 19 anos e já durava 23 anos quando o paciente

entrou no estudo; em outro, a doença se iniciou aos 20 e durava 15 anos. Embora incomuns, esses casos demonstram que nem todo paciente com um início precoce desenvolverá o fenótipo tipo 1.

Foi-nos impossível classificar 7 dos 62 casos examinados, porque eles apresentavam simultaneamente achados de tipo 1 e de tipo 3. O quadro clínico dos mesmos era mais grave do que os demais: por exemplo, dois desses casos “inclassificáveis” eram anártricos. Embora nós tenhamos dito que a sua idade de início média foi de 26,8 anos, isso foi um pouco impróprio, pois essa idade de início tinha uma distribuição bimodal, 3 dos 7 pacientes tendo adoecido entre os 15 e os 21 anos, e os 4 demais, entre os 30 e os 41 anos. Esses pacientes “inclassificáveis” tiveram as mais longas durações de doença (15 anos, em média) e nós supomos que, em parte, essa maior gravidade dos seus quadros fosse resultado de uma sobrevida mais longa.

O possível efeito do sexo do genitor afetado sobre o fenótipo foi avaliado de diversas maneiras. Nenhuma associação estatística foi encontrada entre o sexo do genitor e a idade de início, a proporção dos tipos clínicos ou a antecipação. O mesmo se deu quando a combinação dos sexos dos pares de genitor-filho(a) foi examinada. Algumas tendências, apenas, apareceram, ligando (a) um início mais precoce e (b) as piores antecipações aos filhos homens de pais afetados, e (c) as piores antecipações aos pacientes com tipo 1, em relação aos outros tipos.

A princípio, o sexo do genitor e os tipos clínicos de seus filhos não se confundem um com o outro, pois há tantos casos de tipos 1, 2 e 3 entre as transmissões maternas quanto os há nas transmissões paternas. Se sexo e tipo clínico são independentes entre

si, então os seus efeitos independentes sobre a antecipação poderiam ser aditivos. Ao se procurar por isso, viu-se que, entre os pacientes com tipo 1, a antecipação era bem pior se a transmissão fosse paterna (16,2 anos – 5 casos) do que se fosse materna (2,6 anos – 5 casos). Esses números parecem sugerir que, no caso das transmissões maternas, as mães já haviam adoecido precocemente e que também poderiam ser portadoras do tipo 1, tal como seus filhos, mas isso é só uma conjectura, pois essas mães não foram examinadas. Na literatura, já houve a sugestão de que existiria um excesso de transmissões maternas nos casos juvenis da DMJ (9), mas isso absolutamente não aconteceu entre os casos aqui apresentados – os nossos casos com tipo 1 e transmissão paterna foram tão precoces quanto os com transmissão materna. Na presente amostra, parece que um paciente mais provavelmente teria uma evolução para o tipo 1 se a sua mãe já tivesse tido, antes, um início precoce, enquanto, por outro lado, as transmissões paternas acelerariam esse evolução em uma dada família.

É arriscado se afirmar que a proporção de irmãos afetados *versus* não afetados seria de 84 : 40, já que alguns dos não-afetados poderiam se tornar sintomáticos com o tempo. Mesmo tendo-se em mente que se trata de uma subestimativa, a proporção de doentes é muito maior do que a esperada para uma doença dominante – 68%. Esse achado não foi inusitado, uma vez que evidências moleculares de transmissão preferencial dos maiores alelos da DMJ já foram descritas (13, 15).

5.2 Aspectos moleculares

Os comprimentos das repetições CAG dos alelos normais e expandidos dos casos aqui apresentados estão de acordo com as medidas descritas por outros autores (5, 9, 10).

A correlação invertida entre o comprimento dos CAGs expandidos e a idade de início (Figura 4) também foi muito semelhante, ou mesmo igual, às encontradas por outros investigadores (9, 10). Como se esperava, por volta de 47% da variabilidade na idade de início pôde ser explicada pelo comprimento do alelo expandido. A relação entre o tipo 1 e os maiores alelos expandidos também não é nova. Entretanto, a instabilidade da repetição CAG expandida dá-nos apenas uma explicação parcial para a grande variabilidade de apresentações clínicas: veja-se que houve pacientes com tipo 1 cuja repetição CAG tinha o mesmo comprimento que as de pacientes com tipo 2 e 3 (Figura 5). Isso quer dizer que outros fatores – genéticos, ambientais ou ambos – também influenciam a história natural da DMJ. As três evoluções clínicas, tal como a idade de início, parecem ser determinadas pela associação do tamanho da repetição CAG com outro fator modificador, ainda desconhecido.

Em síntese, observamos que os nossos pacientes com DMJ tiveram uma idade de início mais precoce, em geral, do que a de portugueses e açorianos, e que esse achado não pode, no momento, ser explicado por uma procedência predominante de Flores. A sua sobrevivência, a proporção dos tipos, a antecipação média, a proporção de afetados *versus* não afetados, as manifestações neurológicas e moleculares foram todas semelhantes às encontradas em Portugal, no Japão e nos Estados Unidos. A duração média da doença dos pacientes aqui apresentados foi bastante longa, o que permitiu uma classificação mais provavelmente correta dos mesmos. Os pacientes com tipo 1 e com transmissão paterna apresentaram as piores antecipações. Os pacientes com tipo

1, em geral, foram os que tiveram as maiores expansões CAG, como era esperado. Embora tenhamos tido tantos resultados semelhantes aos de outros e, portanto, sem novidade maior, nós enfatizamos que não se encontrou nenhuma explicação, entre as variáveis estudadas, para o desenvolvimento dos tipos 2 e 3, já que ambos os tipos foram semelhantes no que diz respeito à idade de início, à duração do quadro e ao comprimento das repetições CAG expandidas.

6. Agradecimentos

Os autores desejam agradecer às Dras. Ana C. S. Puga e Leticia R. Mello e à acadêmica Elisabete Weber, por sua ajuda na organização do material clínico. Esse trabalho foi realizado, em parte, graças ao apoio da FAPERGS.

8. Legendas

Figura 1 – A duração da doença entre os 3 tipos clínicos, na presente amostra. A duração média da doença foi de 5,37 anos (dp=3,4) no tipo 1, de 8,4 anos (dp=5,7) no tipo 2, de 11,6 anos (dp=5,8) no tipo 3 e de 15 anos (dp=5,6) nos casos “inclassificáveis”. Os tipos 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas ao serem comparados com os demais, inclusive quando comparados um com o outro.

Figura 2 – A distribuição da antecipação, de acordo com o sexo do genitor afetado.

Figura 3 – As frequências dos tamanhos das seqüências repetitivas CAG nos alelos normais e nos expandidos. Os alelos normais contêm entre 14 e 38 repetições, sendo mais freqüente o de 24 repetições. Os expandidos contêm entre 71 e 85 repetições, o mais comum sendo o de 73 repetições.

Figura 4 – A correlação do comprimento das repetições CAG no gene MJD1 com a idade de início. Um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,48$ foi obtido entre as variáveis.

Figura 5 – A distribuição dos tamanhos das repetições CAG entre os tipos clínicos. Os pacientes com o tipo 1 tiveram alelos maiores – com média de 80 (dp=3) repetições – do que os pacientes com os tipos 2 e 3 – com média respectivamente de 75,3 (dp = 2) e de 74,2 (dp = 1,6) ($p < 0,0001$, ANOVA).

Tabela 1 – As idades de início e as antecipações nos pacientes, de acordo com o sexo, com o genitor afetado e com o tipo clínico.

		Média (desvio padrão) (anos)	N	Significância estatística
Idade de início	Idade de início da amostra total	32,1 (11,9)	101	-
	Idade de início dos pacientes com transmissão materna	32,9 (12,6)	60	Ns (teste t)
	Idade de início dos pacientes com transmissão paterna	30,9 (10,9)	34	
	Idade de início dos homens, filhos de mães portadoras	31,8 (13)	26	Ns (Anova)
	Idade de início das mulheres, filhas de mães portadoras	33,7 (12,4)	34	
	Idade de início dos homens, filhos de pais portadores	29,9 (7,8)	17	
	Idade de início das mulheres, filhas de pais portadores	31,9 (13,5)	17	
Antecipação [idade de início do genitor menos a do filho (a)]	Antecipação em geral	7,7 (8,3)	60	-
	Hm – h *	7,1 (6,4)	27	Ns (teste t)
	Hm – m	8,1 (9,7)	33	

Tabela 1 – (Continuação)

		Média padrão (anos)	(desvio N	Significância estatística
Antecipação [idade de início do genitor menos a do filho (a)]	h – hm	9,4 (8)	24	Ns (teste t)
	m – hm	6,3 (8,3)	35	
	h – h	9,6 (4,6)	11	Ns (Anova)
	h – m	9,2 (10)	13	
	m – h	4,8 (6,7)	15	
	m – m	7,4 (9,3)	20	
	Entre pacientes com tipo 1	9,4 (9,1)	8	
	Entre pacientes com tipo 2	6,1 (8,1)	26	
	Entre pacientes com tipo 3	6,1 (5,9)	21	
	H – hm com tipo 1	16,2 (7,6)	5	P < 0,0001 (teste U de Mann-Whitney)
	M – hm com tipo 1	2,6 (3,5)	5	
	H – hm com tipo 2	- 2,3 (8)	3	Ns (teste U de Mann-Whitney)
	M – hm com tipo 2	7,9 (7,1)	20	
	H – hm com tipo 3	7 (5)	10	Ns
	M – hm com tipo 3	5,4 (6,7)	11	

Ns: não significativo.

*: h = homem
m = mulher
h – m = idade de início do pai (homem) menos a da filha (mulher)
hm – h = idade de início do genitor (de qualquer sexo) menos a do filho (homem).

Tabela 2 – Achados neurológicos

	N	Frequência
Ataxia de marcha	62/62	100 %
Mínima	3/62	4,8%
Moderada	37/62	59,7%
Marcha apenas com apoio	14/62	22,6%
Necessidade de cadeira de rodas	8/62	12,9%
Ataxia apendicular	58/62	93,5%
Nistagmo	57/62	92%
Disartria	53/62	85,5%
Achados piramidais	46/62	74%
Perturbações sensoriais	39/57	68,5%
Disfagia	30/47	63,5%
Oftalmoplegia supranuclear	26/61	52,5%
Oftalmoplegia nuclear	6/61	
Fasciculações	25/61	41%
Retração palpebral	17/62	27,4%
Distonia	14/61	23%
Rigidez/bradicinesia	14/61	23%
Atrofia óptica	13/57	22,8%

Tabela 3 – Comparação entre os pacientes do presente estudo e outros pacientes portugueses e brasileiros, descritos por outros autores

Achado	Pacientes com portugueses e açorianos (Sequeiros and Coutinho, 1993) (4)	Pacientes brasileiros, provenientes de diversas regiões (Lopes-Cendes et al, 1997) (5)	Pacientes do presente estudo, provenientes do Rio Grande do Sul
Idade de início média, em anos (dp) (n)	39 (n=306)	34 (n=34)	32,1 (11,9) (n=101)
Idade de início média dos casos com tipo 1 (dp) (n)	24,6 (18)		15,2 (2,1) (8)
Idade de início média dos casos com tipo 2 (dp) (n)	40,3 (81)		33 (11,3) (25)
Idade de início média dos casos com tipo 3 (dp) (n)	47,1 (45)		37 (7,4) (21)
Proporções dos tipos 1, 2, 3 e “inclassificáveis”, em %	1 - 12,7 2 - 57 3 - 30,3 “inclassificáveis” - não mencionados		1 - 13 2 - 42 3 - 34 “inclassificáveis” - 11

6.5 Artigo 3

Neurological findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes and (CAG)_n

Running head: Neurological findings in Machado-Joseph disease

Laura B. Jardim ^{1,2}, Maria Luiza Pereira ^{1,3}, Isabel Silveira ⁵, Anabela Ferro ⁵, Jorge Sequeiros ⁵ and Roberto Giugliani ^{1,4}.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departments of ² Internal Medicine, ³ Biochemistry and ⁴ Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and ⁵ UniGENe, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal.

Address for correspondence:

Laura B. Jardim

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, Brazil

Phone + 55 51 316 8011, Fax + 55 51 316 8010 , e-mail: laurajardim@terra.com.br

1. Abstract

Context: Machado-Joseph disease (MJD), an autosomal dominant spinocerebellar degeneration caused by an expanded CAG repeat on chromosome 14q32.1, is a very heterogeneous disorder with respect to clinical manifestations. The reasons for the wide range of neurological findings in this disease, specially, are poorly understood.

Objective: The present work shows an attempt to explain part of this heterogeneity through the association of the neurological findings with: disease duration, age of onset, gender, clinical type and size of CAG repeat expansion.

Design: survey. **Setting:** ambulatory care. **Patients:** a consecutive sample of 62 MJD patients. **Main outcome measurement:** neurological signs.

Results: A direct relationship was found between the disease duration and severity of gait and limb ataxia, dysarthria, dysfagia, fasciculations, pyramidal syndrome and ophthalmoplegia ($p < 0.02$). The most severe forms of nuclear ophthalmoplegia were associated with type 1, whereas those of supranuclear ophthalmoplegia were associated with type 3 MJD ($p < 0.0002$). It was also found that higher mean (CAG)_n lengths were associated with worse degrees of pyramidal syndrome and dystonia ($p < 0.002$). The presence and severity of nystagmus, eyelid retraction, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy were not clearly associated with any of the predictive variables under study.

Conclusions: While the heterogeneity of several neurological findings was associated with disease duration, clinical type or (CAG)_n length, the presence of nystagmus, eyelid retraction, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy, was hardly attributable to any known reason or variable.

Key words: Machado-Joseph disease, spinocerebellar ataxias, CAG repeats.

2. Introduction

Machado-Joseph disease (MJD) is a multisystem degeneration of the CNS, inherited as an autosomal dominant (1). It is most often a highly incapacitating disease: typically, patients will become confined to a wheelchair and will later be bedridden. Disease manifestations usually start during adulthood, with a mean (\pm sd) age of onset of 32 (\pm 12) years among Brazilian patients (submitted to publication), or 37 (\pm 14), among the Portuguese and in those of Portuguese-Azorean descent (2). The distribution of age of onset is very wide, ranging from 5 to 73 years in Portuguese patients (2). Penetrance is high but incomplete, since there were rare obligate carriers free of symptoms until as late as age 90 (3). The median survival time after onset varies from 14 to 17 years (2).

The gene associated with MJD is located on chromosome 14q32.1 (4), and contains a CAG repeat motif in the 5' region of the coding sequence, which is expanded in MJD patients (5). Normal alleles vary from 12 to 41 repeats, whereas expanded alleles vary between 66 and 84 repeats (6).

The wide range of clinical manifestations include: cerebellar ataxia, affecting gait, limb movements, speech articulation and deglutition; a pyramidal syndrome, with brisk deep tendon reflexes, Babinsky sign and spasticity; a supranuclear, progressive external opthalmoplegia (PEO), with early limitation of upward gaze and convergence, and, less frequently, a nuclear opthalmoplegia; extrapyramidal signs, including dystonia, rigidity and bradykinesia; a lower motor neuron disease, with fasciculations and amyotrophy; sensitive loss; eyelid retraction, contraction

fasciculations, loss of weight, and a sleep disorder (2).

Three classical types were proposed (1) and are widely accepted: type 1 patients have an earlier onset and a more severe course, showing severe dystonic movements, more severe pyramidal signs, PEO, and limb and gait ataxia; type 2 patients become sick around the general mean age of onset, and show mostly cerebellar and pyramidal deficits, and PEO; type 3 patients have a relatively less severe, later-onset disease, with peripheral signs, gait and limb ataxia, with or without PEO, and with or without a pyramidal syndrome. In addition to these well-known phenotypes, other variants have been proposed (7, 8, 9, 10, 11). The wide variability in age of onset, the complex and heterogeneous neurological findings of MJD, as well as the existence of three major phenotypes, are evidence that the disease, caused by a major single gene, is modulated by modifier factors.

The first and better studied modifying factor was the (CAG)_n length itself. It was shown that the repeat length has a strong negative correlation with the disease onset, and some relationship to clinical subtype (6, 12, 13). Nevertheless, the number of CAG repeats explain only partly the MJD phenotype.

On the other hand, the variable neurological picture could be, in some extent, related to disease duration. It is very plausible that some findings are present in one patient and not another, depending only on time of evolution. If that is the case, some differences among patients would be wrongly attributed to different genetic or environmental backgrounds.

The main purpose of the present work was to help recognise which neurological findings are attributable to disease duration, gender, sub phenotype, age of onset, CAG repeat length, and which are not attributable to any of the former, keeping in mind that the latter could be seen as independent neurological markers of some, yet unknown, modifier factor.

3. Subjects

Sixty-two MJD patients were recruited among a large case series of SCA patients, originated from Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil. Almost all were confirmed by molecular analysis. These patients belonged to 34 families: 31 of Portuguese ancestry, 2 Afro-Brazilians, and 1 of German origin.

Data, such as age at onset, gender distribution and disease duration, are summarised in Table 1, and has been extensively commented elsewhere (submitted to publication).

4. Methods

All patients were interviewed and examined by the same physician (LBJ). A standardised procedure included determining the age at onset, disease duration, first sign at onset and a thorough neurological examination. Onset was considered as the time when the patient or a close relative was able to date the appearance of the first symptoms.

Patients were classified among the three clinical subtypes, according to neurological findings, as previously described. The age of onset, however, was not used as a criteria for their classification.

Expansion of the MJD1 gene was analysed according to conditions previously described (14).

Study variables were analysed according to the presence and degree of several neurological findings. To evaluate which neurological findings would be attributable to time of evolution, differences in disease duration were assessed by analysis of variance with test for linear trend. Since disease duration could be debated for its subjective character, patients were also divided according to their degree of incapacitation, using their degree of gait ataxia, as follows: (a) "subtle gait ataxia", observed only when walking on toes, heels or in tandem; (b) "moderate ataxia" on spontaneous gait, with gait autonomy still preserved; (c) "walking with help" of other person or a cane; and (d) "wheelchair bound" when there was total inability to walk. Differences between the level of incapacitation and the degree of several neurological

findings were assessed by chi-square linear-by-linear association. To evaluate which neurological findings (other than those used for their definition) could be attributable to one of the classical phenotypes, differences among the three types were assessed by Fisher's exact test. The association between the degree of each clinical variable and age at onset was tested by ANOVA, while for association between the presence of a neurological sign and gender, Fisher's exact test was used. Finally, the association between the degree of neurological findings and the CAG repeat length was measured by Mann-Whitney U test (when comparing two groups) or by Kruskal-Wallis test (for multiple comparisons), since CAG length distribution was not normal.

5. Results

Gait ataxia was the initial sign in all patients. Table 2 gives further details about the neurological signs found in the whole sample.

We have found 8 patients with MJD type 1 (13%), 26 with type 2 (42%), and 21 with type 3 (34%). Their ages at onset (Table 1) were compatible with data from literature (1, 2, 6, 12). We were not able to classify 7 cases (11%), because they presented simultaneously with severe extrapyramidal and peripheral findings, and for this reason they were called “unclassified”. Since these cases had the longest disease duration, the difficulty in classifying them may simply reflect their advanced stage in the disease (Table 1).

Neurological signs were classified according to their degree of severity or just according to their presence or absence (Table 3). Amyotrophy, in particular, was rarely seen (2/62 patients): indeed, a good muscle trophism was seen in 15/62 patients, even though several of them were already very incapacitated.

5.1 Which neurological findings progress with time?

5.1.1 Disease duration

Gait ataxia, dysarthria, dysphagia and fasciculations progressed with time ($p < 0.02$ or less) (Figure 1, Table 4), whereas nystagmus, pyramidal signs, limb ataxia, ophthalmoplegia, dystonia, rigidity/bradykinesia, eyelid retraction and optic atrophy

did not (Table 4).

Since fasciculations are markers of type 3 MJD and since this subgroup of patients showed long disease duration (Table 1), we performed this test again, among type 3 patients only. Fasciculations were again related to disease duration, confirming the former findings ($p < 0.05$, Table 4).

5.1.2 Degree of incapacitation

At least two kinds of objections could be put forward to the use of disease duration as a measure of the disease's progression. The first is that it is a subjective information and difficult to evaluate. The second is that biological time, as with ageing, is not the same to everyone. For these reasons, we chose one neurological variable, gait ataxia, as the marker of disease's evolution. Gait ataxia was the initial sign in all patients, the main complaint in most, and showed a strong linear association with duration of disease.

The degree of each symptom was compared to the four stages of gait ataxia (figures 2 and 3). The rationale was that if the progression of any specific neurological symptom was to be due to the disease's evolution, a linear-by-linear association would be found between its worsening and progression of gait ataxia.

Limb ataxia, pyramidal syndrome, dysarthria, dysfagia, ophthalmoplegia, and fasciculations all worsened at the same time as gait ataxia progressed (Figure 2, Table 4). No linear association was found between the degree of gait ataxia and nystagmus,

eyelid retraction, sensitive loss, dystonia, rigidity/bradykinesia, or optic atrophy (Figure 3, Table 4).

5.2 What neurological findings are related to sex?

The frequency of each neurological sign was calculated according to gender: 30 patients were male and 32 female. Nystagmus was present in all women, while 5 out of 30 men did not show it, a difference which was statistically significant ($p < 0.05$, Fisher's exact test) (Table 4).

5.3 What neurological findings are linked to classical types?

Some neurological signs are more typical of a given subtype. We used them to define the clinical type, namely severe dystonic posturing and spasticity for type 1, and lower motor neuron disease and important sensitive loss for type 3. It would be useful to know how the other neurological signs are distributed among the 3 clinical types.

When the degree of severity of each neurological finding (other than those already mentioned) was analysed among the three classical types, no association was found in the majority of cases (Table 4). The severity of ophtalmoplegia, however, showed some association with phenotype ($p < 0.0002$) (Table 4). Supranuclear ophtalmoplegia (manifesting as a medial longitudinal fasciculus syndrome, or a limitation in upward gaze and convergence – see also Table 3) was more frequent among type 3 patients, while nuclear ophtalmoplegia –mainly of the sixth nerve - was more common in type 1 and unclassified patients.

5.4 What neurological findings depend on age at onset?

If neurons would be prone to disease process in specific intervals along a time line, then their signs of dysfunction would be linked to the age of onset. In this possible cause-effect relationship, disease duration is a likely confounder, since, as the disease lasts longer, the more likely is the appearance of certain signs. Only patients with disease duration up to 5 years (n=18) were used to test this hypothesis. Their mean age of onset was 27.3 years (range: 12 to 47), therefore earlier than the that found in the global sample. Pyramidal signs, dysarthria, dystonic postures and rigidity/bradykinesia were more frequent and more severe, as early as the disease has started ($p < 0.05$ for the first and of $p < 0.01$ for the others; ANOVA). For example: the 14 patients without rigidity/bradykinesia had a mean age of onset of 30 years, whereas the 4 patients with these symptoms had a mean age of onset of 17 years. These results are statistically significant, but should be seen with caution, due to the small size of the sample.

5.5 What neurological findings are associated with the CAG repeat length?

The degree of severity of neurological signs was also tested for a possible association with the CAG repeat length (Table 4). A higher mean CAG length was then associated with a worse degree of the pyramidal syndrome and dystonia (Table 5).

6. Discussion

Clinical heterogeneity is one of the most puzzling characteristics within the SCAs in general, particularly in MJD. The variable expressivity in age at onset, the complex and heterogeneous neurological findings, as well as the existence of three sub phenotypes, suggest the existence of some modifier factors.

It is not very clear to what extent the heterogeneity of neurological signs (other than those clearly associated with the extreme types 1 and 3) is due to the natural history of the disease, or is due to other genetic and environmental influences. Following the chronology of symptoms in a cohort study would be the best way to find the answer, but, since this is a rare and long-lasting disorder, that study is still missing. We tried to circumvent this difficulty by looking for association between the severity of several findings and time of evolution of the disease, using disease duration (chronological time), and degree of incapacitation (biological time), measured through the severity of gait ataxia.

The disease progression, measured either by duration or by incapacitation, seemed to be responsible for the worsening that occurred in gait and limb ataxia, dysarthria, dysphagia, fasciculations and pyramidal signs (Table 4). No association was found with nystagmus, eyelid retraction, dystonic postures, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy, confirming that these signs are independent of duration of the disease process.

Other reasons should explain the presence of nystagmus, eyelid retraction, dystonic

postures, sensitive loss, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy. These reasons can be environmental or genetic. For instance, these factors can be the same that determine the three well-known types, or some other. In order to test it, the severity of neurological signs was assessed according to type, age of onset, gender and CAG repeat length.

No association was found between the clinical types and the severity of almost all signs under study – duration-related as well as duration-unrelated findings. The exceptions were the two general forms of ophthalmoplegia, which will be commented later. Sensitive loss, a sign used to identify type 3, was doubtfully associated with disease duration (Table 4), so that we preferred to interpret this as a negative result. Sensitive loss, in the present sample, was only associated with clinical type (type 3).

The small number of patients with a short disease duration prevented our attempt to relate the different neurological signs to age of onset. It was apparent, however, a trend to an association of rigidity/bradykinesia with age of onset. Also, the small numbers that link nystagmus with female sex demand some caution.

The CAG repeat length of the expanded allele also did not explain the presence of nystagmus, eyelid retraction, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy. Therefore, the heterogeneity in these neurological signs remained unexplained.

Other points of note should be mentioned. The first is the association between the severity of the two forms of ophthalmoplegia – nuclear and supranuclear - and clinical types. The supranuclear ophthalmoplegia was more severe among type 3 patients,

whereas nuclear ophthalmoplegia was more common in type 1 and unclassified patients. Since type 1 is the most severe form and unclassified patients were those who have a longer duration, nuclear ophthalmoplegia could be linked with the severity of the general clinical picture. Nuclear ophthalmoplegia was also associated with large CAG tracts. Since they are the main determinants of type 1 MJD (6), this result seems to confirm the former.

Only gait and limb ataxia, and dysarthria could be exclusively attributed to disease progression.

The severity of the pyramidal syndrome did not differ statistically among the three types, whereas we could expect to find the more severe forms among type 1 patients (1, 2, 12). Since we observed that its severity was associated with the CAG repeat length (Table 5), we can speculate that the former lack of significance could be due to a small sample of type 1 cases.

The present findings related to disease duration almost reproduces those described by Barbeau and co-workers (15) and by Paula Coutinho (16), but the same cannot be said about the other results, mostly because of differences in the way the neurologic examination was plotted in the three studies. Barbeau and co-workers found that “nystagmus, when present, does not appear to be progressive”. Unfortunately, they did not mention eyelid retraction, optic atrophy and rigidity/bradykinesia (15). Coutinho followed 67 patients for 3.5 years, on average, and found associations with disease duration which were very similar to ours, the exception being pyramidal syndrome. She also noted that eyelid retraction did not worsen with disease duration

(16). Both previous studies were performed before the molecular discoveries, so that these data were lacking (15, 16). A third study described the relationship of some parameters of the natural history of MJD (17). They found that the CAG repeat length increased the rate of disease progression (measured by the severity of gait ataxia), whereas the age of onset did not. Our results agreed with the latter, but not with the former findings.

We conclude that the heterogeneity of several neurological findings seem to be partly explained by duration of the disease, clinical type and CAG repeat length. Nystagmus, eyelid retraction, rigidity/bradykinesia, and optic atrophy, however, were hardly attributable to any factor. We speculate that they could be seen as independent neurological markers of some, unknown, modifier factor.

We hope that, as Barbeau and co-workers suggested in their own cross-sectional study (15), the present approximations may be “confronted to actual observations over long periods of time”, in the future.

7. Acknowledgements

This work was partly supported by FAPERGS.

8. Statistical review

Bernardo Lessa Horta, MD, PhD, Escola de Medicina e de Psicologia, Universidade Católica de Pelotas.

9. References

- 1 Coutinho P and Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 1978; 28: 703-709.
- 2 Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds): "Hereditary Ataxias". *Adv Neurol* 1993; 61, pp. 139-153, Raven Press, New York, NY.
- 3 Sequeiros J. Análise genética das causas da variação fenotípica na doença de Machado-Joseph (tese de doutoramento). Porto: ICBAS, Universidade do Porto, 1989.
- 4 Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993; 4: 300-3.
- 5 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221-8.
- 6 Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.
- 7 Rosenberg RN and Fowler HL. Autosomal dominant motor system disease of the Portuguese: a review. *Neurology* 1981; 31: 1124-
- 8 Tuite PJ, Rogaeva EA, St George Hyslop PH, Lang AE. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol*, 1995 Oct, 38:4, 684-7.
- 9 Ishikawa K, Mizusawa H, Igarashi S, et al. Pure cerebellar ataxia phenotype in Machado-Joseph disease. *Neurology*, 1996 Jun, 46:6, 1776-7
- 10 Sakai T, Kawakami H. Machado-Joseph disease: A proposal of spastic paraplegic subtype. *Neurology*, 1996 Mar, 46:3, 846-7
- 11 van Schaik IN; Jöbsis GJ; Vermeulen M; Keizers H; Bolhuis PA; de Visser M. Machado-Joseph disease presenting as severe asymmetric proximal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1997 Oct, 63:4, 534-6
- 12 Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, et al. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Human Molec Genet* 1995; 4: 807-812.

- 13 Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al. Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1137-1146.
- 14 Silveira I, Coutinho P, Maciel P, et al. Molecular genetic studies in spinocerebellar ataxias: analysis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in patients from 48 Portuguese ataxia families *Am J Med Genet (Neuropsychiat Genet)* 1998; 81:134-138.
- 15 Barbeau A, Roy M, Cunha L, et al. The natural history of Machado-Joseph disease. *Can J Neurol Sci* 1984; 11: 510-525.
- 16 Coutinho P. *Doença de Machado-Joseph*. Porto: Laboratórios Bial, 1994.
- 17 Klockgether T, Lüdtke R, Kramer B, Abele M, Bürk K, Schöls L, Riess O, Laccone F, Boesch S, Lopes-Cendes I, Brice A, Inzelberg R, Zilber N and Dichgans. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 1998; 121: 589-600.

10. Legends

Figure 1 – The progression of dysarthria, dysfagia, fasciculations and sensitive loss, according to disease duration

Figure 2 – Progression of the neurological findings with incapacitation: (a) opthalmoparesis; (b) pyramidal findings; (c) fasciculations; and (d) dysfagia.

Figure 3 – Progression of the neurological findings with incapacitation: (a) nystagmus; (b) eyelid retraction; (c) optic atrophy; and (d) rigidity / bradykinesia.

Figure 1

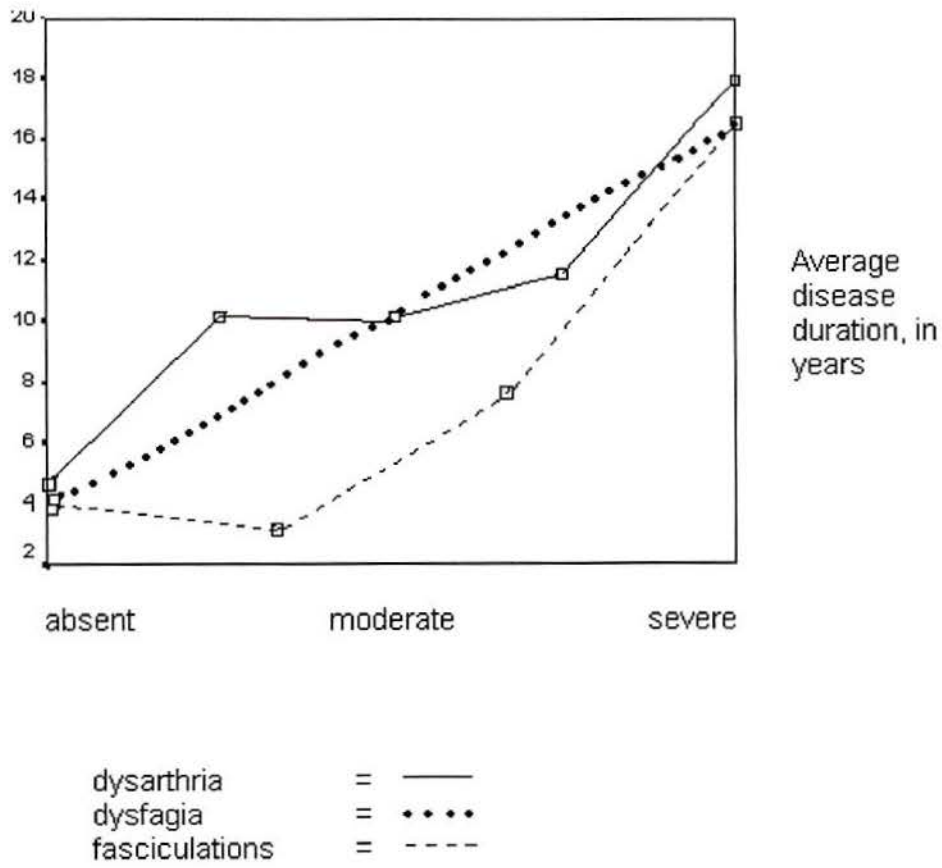


Figure 2

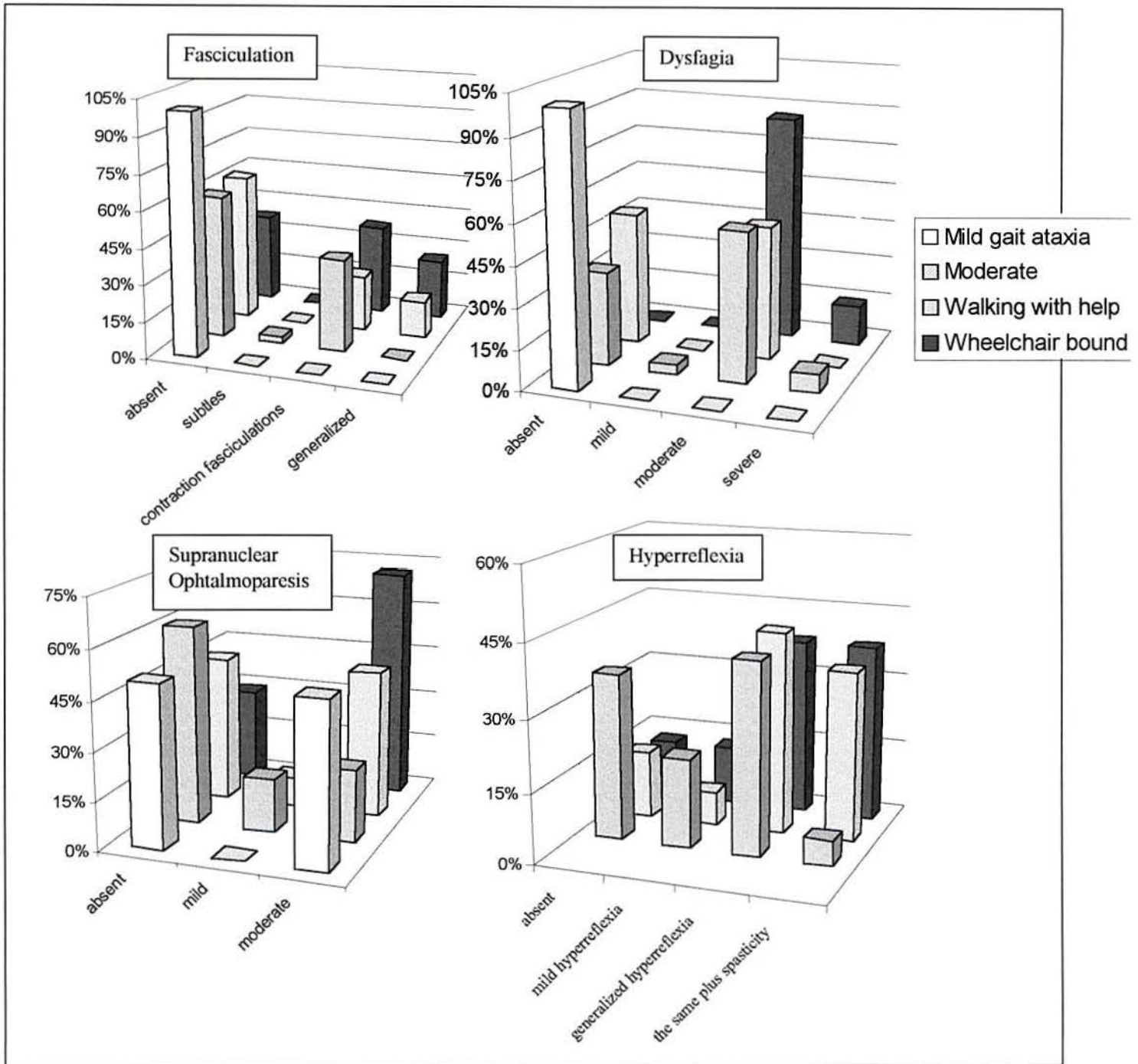
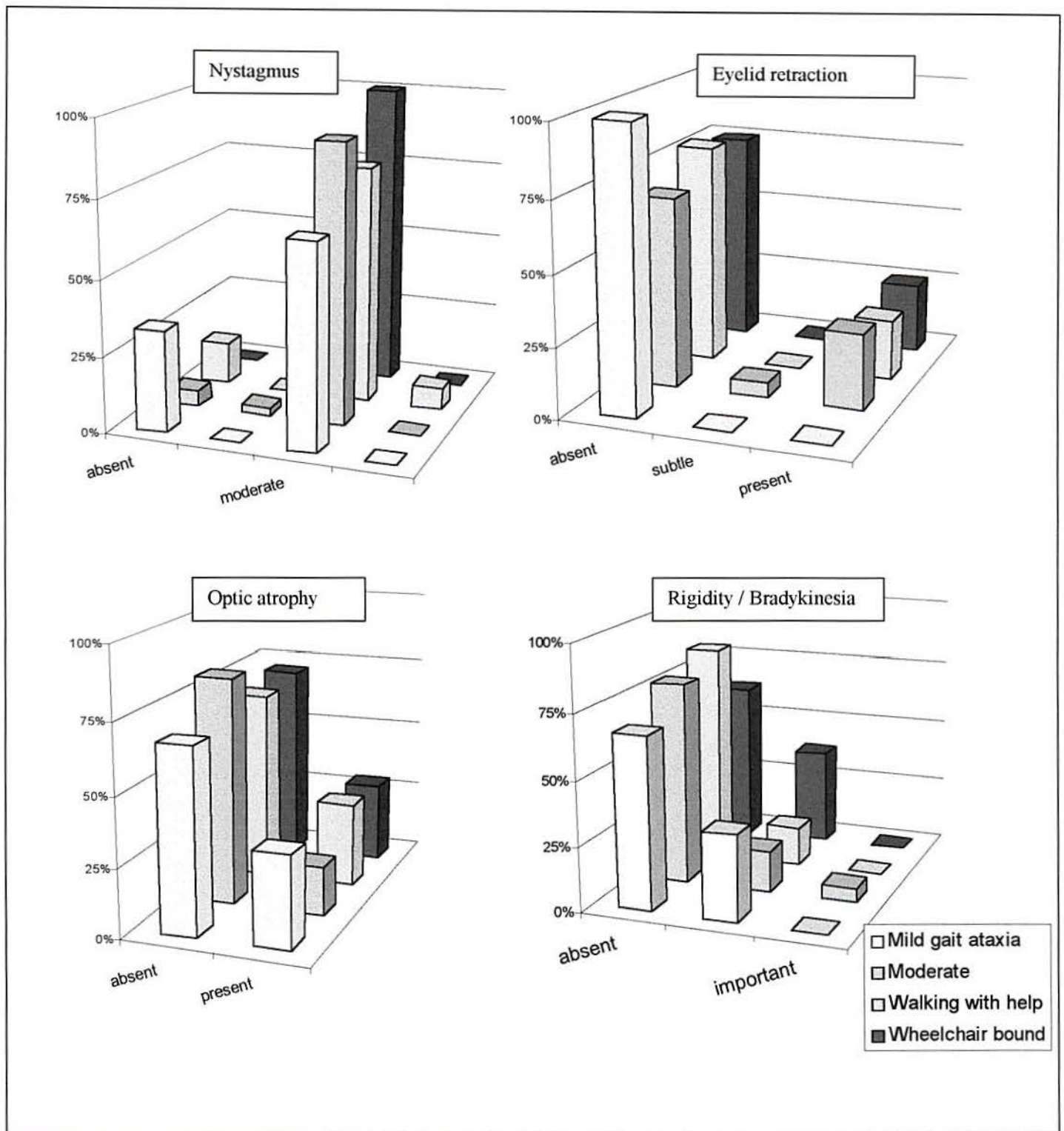


Figure 3



11. Tables

Table 1 – Clinical characteristics of the present sample

	Total	Type 1	Type 2	Type 3	Unclassified cases	Statistics
N	62	8	26	21	7	
Age at onset (mean \pm sd) (years)	32.1 \pm 11.9	15.2 \pm 2.1	33 \pm 11.3	37 \pm 7.4	26.8	Type 1 differs from others (p < 0.0001)
Men : women	32 : 30	5 : 3	14 : 12	10 : 11	3 : 4	
Disease duration (years)	9.8 \pm 6	5.37 \pm 3.4	8.4 \pm 5.7	11.6 \pm 5.8	15 \pm 5.6	Types 1 and 3, 1 and 4 are different (p < 0.05)
Anticipation (n = 60 parent-child pairs *) (years)	7.7 \pm 8.3					

* pairs in which the information was obtained

Table 2 – Neurological findings among MJD patients

Neurological finding	N	Relative frequency
Gait ataxia	62/62	100 %
Limb ataxia	58/62	93.5%
Nystagmus	57/62	92%
Dysarthria	53/62	85.5%
Pyramidal signs	46/62	74%
Sensitive loss	39/57	68.5%
Dysphagia	30/47	63.5%
Supranuclear ophtalmoplegia	26/61	52.5%
Nuclear ophtalmoplegia	6/61	
Fasciculations	25/61	41%
Eyelid retraction	17/62	27.4%
Dystonia	14/61	23%
Rigidity/bradykinesia	14/61	23%
Optic atrophy	13/57	22.8%

Table 3 – Degree of severity of each neurological sign

Neurological sign	Degree of severity	N	%
Gait ataxia	Absent	0	0
	Minimal – only while walking on toes, heels or in tandem	3	4.8
	Moderate – gait autonomy preserved	37	59.7
	Inability to walk without help	14	22.6
	Wheelchair bound or bedridden	8	12.9
Limb ataxia	Absent	4	6.4
	Minimal – one altered proof	14	22.5
	Moderate – two altered proofs	39	62
	Important – dysmetria, dysdiadocokinesia and rebound all present	5	8
Nystagmus	Absent	5	8
	On extreme gaze, or circular, after saccades	56	90.3
	Permanent	1	1.6
Progressive external ophtalmoplegia (PEO)	Absent	29	47.5
	Supranuclear (see text)	26	42.6
	Nuclear ophtalmoplegia with strabismus	6	10
Pyramidal findings	Absent	16	25.8
	Few brisk reflexes	10	16
	General hyperreflexia	25	40.3
	General hyperreflexia plus spasticity	11	17.7
	The former, plus paresis	0	0

Table 3 - continuation

Neurological sign	Degrees of severity	N	%
Dysarthria	Absent	9	14.7
	Mild	6	10
	Moderate	33	54
	Important	10	16.4
	Anarthria	3	5
Dysphagia	Absent	17	36
	Mild	27	57.5
	Important	3	6
Fasciculations	Absent	36	59
	Contraction fasciculation in the face	21	34.5
	Diffuse	4	6.5
Sensitive loss	Absent	18	31.5
	Reduction in the vibratory sense (less than 11 seconds in first toes)	4	7
	Reduction in vibratory and tactile/algescic senses	19	33
	Vibration felt only on ankles, and disability to discriminate tactile from algescic stimuli	16	28
Dystonia	Absent	47	77
	Mild, triggered by voluntary movements	9	15
	Moderate, triggered by voluntary movements	3	5
	Almost constant	2	3
Rigidity and bradykinesia	Absent	47	77
	Moderate	12	20
	Important	2	3
Eyelid retraction	Absent	45	72.5
	Present	17	27.5
Dystal amyotrophies	Absent	60	97
	Present	2	3
Optic atrophy	Absent	44	77.1
	Present	13	22.9

Table 4 – Associations found between neurological signs and disease duration, disease incapacitation (gait ataxia), clinical types, and CAG length

Sign	Does it get worse with the disease duration ? Test: linearity (ANOVA)	Does it worsen with ataxia progression (disease incapacitation)? Test: linear-by-linear association	Is its presence related to gender? Fisher's Exact Test	Is it related to some of clinical types? Fisher's Exact Test	Is it related to age of onset? ANOVA	Is its severity related to the CAG repeat length? Kruskal-Wallis test	Signs whose variable expressivity were not associated with any of the former reasons (or risk factors)
Gait ataxia	P<0.009	*	Ns	Ns	Ns	Ns	
Limb ataxia	Ns	P<0.037	Ns	Ns	Ns	Ns	
Nystagmus	Ns	Ns	P < 0.05 (see text)	Ns	Ns	Ns	+
Ophthalmoplegia	Ns	P<0.017	Ns	P<0.0002 (see text)	Ns	Nuclear and supranuclear: P< 0.013 Supranuclear only: Ns	
Eyelid retraction	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	+
Pyramidal syndrome	Ns	P<0.038	Ns	Ns	P<0.05	P<0.001	
Dysarthria	P<0.003	P<0.0001	Ns	Ns	P<0.01	Ns	
Dysfagia	P<0.014	P<0.043	Ns	Ns	Ns	Ns	

Table 4 - continuation

Sign	Does it get worse with the disease duration? Test: linearity (ANOVA)	Does it worsen with ataxia progression (disease incapacitation)? Test: linear-by-linear association	Is its presence related to gender? Fisher's Exact Test	Is it related to some of clinical types? Fisher's Exact Test	Is it related to age of onset? ANOVA	Is its severity related to the CAG repeat length? Kruskal-Wallis test	Signs whose variable expressivity were not associated with any of the former reasons (or risk factors)
Fasciculations	P<0.0001 P<0.05 if only type 3 is estimated	P<0.022	Ns	*	Ns	Ns	
Sensitive loss	P<0.02 Ns if type 3 patients are excluded	Ns	Ns	*	Ns	Ns	
Dystonia	Ns	Ns	Ns	*	P<0.01	P<0.002	
Rigidity and bradykinesia	Ns	Ns	Ns	Ns	P<0.01 (see text)	Ns	+ (?)
Optic atrophy	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	+

* Used as predictive variables; can not be used as outcome variables.

Table 5 – CAG repeat lengths in pyramidal and dystonic findings

Sign	Degree	N	CAG repeat length Mean (sd; range)	Significance
Pyramidal	Absent	16	73.4 (1.4 ; 71-76)	P<0.001 (Kruskal- Wallis test)
	Few brisk reflexes	10	75.3 (3.7 ; 69 - 83)	
	General hyperreflexia, only	22	76.2 (2 ; 73 - 81)	
	General hyperreflexia plus spasticity	8	78.5 (3.8 ; 73 - 85)	
Dystonia	Absent	43	74.7 (2.2 ; 69 -79)	P<0.002 (Kruskal- Wallis test)
	Mild, triggered by voluntary movements	7	79.6 (3.5 ; 74 - 85)	
	Moderate, triggered by voluntary movements	3	77.7 (5 ; 73 - 83)	
	Almost constant	2	78 (1.4 ; 77 - 79)	

Manifestações neurológicas na doença de Machado-Joseph: a sua relação com a duração da doença, com os tipos clínicos e com o tamanho da expansão CAG

(Versão em português do artigo:

“Neurological findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes and (CAG)_n”)

1. Resumo

Contexto: A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma degeneração espinocerebelar autossômica dominante causada por uma repetição CAG expandida, localizada no cromossomo 14q32.1. Trata-se de uma doença bastante heterogênea nas suas manifestações clínicas. As razões para a grande variabilidade neurológica dessa condição são ainda pouco conhecidas.

Objetivo: O presente trabalho tenta explicar parte da heterogeneidade da DMJ através da associação dos seus achados neurológicos com as seguintes variáveis: duração da doença, idade de início, sexo, tipo clínico e tamanho da repetição CAG.

Delineamento: estudo de casos. **Setting:** atendimento ambulatorial em hospital de referência. **Pacientes:** uma amostra consecutiva de 62 pacientes com DMJ. **Principal desfecho medido:** os achados neurológicos.

Resultados: Encontrou-se uma relação direta entre a duração da doença e a gravidade da ataxia axial e apendicular, da disartria, da disfagia, das fasciculações, da síndrome piramidal e da oftalmoplegia ($p < 0.02$). As formas mais graves da oftalmoplegia nuclear foram associadas com a DMJ tipo 1, enquanto as mais graves oftalmoparesias supranucleares foram associadas com o tipo 3 ($p < 0.0002$). Também se viu que os maiores comprimentos das repetições CAG associaram-se com as formas mais importantes da distonia e da síndrome piramidal ($p < 0.002$). A presença e/ou a gravidade do nistagmo, da retração palpebral, da rigidez/bradicinesia e da atrofia óptica não se relacionaram com nenhuma das variáveis preditivas em estudo.

Conclusões: Enquanto diversas manifestações neurológicas foram associadas à duração da doença, ao tipo clínico ou ao tamanho da repetição CAG, não se conseguiu atribuir a presença do nistagmo, da retração palpebral, da rigidez/bradicinesia e da

atrofia óptica a qualquer razão (ou variável) conhecida.

Palavras-chave: doença de Machado-Joseph , ataxias espinocerebelares, repetições CAG.

2. Introdução

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma degeneração multissistêmica do sistema nervoso central, herdada como uma doença autossômica dominante (1). Trata-se de uma doença muito incapacitante: em geral, os pacientes tornam-se confinados a uma cadeira de rodas ou mesmo ao leito, com o passar do tempo. As manifestações da doença usualmente começam na vida adulta, com uma idade de início média (\pm dp) de 32 (\pm 12) anos, entre pacientes brasileiros (experiência dos autores, submetida à publicação) a 37 (\pm 14) anos, entre pacientes de ascendência portuguesa e açoriana (2). A idade de início varia muito, entre 5 e 73 anos (2). A penetrância é alta mas é incompleta, pois existem raros portadores da mutação ainda assintomáticos aos 90 anos (3). O tempo médio de sobrevivência depois da doença se iniciar é de 14 a 17 anos (2).

O gene associado à DMJ localiza-se no cromossomo 14q32.1 (4) e contém um motivo repetitivo CAG na região 5' do exon 2: essa seqüência está expandida nos pacientes com DMJ (5). Os alelos normais contêm 12 a 37 repetições, enquanto os alelos expandidos contêm 66 a 84 repetições.

A extensa gama de manifestações clínicas inclui: uma ataxia cerebelar, que afeta a marcha, os movimentos apendiculares, a articulação da fala e a deglutição; uma síndrome piramidal, com hiperreflexia, sinal de Babinski e espasticidade; uma oftalmoplegia externa progressiva (PEO), especialmente do movimento ocular para cima e da convergência, e, menos freqüentemente, uma oftalmoplegia nuclear; sinais extrapiramidais, incluindo distonia, rigidez e bradicinesia; uma doença do neurônio

motor inferior, com fasciculações e amiotrofia; alterações sensoriais; retração palpebral, fasciculações de intenção (ou de contração), perda de peso e distúrbios do sono (2).

É consenso que a DMJ possa se apresentar sob 3 diferentes tipos clínicos (1): o tipo 1, no qual os pacientes têm um início precoce e um curso clínico mais grave, com movimentos distônicos, sinais piramidais mais importantes, PEO e ataxia axial e apendicular; o tipo 2, com uma idade de início mais intermediária, no qual os pacientes apresentam déficits cerebelares, piramidais e de movimento ocular; e o tipo 3, no qual os pacientes têm um início mais tardio e um curso talvez mais benigno, com muito mais envolvimento periférico, com ataxia associada ou não ao piramidalismo e à PEO. Além desses bem conhecidos fenótipos, outras variantes têm sido descritas ao longo dos anos (7, 8, 9, 10, 11). A grande variabilidade na idade de início, os achados neurológicos complexos e heterogêneos, assim como a própria existência de 3 fenótipos, são evidências de que a DMJ, embora causada por um gene principal, seja modulada por fatores modificadores.

O primeiro e mais estudado fator modificador foi o próprio comprimento da repetição CAG. Demonstrou-se que o tamanho da repetição é inversamente proporcional à idade de início e que esse tamanho também se relaciona com a determinação do tipo 1 (6, 12, 13). Não obstante, o número das repetições CAG explica apenas parcialmente essas duas variáveis do fenótipo.

Por outro lado, as diversas apresentações neurológicas poderiam, em certa medida, ser

devidas a diferenças na duração da doença. É possível que alguns achados estejam presentes em um e não em outro paciente, porque o primeiro está doente há mais tempo do que o segundo. Se assim fosse, seria um erro atribuir as diferenças existentes entre os doentes à sua diversidade genética ou ambiental.

O principal objetivo do presente trabalho foi o de contribuir para se reconhecer quais seriam os achados neurológicos devidos (a) à duração da doença, (b) ao sexo, (c) a um dos 3 tipos clínicos, (d) à idade de início, (e) ao tamanho da repetição CAG e (f) quais seriam os achados neurológicos independentes de todos os fatores anteriores, tendo-se em mente que esses últimos poderiam ser vistos como marcadores neurológicos de algum fator modificador desconhecido.

3. População

Sessenta e dois pacientes com DMJ foram recrutados a partir de uma série de pacientes com SCAs, diagnosticados por análise molecular da mutação específica (experiência dos autores, submetida à publicação). Todos os pacientes se originaram do Estado mais meridional do Brasil. Esses 62 pacientes pertenciam a 34 famílias: a origem das mesmas era portuguesa em 31 delas, afro-brasileira em 2 delas e alemã em uma única.

Os dados clínicos, tais como a distribuição da idade de início e do sexo, estão resumidos na Tabela 1 e foram extensamente comentados em outro lugar (experiência dos autores, submetida à publicação).

4. Métodos

Todos os pacientes foram entrevistados e examinados pela mesma médica (LBJ). Um protocolo padrão incluiu a determinação da idade de início, da duração da doença e do sintoma de apresentação, além de um exame neurológico padrão. O início da doença foi considerado como a época na qual o paciente ou um familiar próximo passaram a notar a doença no probando.

Os pacientes foram classificados nos 3 tipos clínicos de acordo com as manifestações neurológicas, como já foi descrito. Porém, a idade de início não foi usada como critério de classificação.

A expansão MJD1 foi analisada de acordo com condições previamente descritas na literatura (14).

Os dados das histórias clínicas, dos heredogramas, dos exames neurológicos e das análises moleculares foram analisados usando-se o SPSS for Windows ®.

Os pacientes foram analisados de acordo com a presença e a gravidade de diversos achados neurológicos. Para se descobrir quais manifestações neurológicas seriam atribuíveis à passagem do tempo, usou-se a análise de variância com seu teste de tendência linear. Uma vez que a “duração da doença” poderia ser criticada por seu caráter subjetivo, os pacientes também foram divididos de acordo com os seus graus de incapacidade. A incapacidade foi medida através da gravidade da ataxia axial, como se segue: (a) “ataxia sutil” de marcha, observada quando o doente caminhava

sobre os artelhos ou os calcânhares ou em pé ante pé; (b) “ataxia moderada”, visível na marcha espontânea, mas com independência ainda presente; (c) “marcha com apoio”, no caso dela ser possível apenas com auxílio, e (d) necessidade de “cadeira de rodas”, no caso de a marcha ser totalmente impossível. As diferenças entre os níveis de incapacidade acima descritos e os outros achados neurológicos foram então avaliadas por associação linear (teste Qui-quadrado de Mantel-Haerzel). À respeito dos três tipos clínicos, as diferenças na distribuição dos achados neurológicos entre eles foi avaliada pelo teste exato de Fisher. A relação da idade de início com esses achados neurológicos foi testada pela ANOVA, enquanto a do sexo do doente foi testada pelo exato de Fisher. Finalmente, a relação do tamanho da repetição CAG com os achados neurológicos foi medida ou pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis, pois a distribuição dos tamanhos das CAGs não foi normal.

5. Resultados

A ataxia de marcha foi o sintoma inicial em todos os pacientes. A Tabela 2 descreve os sinais neurológicos encontrados no total da amostra.

Encontramos 8 pacientes com DMJ tipo 1 (13%), 26 com o tipo 2 (42%) e 21 com o tipo 3 (34%). As suas idades de início médias foram compatíveis com as descritas pela literatura (Tabela 1). Entretanto, não foi possível se classificar 7 casos (11%), pela razão de que eles apresentavam ao mesmo tempo achados extrapiramidais e periféricos graves. Esses pacientes foram chamados de “inclassificáveis”. Como se tratava dos casos de mais longa duração, é possível que essa dificuldade em classificá-los refletisse o fato de que os mesmos já se encontrassem em estágios muito avançados da doença (Tabela 1).

Diversos achados neurológicos foram classificados de acordo com sua gravidade (Tabela 3). A amiotrofia foi raras vezes observada – somente ocorreu em 2 dos 62 pacientes. Na verdade, um bom trofismo muscular foi visto em 15 pacientes, muito embora vários deles já estivessem bastante incapacitados.

5.1 Quais achados neurológicos pioram com o tempo?

5.1.1 Duração da doença

A ataxia de marcha, a disartria, a disfagia e as fasciculações pioraram com a passagem do tempo ($p < 0,02$, ou ainda menos) (Figura 1, Tabela 4). O mesmo não aconteceu com

o nistagmo, a síndrome piramidal, a ataxia apendicular, a oftalmoplegia, a distonia, a rigidez/bradicinesia, a retração palpebral e a atrofia óptica (Tabela 4).

Como as fasciculações são um marcador da DMJ tipo 3, observou-se se a sua relação com o tempo se confirmava, quando apenas os doentes com o tipo 3 eram examinados, o que de fato aconteceu ($p < 0,05$, Tabela 4).

5.1.2 Graus de incapacidade

Ao menos duas objeções poderiam ser levantadas contra o uso da duração da doença como uma medida da sua progressão. A primeira é a de que se trata de uma informação subjetiva, propensa a equívocos de recordação. A segunda é a de que o tempo biológico, tal como acontece com o envelhecimento, não é o mesmo para todo mundo. Por essas razões, escolhemos uma variável neurológica, a ataxia de marcha, como um marcador da evolução clínica. A ataxia de marcha foi o sintoma inicial em todos os pacientes, foi a queixa principal e também apresentou uma forte associação linear com o tempo da doença.

O grau de cada sintoma foi então comparado nos pacientes divididos de acordo com os quatro estágios de incapacidade (Figuras 2 e 3). O raciocínio foi o de que, se houvesse uma relação entre a progressão de um achado e a evolução da doença, haveria também uma associação linear entre a piora do achado e a progressão da incapacidade.

A ataxia apendicular, a síndrome piramidal, a disartria, a disfagia, a oftalmoplegia e as

fasciculações todas pioraram junto com a piora da incapacidade (a ataxia de marcha) (Figura 2, Tabela 4). O mesmo não aconteceu com o nistagmo, a retração palpebral, a perda sensorial, a distonia, a rigidez/bradicinesia e a atrofia óptica (Figura 3, Tabela 4).

5.2 Há manifestações neurológicas associadas ao sexo?

Procurou-se observar se a presença de algum achado neurológico era mais freqüente em um sexo do que no outro. Entre os pacientes, havia 30 homens e 32 mulheres. O nistagmo estava presente em todas as 32 mulheres, enquanto 5 dos 30 homens não o apresentavam, e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$, teste exato de Fisher) (Tabela 4).

5.3 Quais achados neurológicos estão associados aos tipos clássicos?

É bem sabido que alguns sinais neurológicos definem os 3 tipos clássicos – as posturas distônicas e a espasticidade importantes definem o tipo 1 e a doença do neurônio motor inferior e a perda sensorial importantes, o tipo 3. Talvez fosse útil se saber como os demais achados se distribuem, entre esses tipos.

Quando a distribuição dos achados neurológicos (outros que os definidores) foi analisada entre os 3 tipos, viu-se que ela era homogênea para a maioria dos sinais (Tabela 4). Apenas um deles se comportou de modo diferente: a gravidade da oftalmoplegia, nas suas duas formas – a nuclear e a supranuclear ($p < 0.0002$). As formas mais graves da oftalmoplegia supranuclear – manifesta por uma aparente lesão

do fascículo longitudinal medial, ou por uma limitação da convergência ou do movimento ocular para cima (ver também Tabela 3) - foram mais frequentes entre os pacientes com DMJ tipo 3. A oftalmoplegia nuclear, em geral devida à paralisia do nervo abducente – foi mais comum nos pacientes com DMJ tipo 1 e nos pacientes inclassificáveis.

5.4 Há manifestações neurológicas que dependam da idade de início?

Se algumas populações de neurônios fossem mais propensas ao processo patológico da DMJ em certos períodos cronológicos da vida adulta, seria então possível se associar os seus sinais clínicos à idade de início da doença. Nessa hipotética relação de causa e efeito, a duração da doença poderia nos confundir, uma vez que, quanto mais a doença durasse em determinado paciente, mais chances um sinal clínico teria de aparecer no quadro geral. Para se avaliar a possível relação entre os sinais neurológicos e a idade de início, então, deveríamos selecionar para investigação somente pessoas doentes há pouco tempo – no caso, escolhemos indivíduos doentes há no máximo cinco anos. Dezoito pacientes satisfizeram essa condição: sua idade de início média foi de 27,3 anos (variação: de 12 a 47 anos), portanto, menor do que a média de início da amostra total. Resultou que quatro achados foram mais presentes e mais graves, quanto mais precoce tivesse se iniciado a doença: foram a síndrome piramidal, a disartria, as posturas distônicas e a rigidez/bradicinesia (p de 0,05 para a primeira e de 0,01, para as demais; ANOVA). Por exemplo: os 14 pacientes sem rigidez/bradicinesia adoeceram, em média, aos 30 anos de idade, enquanto os 4 com esse achado adoeceram, em média, aos 17 anos. Embora esses achados tenham encontrado significância estatística, eles devem ser interpretados com cuidado, pois se

baseiam em um número muito pequeno de casos.

5.5 Quais achados neurológicos se relacionaram com o tamanho das repetições CAG?

Procurou-se, finalmente, relacionar a gravidade das manifestações neurológicas com o tamanho das seqüências repetitivas CAG no *locus* MJD1 (Tabela 4). Viu-se que o tamanho das seqüências CAG foi diretamente proporcional à gravidade da síndrome piramidal e da distonia (Tabela 5).

6. Discussão

A heterogeneidade clínica é uma das mais intrigantes características das SCAs em geral e da DMJ em particular. A expressividade variável, manifesta na idade de início, nos achados neurológicos e na própria existência de 3 fenótipos, pode ser entendida como uma evidência indireta da existência de fatores modificadores.

Por outro lado, não se sabe até que ponto a heterogeneidade clínica da DMJ é devida à história natural da doença. Um estudo prospectivo seria, inquestionavelmente, a melhor maneira de se abordar o problema. Esse tipo de estudo já foi parcialmente realizado (16), porém, como o mesmo foi feito antes das recentes descobertas moleculares, um estudo realmente abrangente continua faltando. Nós tentamos ultrapassar essa dificuldade, procurando encontrar associações entre a gravidade dos achados clínicos e o tempo de evolução do quadro, de duas maneiras: pela duração direta da doença (ou tempo cronológico) e pelo grau de deterioração (ou tempo biológico), medido através do nível de ataxia axial.

A duração da doença foi a aparente responsável pela progressão da ataxia axial, da disartria, da disfagia e das fasciculações.

A gravidade dos outros sinais não se relacionou, a princípio, com o tempo. Nós tentamos, então, confirmar esse achado negativo com a segunda forma de observação, a ataxia de marcha tendo sido escolhida como a medida da progressão da doença, ou de sua incapacitação.

Nós praticamente obtivemos, então, os mesmos resultados do teste anterior (Tabela 4), o que quer dizer que, de novo, a gravidade ou presença do nistagmo, da retração palpebral, das posturas distônicas, da rigidez/bradicinesia e da atrofia óptica foram independentes da progressão temporal.

Outras razões além da progressão da doença devem, então, explicar a presença ou a gravidade daqueles achados (nistagmo, retração palpebral, posturas distônicas, perdas sensoriais, rigidez/bradicinesia e atrofia óptica), sejam elas ambientais ou genéticas. Essas razões podem ser, por exemplo, as mesmas que determinam os tipos clínicos, ou podem ser outras. Para testar essa hipótese, a gravidade dos achados neurológicos foi então cruzada com os tipos clínicos, com a idade de início, com o sexo e com o tamanho da expansão CAG.

Nenhuma associação foi encontrada entre os tipos clínicos e a gravidade da quase totalidade dos sinais investigados, tanto os dependentes como os independentes do tempo de evolução – as exceções foram as formas de oftalmoplegia, que serão comentadas mais tarde, e a perda sensorial, que só se relacionou ao tipo clínico (no caso, o tipo 3).

A tentativa de se associar os diversos sinais neurológicos à idade de início foi impedida, no presente estudo, pelo número reduzido de indivíduos com doença de curta duração. A sugestão de que exista uma relação da idade de início com o aparecimento da rigidez/bradicinesia poderia ser confirmada em um estudo de maiores proporções. Nós também preferimos usar da mesma precaução ao interpretar os resultados que associaram o nistagmo ao sexo, pois estes se basearam em números

bastante reduzidos.

Finalmente, o tamanho da seqüência repetitiva CAG também não explicou a presença do nistagmo, da retração palpebral, da rigidez/bradicinesia e da atrofia óptica. Assim, podemos afirmar que a heterogeneidade desses quatro achados não encontrou explicação: não foi devida à progressão temporal, nem aos tipos clínicos, nem às repetições CAG.

Outros aspectos devem ser mencionados. O primeiro deles é a associação entre as duas formas de oftalmoplegia – nuclear e supranuclear – e os tipos clínicos. A oftalmoplegia supranuclear foi mais grave entre os pacientes com DMJ tipo 3, enquanto o envolvimento nuclear foi mais intenso entre os com tipo 1 e inclassificáveis. A oftalmoplegia nuclear também se associou aos tratos repetitivos CAG mais compridos. Como os mesmos estão relacionados à determinação do tipo 1, essa coincidência confirma o achado anterior.

O segundo comentário diz respeito aos achados clínicos que foram exclusivamente devidos à progressão temporal: isso aconteceu com a ataxia axial, a ataxia apendicular e a disartria.

O terceiro comentário diz respeito à síndrome piramidal: a sua gravidade foi diretamente proporcional ao tamanho das repetições CAG, mas não diferiu entre os três tipos clínicos, enquanto esperávamos que os pacientes com tipo 1 tivessem os achados piramidais mais intensos. Essa ausência de significação estatística foi possivelmente devida ao número pequeno de casos com o tipo 1 da doença.

Os nossos resultados positivos, relacionados ao tempo de doença, quase reproduzem os de Barbeau e colaboradores (15) e os de Paula Coutinho (16). O mesmo não se pode dizer sobre os outros resultados, principalmente por causa das diferenças na maneira como o exame neurológico foi medido no presente estudo e naqueles, e também por causa da falta de estudos moleculares nos trabalhos anteriores. Barbeau e colaboradores haviam mencionado que o nistagmo, quando presente em seus pacientes, não parecia ser progressivo. Infelizmente, aqueles autores não fizeram menção à retração palpebral, à atrofia óptica e à rigidez/bradicinesia (15). Coutinho acompanhou 67 pacientes durante 3,5 anos, em média, e teve resultados relacionados à duração da doença semelhantes aos nossos, salvo a síndrome piramidal. Ela também notou que a retração palpebral não piorava com a passagem do tempo, em seus doentes (16). Um terceiro estudo descreveu as relações entre alguns parâmetros da história natural da DMJ (17). Entre os seus resultados, descobriu-se que o tamanho da repetição CAG aumentava a velocidade da progressão da doença (medida pela gravidade da ataxia axial), enquanto a idade de início não o fazia. Nossos resultados concordam com o último mas não com o primeiro desses achados.

Em resumo, o presente estudo revelou que uma série de sinais neurológicos foram devidos à progressão temporal da doença, ao tipo clínico ou ao tamanho das seqüências repetitivas CAG. O nistagmo, a retração palpebral, a rigidez/bradicinesia e a atrofia óptica não puderam, entretanto, ser atribuídos a nenhuma razão conhecida. Nós levantamos a hipótese de que eles sejam causados por um fator modificador ainda ignorado.

Também esperamos, como Barbeau e colaboradores já haviam dito (15), que os presentes achados “sejam confrontados com a observação real dos doentes ao longo do tempo”, no futuro.

7. Agradecimentos

Esse trabalho foi realizado, em parte, graças ao apoio da FAPERGS.

8. Revisão estatística

Bernardo Lessa Horta, MD, PhD, Escola de Medicina e de Psicologia, Universidade Católica de Pelotas.

10. Legendas

Figura 1 – A progressão da disartria, da disfagia e das fasciculações de acordo com a duração da doença.

Figura 2 – A maneira como alguns dos achados neurológicos pioraram com a progressão da doença: (a) oftalmoparesias, (b) achados piramidais, (c) fasciculações e (d) disfagia.

Figura 3 – A maneira como alguns dos achados neurológicos não se modificaram com a progressão da doença: (a) nistagmo, (b) retração palpebral, (c) atrofia óptica e (d) rigidez/bradicinesia.

11. Tabelas

Tabela 1 – Características clínicas da amostra estudada

	Total	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Casos inclassi- ficáveis	Estatís- ticas
N	62	8	26	21	7	
Idade de início (média ± dp) (anos)	32.1 ± 11.9	15.2 ± 2.1	33 ± 11.3	37 ± 7.4	26.8	O tipo 1 diferiu dos demais (p < 0.0001)
Homens : mulheres	32 : 30	5 : 3	14 : 12	10 : 11	3 : 4	
Duração da doença (anos)	9.8 ± 6	5.37 ± 3.4	8.4 ± 5.7	11.6 ± 5.8	15 ± 5.6	Os tipos 1 e 3, e 1 e 4 foram diferen- tes entre si (p < 0.05)
Antecipação (n = 60) (anos)	7.7 ± 8.3					

Tabela 2 – Achados neurológicos gerais

Achados neurológicos	N	Frequência relativa
Ataxia axial	62/62	100 %
Ataxia apendicular	58/62	93.5%
Nistagmo	57/62	92%
Disartria	53/62	85.5%
Sinais piramidais	46/62	74%
Perdas sensoriais	39/57	68.5%
Disfagia	30/47	63.5%
Oftalmoplegia supranuclear	26/61	52.5%
Oftalmoplegia nuclear	6/61	
Fasciculações	25/61	41%
Retração palpebral	17/62	27.4%
Distonia	14/61	23%
Rigidez/bradicinesia	14/61	23%
Atrofia óptica	13/57	22.8%

Tabela 3 – A gravidade de cada sinal neurológico estudado na presente amostra

Achado neurológico	Gravidade	N	%
Ataxia axial	Ausente	0	0
	Mínima – somente observada na marcha sobre os artelhos, ou sobre os calcanhares, ou em tandem	3	4.8
	Moderada – visível na marcha espontânea; independência preservada	37	59.7
	Incapacidade de caminhar sem apoio	14	22.6
	Locomoção restrita à cadeira de rodas	8	12.9
Ataxia apendicular	Ausente	4	6.4
	Mínima – uma prova alterada	14	22.5
	Moderada – duas provas alteradas	39	62
	Importante – dismetria, disdiadocokinesia e rebote, todos presentes	5	8
Nistagmo	Ausente	5	8
	Ao olhar extremo lateral; ou circular, depois das sacadas	56	90.3
	Permanente	1	1.6
Oftalmoplegia externa progressiva (PEO)	Ausente	29	47.5
	Supranuclear, sugerindo lesão do fascículo longitudinal medial; ou ainda limitação do olhar vertical e da convergência	26	42.6
	Oftalmoplegia nuclear, com estrabismo	6	10
Sinais piramidais	Ausentes	16	25.8
	Uns poucos reflexos patológicos	10	16
	Hiperreflexia difusa, apenas	25	40.3
	Hiperreflexia difusa mais espasticidade	11	17.7
	O anterior mais paresia	0	0

Tabela 3 - continuação

Achado neurológico	Gravidade	N	%
Disartria	Ausente	9	14.7
	Leve	6	10
	Moderada	33	54
	Importante	10	16.4
	Anartria	3	5
Disfagia	Ausente	17	36
	Leve	27	57.5
	Importante	3	6
Fasciculações	Ausentes	36	59
	Fasciculações de contração, na face	21	34.5
	Difusas	4	6.5
Perdas sensoriais	Ausentes	18	31.5
	Redução da sensibilidade vibratória (menos de 11 segundos nos 1º artelhos)	4	7
	Redução nas sensibilidades vibratória e tátil/algésica	19	33
	Vibração percebida apenas a partir dos tornozelos, e incapacidade de discriminar estímulos táteis dos algésicos	16	28
Distonia	Ausente	47	77
	Leve, desencadeada pelo movimento voluntário	9	15
	Moderada, desencadeada pelo movimento voluntário	3	5
	Quase constante	2	3
Rigididez e bradicinesia	Ausente	47	77
	Moderada	12	20
	Importante	2	3
Retração palpebral	Ausente	45	72.5
	Presente	17	27.5
Amiotrofias distais	Ausentes	60	97
	Presentes	2	3
Atrofia óptica	Ausente	44	77.1
	Presente	13	22.9

Tabela 4 – As associações encontradas entre os achados neurológicos e a duração da doença, a incapacitação (ataxia de marcha), os tipos clínicos e os tamanhos das repetições CAG

Sinal	Piora com a duração da doença ?	Piora com a progressão da ataxia (incapacitação)?	Está relacionado ao sexo?	Está relacionado aos tipos clínicos?	Está relacionado à idade de início?	Está relacionado ao tamanho das repetições CAG?	Sinais cuja variabilidade não foi associada com nenhum dos fatores anteriores
	Teste: linearidade (ANOVA)	Teste: Associação linear	Teste exato de Fisher	Teste exato de Fisher	ANOVA	Kruskal-Wallis	
Ataxia de marcha	P<0.009	*	Ns	Ns	Ns	Ns	
Ataxia apendicular	Ns	P<0.037	Ns	Ns	Ns	Ns	
Nistagmo	Ns	Ns	P < 0.05 (ver texto)	Ns	Ns	Ns	+ (?)
Oftalmoplegias	Ns	P<0.017	Ns	P<0.0002 (ver texto)	Ns	Nuclear e Supra-nuclear: P< 0.013 Supra-nuclear apenas: Ns	
Retração palpebral	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	+
Síndrome piramidal	Ns	P<0.038	Ns	Ns	P<0.05	P<0.001	
Disartria	P<0.003	P<0.0001	Ns	Ns	P<0.01	Ns	
Disfagia	P<0.014	P<0.043	Ns	Ns	Ns	Ns	

Tabela 4 - continuação

Sinal	Piora com a duração da doença ?	Piora com a progressão da ataxia (incapacitação)?	Está relacionado ao sexo?	Está relacionado aos tipos clínicos?	Está relacionado à idade de início?	Está relacionado ao tamanho das repetições CAG?	Sinais cuja variabilidade não foi associada com nenhum dos fatores anteriores
	Teste: linearidade (ANOVA)	Teste: Associação linear	Teste exato de Fisher	Teste exato de Fisher	ANOVA	Kruskal-Wallis	
Fasciculações	P<0.0001 P<0.05 se somente os pacientes com tipo 3 são testados	P<0.022	Ns	*	Ns	Ns	
Perda sensorial	Ns	Ns	Ns	*	Ns	Ns	
Distonia	Ns	Ns	Ns	*	P<0.01	P<0.002	
Rigidez e bradicinesia	Ns	Ns	Ns	Ns	P<0.01 (ver texto)	Ns	+ (?)
Atrofia óptica	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	+

*: Usados como variáveis preditivas; não podem ser testadas como desfechos

Tabela 5 – A distribuição dos tamanhos das repetições CAG de acordo com a gravidade de dois achados neurológicos

Sinal	Gravidade	N	Tamanho da repetição CAG Média (dp; variação)	Significância
Piramidalismo	Ausente	16	73.4 (1.4 ; 71-76)	P<0.001 (Kruskal-Wallis)
	Poucos reflexos patológicos	10	75.3 (3.7 ; 69 - 83)	
	Hiperreflexia difusa, apenas	22	76.2 (2 ; 73 - 81)	
	Hiperreflexia difusa mais espasticidade	8	78.5 (3.8 ; 73 - 85)	
Distonia	Ausente	43	74.7 (2.2 ; 69 -79)	P<0.002 (Kruskal-Wallis)
	Leve, desencadeada pelo movimento voluntário	7	79.6 (3.5 ; 74 - 85)	
	Moderada, desencadeada pelo movimento voluntário	3	77.7 (5 ; 73 - 83)	
	Quase constante	2	78 (1.4 ; 77 - 79)	

6.7 Artigo 4

Searching for modifier factors of the Machado-Joseph disease phenotype: a study on SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts

Laura Jardim ^{1,2}, Isabel Silveira ⁵, Maria Luiza Pereira ^{1,3}, Maria do Céu Moreira ⁵, Pedro Mendonça ⁵, Jorge Sequeiros ⁵ and Roberto Giugliani ^{1,4}

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departments of ² Internal Medicine, ³ Biochemistry and ⁴ Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and ⁵ UnIGENE, Instituto de Biologia Molecular e Celular; and ICBAS, Universidade do Porto, Portugal.

Address correspondence to:

Laura B. Jardim

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, Brazil

Phone + 55 51 316 8011, Fax + 55 51 316 8010

e-mail laurajardim@terra.com.br

1. Abstract

Context: Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant cerebellar ataxia of adult onset with an heterogeneous clinical picture. The variability in age at onset, the complex and heterogeneous neurological findings, as well as the existence of three phenotypes, indicates that MJD, caused by a major gene, is modulated by modifier factors.

Objective: To study if the polymorphic CAG repeats at other *loci* (namely, SCA2, SCA6 and DRPLA) thus acted as modifier factors of this disease.

Design: survey. **Setting:** ambulatory care in a referral center. **Patients:** a convenience sample of 39 patients with MJD. **Main outcome measures:** age of onset, anticipation, clinical types and neurological findings.

Results: Rigidity/bradykinesia was associated with the CAG repeat length of the larger SCA6 allele ($p < 0.05$). Fasciculations were directly correlated with CAG repeat length of the large SCA2 allele ($\rho = 0.507$, Spearman correlation coefficient, $p < 0.01$). Sensitive loss was also directly correlated with CAG repeat length of both SCA2 alleles ($\rho = 0.555$, Spearman correlation coefficient, $p < 0.02$). Other measures (age of onset, anticipation, clinical types and other neurological signs) were not associated with CAG repeat length of SCA2, SCA6 and DRPLA genes.

Conclusions: These results were based on a limited sample and the positive findings could be due to small differences in CAG lengths. They need further observation to confirm or reject them in the future.

Key words: Machado-Joseph disease, spinocerebellar ataxias, CAG expansions.

2. Introduction

Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant cerebellar ataxia of adulthood with an heterogeneous clinical picture (Coutinho and Andrade, 1978) (1). The mutation associated with this disorder is the expansion of a (CAG)_n tract in the coding region of the MJD1 gene (Kawaguchi et al, 1994) (2). Normal chromosomes contain 12 to 41 CAG repeats, whereas disease causing chromosomes contain 61 to 86 repeats (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (3, 4).

A well accepted classification of MJD divides patients into three phenotypes (Coutinho and Andrade, 1978; Sequeiros and Coutinho, 1993) (1, 5). Cerebellar ataxia and progressive external ophthalmoplegia are common to all types. Type 1 has an earlier onset, usually around 15 to 20 years, and is characterised by marked pyramidal signs and dystonic posturing. Type 2, the most common, starts most often around 30 to 37 years, and is almost limited to the cerebellar and ocular signs. Type 3 is later in onset, between 37 and 47 years, and progresses with lower motor neuron signs and peripheral neuropathy (Sequeiros and Coutinho, 1993; Jardim et al, 2000a) (5, 6).

The variability in age at onset, the complex and heterogeneous neurological findings, as well as the existence of three clinical types, indicate that MJD, caused by a major gene, is modulated by modifier factors. Several mechanisms responsible for phenotypic variation can be postulated: (a) the variable CAG repeat length; (b) flanking and intragenic polymorphisms in the disease *locus*; (c) variations in the normal allele; (d) imprinting; (e) somatic mosaicism; (f) modifying genes; (g) environmental factors (Junck and Fink, 1996) (7); and (h) observational biases, if

some variation would be due to a non-controlled disease duration, for example (Jardim et al, 2000b) (8).

The first and better studied factor was the CAG repeat length itself. Age of onset has been shown to be negatively correlated with the number of CAG repeats, a correlation ranging from -0.87 to -0.67 in several studies (Kawaguchi et al, 1994; Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; o nosso 1-B) (2, 3, 4, 6). An association between type 1 and larger repeats was also found, but it is unclear if it was reflecting the fact that age at onset would be tightly associated with the determination of the phenotype (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; Takiyama et al, 1995) (3, 4, 9). In any case, the CAG repeat number explains only part of the variation in the MJD phenotype.

Modifying genes are particularly appealing for this disease, because MJD is one of a large family of spinocerebellar ataxias (SCAs), most of them sharing both the clinical heterogeneity and the same mutacional mechanism (Rosenberg, 1995; Hackam et al, 1998; Kakizuka, 1998; Hardy and Gwinn-Hardy, 1998) (10, 11, 12, 13). SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6 and SCA7 are all caused by unstable CAG expansions, encoding polyglutamine in the, otherwise unrelated, disease proteins (Orr et al, 1993; Kawaguchi et al, 1994; Koide et al, 1994; Pulst et al, 1996; David et al, 1997; Zhuchenko et al, 1997; Holmes et al, 1999) (2, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Unique structural features of polyglutamine likely cause it to adopt an altered conformation when expanded (Perutz et al, 1995) (20). *In vivo* and *in vitro* studies indicated that polyglutamine aggregates and this is strongly correlated with the development of symptoms (Hackam et al, 1998) (11). Furthermore, neuronal intranuclear inclusions, containing the mutant protein, were discovered in the majority of the SCAs (Paulson,

1999) (21).

Historically, the dominant ataxias have been difficult to differentiate (Harding, 1984) (22). We can now see that most SCAs are due to a similar mutation in different genes. The question addressed here is if the CAG tracts of the several genes causing SCA would interact with each other, thus contributing to the high clinical heterogeneity observed within each of these closely related disorders. The purpose of the present work was to study if the polymorphic CAG repeats of the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci*, would influence the phenotype of MJD, thus acting as modifier factors of this disease.

3. Subjects and methods

Our study was based on 39 Brazilian patients, with a previously detected (CAG)_n expansion in the MJD1 gene (Jardim et al, 2000a and 2000b) (6, 8).

All patients were interviewed and examined by the same physician (LBJ). A standardized procedure included establishing age at onset, disease duration, first sign of onset and a thorough neurological examination. Onset was considered the time when the patient, or a close relative, was able to date the appearance of the first symptom. Patients were classified in three clinical types, according to the literature (Sequeiros and Coutinho, 1993) (5). Several neurological signs were weighted, as described elsewhere (Jardim et al, 2000b) (8): gait and limb ataxia, the pyramidal syndrome, dysarthria, dysfagia, external ophthalmoparesis, nystagmus, eyelid retraction, sensitive loss, fasciculations, dystonia, rigidity / bradykinesia and optic atrophy. Data on anticipation were obtained from family history, when reliable, subtracting the age at onset of the patient (or the affected child) from that of the affected parent. Statistical analyses of data from clinical histories, heredograms, neurologic examination and molecular results, were performed using SPSS for Windows.

Blood samples were obtained, after informed consent, from all individuals, and genomic DNA was extracted from lymphocytes as described (Sambrook et al, 1989) (23). The MJD1, SCA2, SCA6 and DRPLA polymorphic CAG regions were analysed according to conditions previously established (Silveira et al, 1998) (24).

The size of the (CAG)_n was determined for all four *loci*. We refer to both normal alleles at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* as the small and the large allele.

The effect of the size of CAG repeats at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* on age of onset and on anticipation was assessed by the Spearman correlation coefficient. The possible association between the size of these CAG repeats and the clinical type was assessed by Kruskal-Wallis ANOVA. In addition, the effect of the CAG length at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* on several neurological signs was analysed by Mann-Whitney U test, when the sign was absent or present, or by Spearman correlation coefficient, when the sign showed a quantitative variation.

4. Results

Normal MJD chromosomes had alleles containing from 14 to 38 repeats, and the most frequent allele in our sample contained 24 repeats; mean \pm sd was 24.5 ± 6 . The expanded MJD alleles varied from 71 to 85 repeats, the most frequent one containing 73 CAGs; mean \pm sd was 75.6 ± 2.9 .

The SCA2 chromosomes (30 MJD patients) contained from 19 to 23 CAG repeats, the 22 repeat allele being the most frequent (90% of this sample). The small allele of each person had 19 to 22, while the large one ranged from 22 to 23 repeats. The SCA6 chromosomes (35 MJD patients) showed CAG repeat lengths varying from 4 to 14, and the most frequent allele had 13 repeats. The small alleles had 4 to 13, and the large ones, 7 to 14 repeats. DRPLA chromosomes (39 MJD patients) contained from 8 to 21 CAG repeats, the most frequent having 15 CAGs. The small alleles had 8 to 15, and the large ones, 10 to 21 repeats. None of them showed a normal distribution.

No correlation was found between age of onset and CAG length of either small or large alleles at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* (Spearman correlation coefficient, $0.17 < p < 0.88$). If small and large repeats of each *locus* were clustered together, similar results were found.

We did not find a correlation between anticipation and the length of any of the CAG repeat in the *loci* under study (Spearman correlation coefficient, $0.118 < p < 0.809$).

Few patients classified as type 1 MJD had their SCA2, SCA6 or DRPLA CAGs

estimated (Table 1). We tried, nevertheless, to study any possible relationship between MJD clinical types and the CAG lengths at the other *loci*. When types 1, 2 and 3 were compared according to their CAG repeat lengths at the SCA2, SCA6 and DRPLA, no statistical difference was found (Kruskal-Wallis test, $0.108 < p < 0.996$).

Possible relations were found between some neurological signs and CAG repeat length at SCA2 and SCA6 *loci*: Rigidity/bradykinesia was associated with the CAG length of the larger SCA6 allele (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$) (Table 2 and Figure 1). Severity of fasciculations was positively correlated with the CAG length of the large SCA2 allele ($\rho = 0.507$, Spearman correlation coefficient, $p < 0.01$) (Figure 2): generalized fasciculations were found only among patients with 23 repeats in the large allele, whereas mild or absent fasciculations were found among those with 22 repeats. Finally, there was a positive correlation between the degree of sensitive loss and the CAG length at the SCA2 gene, in both its large and small alleles ($\rho = 0.555$, Spearman correlation coefficient, $p < 0.02$) (Figure 3).

On the other hand, no statistical significance was found between the (CAG) $_n$ length of any of the *loci* under study and the severity of gait and limb ataxia, pyramidal findings, dysarthria, dysfagia, external ophtalmoplegia, nystagmus, eyelid retraction, dystonia, and optic atrophy.

5. Discussion

The majority of the polyglutamine diseases strike primarily the cerebellum (cerebellar tracts, nuclei or cortex), the exceptions being Huntington and Kennedy diseases. Intracellular inclusions or aggregates have been found in neurons of patients, and of murine and *in vitro* models of MJD and other polyglutamine diseases (Hackam et al, 1998) (11). While their specific compositions are unknown, the aggregates do contain fragments of proteins with expanded polyglutamine tracts. These may act as polar zippers, joining beta-strands together. There are several arguments that interactions among polyglutamine tracts themselves, after some cleavage, might be the main reason of the aggregate formation (Hackam et al, 1998) (11).

The present study raised the hypothesis that the pathogenic process of the expanded MJD polyglutamine could, in some way, be influenced by the lengths of other (normal) polyglutamine tracts. We used as models, those coded at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci*. The aggregate formation could, for instance, be accelerated or diminished, in general or in some anatomical areas, according to the size of the normal polyglutamine in the SCA2, SCA6 or DRPLA proteins. These could be responsible for some of the clinical heterogeneity in MJD.

The results of the present work excluded significant associations of the CAG repeat length at the SCA2, SCA6, or DRPLA *loci* with most of the clinical variables of MJD under study (namely, age at onset, anticipation, clinical type or the majority of neurological signs).

Three positive findings appeared, however: a direct relation of the (CAG)_n length at the SCA2 genes with the severity of the sensitive loss; a positive correlation of (CAG)_n length in the larger SCA2 allele with the severity of fasciculations; and a relation of (CAG)_n length at the larger SCA6 allele with the presence of rigidity / bradykinesia. The positive result linking large CAG alleles at the SCA6 locus to the presence of rigidity/bradykinesia is questionable. We have shown before that rigidity, with or without bradykinesia, is a neurological sign of MJD that is independent of disease duration, clinical type, or (CAG)_n length at the MJD locus (Jardim et al 2000b) (8). It would be tempting to interpret the present data as evidence of a causal relationship, but the sample size is very small and the actual difference found would be hardly seen as having any biological importance..

The same can be said about the correlation between fasciculations and the large SCA2 alleles. Again, the sample of patients with important fasciculations was very small (Figure 2). Also, large SCA2 alleles varied only from 22 to 23 repeats: it is difficult to believe that only one CAG repeat would make such a difference for the neurological evolution.

The positive correlation between (CAG)_n length at the SCA2 gene and severity of the sensitive loss seems to be more consistent, because it manifests as a trend, in all the sample (figure 3). Sensitive loss was more frequent in type 3 (Barbeau et al, 1984; Sequeiros and Coutinho, 1993) (5, 28). If the present findings are confirmed, length of the (CAG)_n tract in the SCA2 gene would be another determinant of sensitive loss in MJD patients.

The present findings are indeed preliminary and deserve further observation, specially because some positive results were found. Further studies with a larger number of patients and typing of other (CAG)*n loci* are needed.

6. Acknowledgements

This work was supported in part by FAPERGS.

7. References

- 1 Coutinho P and Andrade C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 1978; 28: 703-709.
- 2 Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; 8: 221- 8.
- 3 Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.
- 4 Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura T, M, Saida Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A and Kawakami H. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 807-812.
- 5 Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Dis-

- ease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S, eds. Hereditary Ataxias. *Adv Neurol*, vol. 61. New York: Raven Press; 1993. P. 139-153.
- 6 Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. Submitted to publication, 2000a.
 - 7 Junck L, Fink JK. Machado-Joseph disease and SCA3: the genotype meets the phenotypes. *Neurology* 1996; 46: 4-8.
 - 8 Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurological findings in Machado-Joseph disease: their relation with disease duration, clinical types and CAG repeat lengths. Submitted to publication, 2000b.
 - 9 Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al. Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1137-1146.
 - 10 Rosenberg RN. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology* 1995; 45: 1-5.
 - 11 Hackam AS, Wellington CL e Hayden MR. The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. *Clin Genet* 1998; 54(Suppl 1): 23-32.

- 12 Kakizuka A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics* 1998; 14: 396-402
- 13 Hardy J and Gwinn-Hardy K. Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 1998; 282: 1075-1078.
- 14 Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AI, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY. Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet* 1993; 4: 221-6.
- 15 Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji S. Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentatorubralpallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 1994; 6: 9-13.
- 16 Pulst S-M, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunke A, DeJong P, Rouleau G, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996; 14: 269-276.
- 17 David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, enomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel J e Brice A. Cloning the SCA7 gene reveals a

- highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 1997; 17: 65-70.
- 18 Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ahizawa T, Stockton D, Amos C, Dobyns W, Subramony SH, Zoghbi H and Lee CC . Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet* 1997; 15: 62- 68.
 - 19 Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth R, Sherr M, Sumner A, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieira-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA and Margolis R. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12 [letter] *Nat Genet* 1999; 23:391-2.
 - 20 Perutz MF. Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Molecular Medicine* 1995; 1: 718-721.
 - 21 Paulson HL. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 339-345.
 - 22 Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. First edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1984.
 - 23 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

- 24 Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A, Guimarães J, Loureiro L, Sequeiros J, Rouleau GA. Molecular genetic studies in spinocerebellar ataxias: analysis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in patients from 48 Portuguese ataxia families *Am J Med Genet (Neuropsychiat Genet)* 1998; 81:134-138.
- 25 Barbeau A, Roy M, Cunha L, et al. The natural history of Machado-Joseph disease. *Can J Neurol Sci* 1984; 11: 510-525.

8. Table

Table 1 – Distribution of (CAG)*n* length at the SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* of MJD patients, according to their clinical type.

	CAG repeat length in								
	SCA2 alleles			SCA6 alleles			DRPLA alleles		
	n	Mean ± sd	P	n	Mean ± sd	P	n	Mean ± sd	P
			(Kruskal			(Kruskal			(Kruskal
			-Wallis			-Wallis			-Wallis
			test)			test)			test)
Type 1	2	21.7 ± .5		1			3	13.8 ± 1.9	
Type 2	14	21.7 ± .7		19	11.8 ± 2		19	13.4 ± 3.2	
Type 3	13	22.1 ± .3		14	11.9 ± 2		15	13.4 ± 3.2	
Total	30	22 ± .6	p=0.108	35	11.8 ± 2	p=0.694	39	13.4 ± 3.1	p=0.931

9. Legends

Figure 1 – The presence of rigidity and/or bradykinesia according to the (CAG)_n length in the large SCA6 allele.

Figure 2 – Correlation between severity of fasciculations and (CAG)_n length in the large SCA2 allele

Figure 3 - Correlation between the degree of sensitive loss and the (CAG)_n length in the SCA2 alleles.

Figure 1

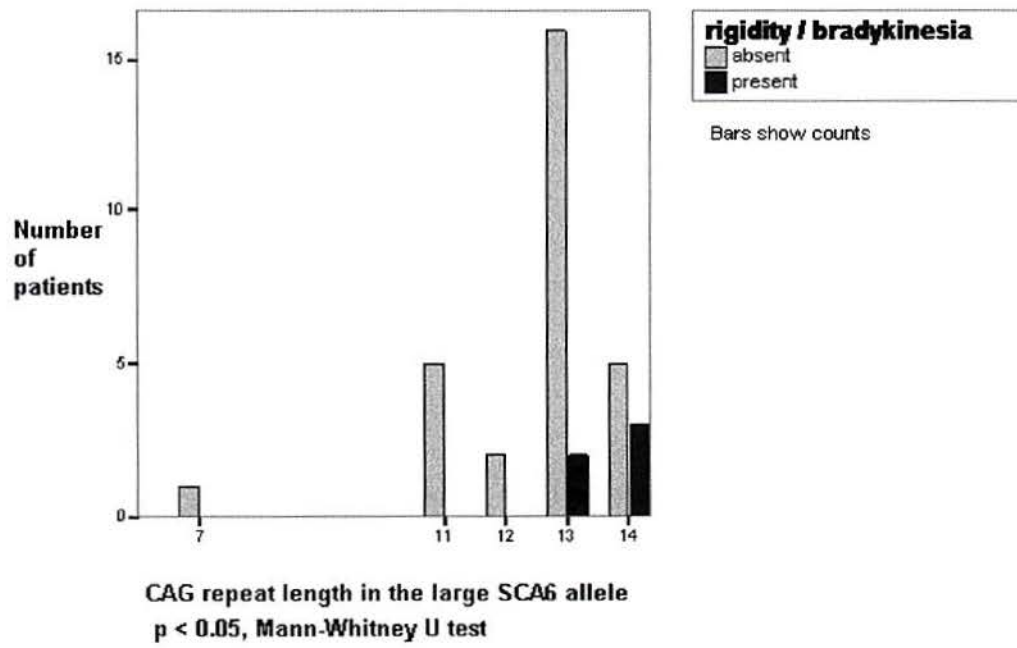
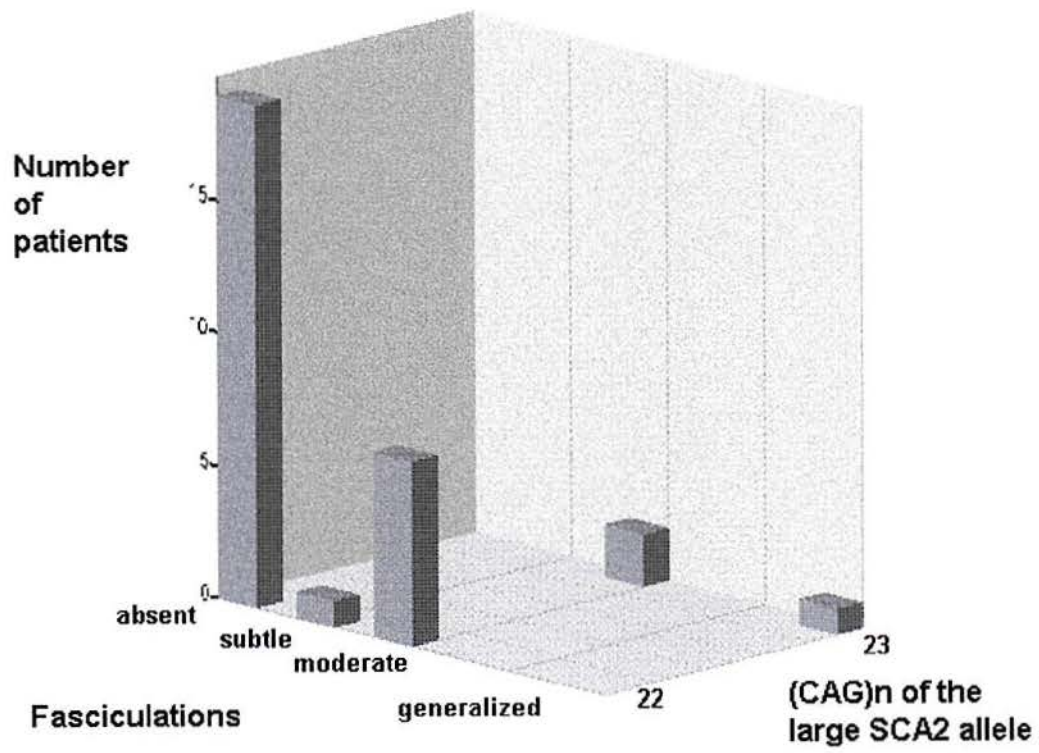
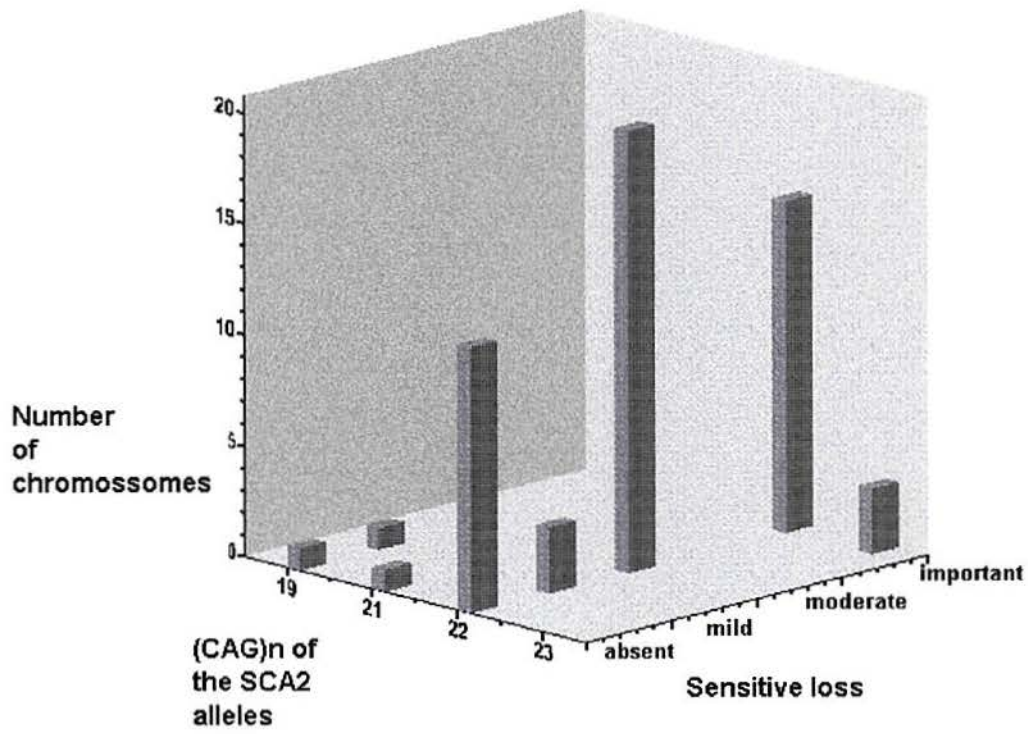


Figure 2



$\rho = 0.507$, Spearman correlation coefficient
 $p < 0.01$

Figure 3



$\rho = 0.555$, Spearman correlation coefficient
 $p < 0.02$

A busca pelos fatores modificadores da doença de Machado-Joseph: um estudo sobre as repetições CAGs dos genes SCA2, SCA6 e DRPLA

(Versão em português do artigo:

(“ Searching for modifier factors of the Machado-Joseph disease phenotype: a study on SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts”)

1. Resumo

Contexto: A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma ataxia autossômica dominante da vida adulta, que apresenta um quadro clínico bastante heterogêneo. A variabilidade na idade de início, os achados neurológicos heterogêneos e complexos, assim como a própria existência de 3 fenótipos, indicam que a DMJ, embora causada por um gene principal, seja modulada por fatores modificadores. **Objetivo:** Estudar se as repetições CAG polimórficas de outros *loci* (especificamente, SCA2, SCA6 e DRPLA) agem como fatores modificadores para essa doença. **Delineamento:** estudo de casos. **Setting:** atendimento ambulatorial em um centro de referência. **Pacientes:** uma amostra de conveniência de 39 pacientes com DMJ. **Principais desfechos estudados:** idade de início, antecipação, tipos clínicos e achados neurológicos específicos. **Resultados:** Houve associação da rigidez/bradicinesia com o tamanho da repetição CAG do alelo maior do gene SCA6 ($p < 0.05$). Também houve uma correlação direta entre a gravidade das fasciculações e o tamanho das repetições CAG do alelo maior do gene SCA2 ($\rho = 0.507$, coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0.01$) e entre a perda sensorial e o tamanho das repetições CAG de ambos os alelos do gene SCA2 ($\rho = 0.555$, coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0.02$). As outras medidas (idade de início, antecipação, tipos clínicos e outros sinais neurológicos) não foram associadas às repetições CAG estudadas naqueles *loci*. **Conclusões:** Os resultados aqui apresentados basearam-se em números bastante pequenos e os resultados positivos podem ter sido devidos a diferenças muito pequenas nos comprimentos dos tratos CAG. Há necessidade de que eles sejam confirmados ou rejeitados por estudos mais abrangentes, no futuro. **Palavras-chave:** doença de Machado-Joseph, ataxias espinocerebelares, expansões CAG.

2. Introdução

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma ataxia cerebelar autossômica dominante da vida adulta, cujo quadro clínico é bastante heterogêneo (Coutinho e Andrade, 1978) (1). A mutação associada a essa condição é uma expansão de um trato (CAG)_n na região codificadora do gene MJD1 (Kawaguchi et al, 1994) (2). Os cromossomos normais contêm 12 a 41 repetições, enquanto os causadores de doença contêm 61 to 86 repetições (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995) (3, 4).

Uma classificação universalmente aceita divide os pacientes em 3 fenótipos (Coutinho e Andrade, 1978; Sequeiros e Coutinho, 1993) (1, 5). A ataxia cerebelar e a oftalmoplegia externa progressivas são comuns aos 3 tipos. O tipo 1 tem uma idade de início mais precoce, em geral entre os 15 e os 20 anos, e se caracteriza pela presença de achados piramidais e posturas distônicas, ambos graves. O tipo 2 é o mais comum e inicia-se entre os 30 e os 37 anos, sendo quase limitado aos achados oculares, piramidais e cerebelares. O tipo 3 tem início mais tardio, entre os 37 e os 47 anos, e a sua evolução inclui o envolvimento dos neurônios motores inferiores e da sensibilidade periférica (Sequeiros e Coutinho, 1993; Jardim et al, 2000a) (5, 6).

A variabilidade na idade de início, as complexas e heterogêneas manifestações neurológicas, assim como a própria existência de 3 tipos clínicos, indicam que a DMJ, embora causada por um gene principal, seja modulada por fatores modificadores. Vários mecanismos responsáveis pela variação fenotípica podem ser postulados: (a) o tamanho variável da seqüência repetitiva CAG; (b) polimorfismos intragênicos ou nas vizinhanças do *locus* patogênico; (c) variações no alelo normal; (d) imprinting; (e)

mosaicismo somático; (f) genes modificadores; (g) fatores ambientais (Junck e Fink, 1996) (7); e (h) vieses de observação, se, por exemplo, algo da heterogeneidade fosse devido a diferenças não controladas na duração da doença (Jardim et al, 2000b) (8).

O fator até hoje melhor estudado foi certamente o tamanho da repetição CAG. Vários autores já demonstraram a existência de uma correlação negativa entre a idade de início e o número de repetições CAG, correlação que variou entre - 0.87 e - 0.67 (Kawaguchi et al, 1994; Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; Jardim et al, 2000a) (2, 3, 4, 6). Há também uma associação definida entre o tipo 1 e as seqüências repetitivas mais longas, embora não esteja claro se essa relação reflete apenas o fato de o fenótipo ser determinado pela idade de início (Maciel et al, 1995; Maruyama et al, 1995; Takiyama et al, 1995) (3, 4, 9). De todo modo, o número de repetições CAG explica apenas parcialmente a variação fenotípica dessa condição.

A hipótese de que existam genes modificadores é particularmente atraente. A DMJ é uma entre várias ataxias espinocerebelares (SCAs), cada uma causada por um gene distinto, mas todas compartilhando tanto um certo espectro clínico como um mesmo mecanismo mutacional (Rosenberg, 1995; Hackam et al, 1998; Kakizuka, 1998; Hardy and Gwinn-Hardy, 1998) (10, 11, 12, 13). As ataxias denominadas SCA1, SCA2, MJD, DRPLA, SCA6 e SCA7 são todas causadas por expansões CAG instáveis, codificadoras de segmentos de poliglutaminas dentro de proteínas aparentemente não relacionadas entre si (Orr et al, 1993; Kawaguchi *et al*, 1994; Koide et al, 1994; Pulst et al, 1996; David et al, 1997; Zhuchenko et al, 1997; Holmes et al, 1999) (2, 14, 15, 16, 17, 18, 19). É possível que características estruturais únicas façam com que a poliglutamina adote uma conformação alterada, quando expandida

(Perutz et al, 1995) (20). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que as poliglutaminas se agregam e que essa agregação se correlaciona fortemente com o início dos sintomas (Hackam et al, 1998) (11). Além disso, inclusões neuronais intranucleares contendo a proteína mutante foram descobertas na maioria das SCAs já estudadas (Paulson, 1999) (21).

As ataxias dominantes foram sempre muito difíceis de serem diferenciadas entre si, ao menos até que as suas mutações fossem descobertas (Harding, 1984) (22). Nós agora sabemos que a maioria das SCAs são devidas a mutações semelhantes dentro de genes independentes. A questão que queremos levantar é a seguinte: as seqüências CAG dos variados genes causadores de SCAs não poderiam interagir umas com as outras? Essa interação não poderia explicar uma parte da heterogeneidade clínica observada em cada uma das SCAs individuais? O objetivo do presente estudo foi o de investigar se as repetições CAG dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA influenciam ou não o fenótipo da DMJ, agindo, dessa forma, como fatores modificadores dessa condição.

3. Pacientes e métodos

Nosso estudo baseou-se em 39 pacientes brasileiros, nos quais já se havia previamente detectado a presença de uma expansão CAG no gene MJD1 (Jardim et al, 2000a e 2000b) (6, 8).

Todos os pacientes foram entrevistados e examinados pela mesma médica (LBJ). Um protocolo padrão incluiu o estabelecimento da idade de início, da duração da doença e do primeiro sintoma, bem como um exame neurológico completo. Considerou-se o início da doença como sendo o momento no qual o paciente ou um familiar próximo passaram a notar o primeiro sintoma. Os pacientes foram classificados em 3 tipos clínicos, de acordo com a literatura (Sequeiros e Coutinho, 1993) (5). Várias manifestações neurológicas foram sopesadas, como foi descrito em outro lugar (Jardim et al, 2000b) (8): ao menos a ataxia axial e apendicular, a síndrome piramidal, a disartria, a disfagia, a oftalmoparesia externa, o nistagmo, a retração palpebral, a hipoestesia, as fasciculações, a distonia, a rigidez/bradicinesia e a atrofia óptica. Os dados sobre a antecipação foram obtidos da história familiar: quando era confiável, subtraía-se a idade de início do propósito, da idade de início de seu genitor afetado. As análises estatísticas dos dados (histórias clínicas, dos heredogramas, do exame neurológico e dos resultados moleculares) foram feitas usando-se o SPSS for Windows®.

Com seu consentimento informado, todos os pacientes colheram uma amostra de sangue, da qual o DNA nuclear foi extraído conforme condições já descritas

(Sambrook et al, 1989) (23). As regiões CAG polimórficas dos genes MJD1, SCA2, SCA6 e DRPLA foram analisadas de acordo com condições laboratoriais previamente estabelecidas (Silveira et al, 1998) (24).

O tamanho do (CAG)_n foi determinado em todos os 4 *loci*, embora nos interessem aqui somente os dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA. Para diferenciá-los, nós nos referiremos aos alelos normais dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA como o alelo “menor” e o alelo “maior”.

O efeito do tamanho das repetições CAG nos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA sobre a idade de início e a antecipação foi avaliado pelo teste de correlação de Spearman, pois as suas distribuições não foram normais. A associação entre o tamanho dessas (CAG)_n e os tipos clínicos foi testada pelo teste de Kruskal-Wallis. Além disso, os efeitos dessas (CAG)_n sobre diversos sinais neurológicos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney, quando o sinal estava ou presente ou ausente, ou pelo coeficiente de correlação de Spearman, quando o sinal apresentava uma variação quantitativa.

4. Resultados

Os cromossomos DMJ normais apresentaram alelos contendo entre 14 e 38 repetições, sendo o mais freqüente o alelo com 24 repetições; a média \pm dp foi de 24.5 ± 6 . O alelo expandido teve entre 71 e 85 repetições, o mais freqüente sendo o de 73 repetições; a média \pm dp foi de 75.6 ± 2.9 .

Os alelos SCA2 (30 pacientes com DMJ) continham entre 19 e 23 repetições, sendo o alelo com 22 repetições o mais freqüente (90% da amostra). O alelo menor de cada indivíduo continha entre 19 e 22 repetições e o maior, entre 22 e 23 repetições. Os cromossomos SCA6 (35 pacientes com DMJ) continham entre 4 e 14 repetições CAG, sendo o mais freqüente o alelo com 13 repetições. O alelo menor variou entre 4 e 13 repetições e o maior, entre 7 e 14 repetições. Os cromossomos DRPLA (39 pacientes com DMJ) continham entre 8 e 21 repetições CAG, sendo o mais freqüente o alelo com 15 repetições. Os alelos menores tinham entre 8 e 15 repetições e os maiores, entre 10 e 21 repetições. Como dissemos, nenhum desses 3 últimos *loci* apresentou uma distribuição normal dos (CAG)_n.

Não se encontrou qualquer correlação entre idade de início e tamanho do (CAG)_n, seja do alelo menor, seja do maior, nos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA (coeficiente de correlação de Spearman, $0.17 < p < 0.88$). Quando os alelos maior e menor foram analisados em conjunto, resultados semelhantes foram obtidos.

Também não conseguimos correlacionar a antecipação com qualquer dos (CAG)_n em estudo (coeficiente de correlação de Spearman, $0.118 < p < 0.809$).

Poucos pacientes classificados como DMJ tipo 1 tiveram medidos seus (CAG)_n nos *loci* SCA2, SCA6 ou DRPLA (Tabela 1). Tentou-se, mesmo assim, estudar a relação entre os tipos clínicos e os (CAG)_n daqueles *loci*. Quando os tipos 1, 2 e 3 foram comparados entre si, no que diz respeito aos tamanhos dos (CAG)_n SCA2, SCA6 e DRPLA, nenhuma diferença estatística foi encontrada (teste de Kruskal-Wallis, $0.108 < p < 0.996$).

Entretanto, nós encontramos possíveis associações entre os (CAG)_n estudados e alguns achados neurológicos: a rigidez/bradicinesia foi associada ao tamanho do alelo maior do *locus* SCA6 (teste U de Mann-Whitney, $p < 0.05$) (Tabela 2 e Figura 1). A gravidade das fasciculações correlacionou-se com o tamanho do alelo maior do *locus* SCA2 ($\rho = 0.507$, coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0.01$) (Figura 2): ou seja, fasciculações generalizadas foram vistas apenas nos pacientes com 23 repetições no alelo maior, enquanto fasciculações leves ou mesmo sua ausência foram observados nos pacientes com 22 repetições. Enfim, o grau da perda sensorial foi diretamente proporcional ao tamanho do (CAG)_n no gene SCA2, tanto nos alelos maiores como nos menores ($\rho = 0.555$, coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0.02$) (Figura 3).

Nenhuma associação estatística foi encontrada entre os comprimentos dos (CAG)_n estudados e a gravidade da ataxia de marcha e de membros, dos sinais piramidais, da disartria, da disfagia, da oftalmoplegia externa, do nistagmo, da retração palpebral, da distonia e da atrofia óptica.

5. Discussão

A maioria das doenças causadas por poliglutaminas atinge principalmente o cerebelo (sejam tratos, núcleos ou córtex cerebelares), as únicas exceções sendo as doenças de Huntington e de Kennedy. Inclusões ou agregados intracelulares foram encontrados em neurônios de pacientes, em modelos animais e em estudos *in vitro* da DMJ e de outras doenças de poliglutaminas (Hackam et al, 1998) (11). Embora a composição específica dos agregados não seja conhecida, sabe-se que eles contêm fragmentos de proteínas com tratos de poliglutaminas expandidas. Esses tratos podem funcionar como “zíperes” polares, juntando-se uns aos outros. Há vários argumentos favoráveis à hipótese de que as interações entre as poliglutaminas (depois de as proteínas já terem sofrido alguma clivagem) seja a causa principal da formação dos agregados intracelulares (Hackam et al, 1998) (11).

Com o presente estudo, nós levantamos a hipótese de que o processo patogênico da poliglutamina DMJ poderia ser influenciado, de alguma maneira, pelo tamanho de outras poliglutaminas, mesmo que normais. Como modelo, nós usamos as poliglutaminas codificadas pelos (CAG)_n dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA. A formação dos agregados seria, segundo essa hipótese, acelerada ou reduzida de acordo com o tamanho das poliglutaminas normais presentes nas proteínas SCA2, SCA6 ou DRPLA. Assim, essas poliglutaminas poderiam ser responsáveis por parte da heterogeneidade clínica presente na DMJ.

Os resultados do presente trabalho excluem associações significativas dos (CAG)_n dos *loci* estudados com a maioria das variáveis clínicas da DMJ em estudo (idade de

início, antecipação, tipo clínico e a maioria dos achados neurológicos).

Porém, três resultados positivos foram encontrados: uma relação direta do tamanho do (CAG)_n dos genes SCA2 com a perda sensorial; uma correlação positiva entre o tamanho (CAG)_n do alelo maior SCA2 com a gravidade das fasciculações; e uma relação entre o tamanho do (CAG)_n do alelo maior SCA6 e a presença de rigidez/bradicinesia. Esse último resultado é questionável. Em um outro estudo, nós havíamos observado que a rigidez/bradicinesia seria um sinal neurológico da DMJ independente da duração de doença, do tipo clínico ou do tamanho do (CAG)_n no *locus* MJD1 (Jardim et al, 2000b) (8). Seria, portanto, muito tentador se interpretar os presentes resultados como evidências de uma relação causal, mas o número de casos com rigidez é muito pequeno, podendo a diferença encontrada Ter sido devida ao acaso.

Pode-se dizer o mesmo sobre a correlação obtida entre as fasciculações e os alelos maiores do *locus* SCA2. Porque, de novo, foi pequena a amostra de pacientes que apresentavam fasciculações graves (Figura 2). Além disso, os alelos maiores do gene SCA2 variaram entre 22 e 23 repetições, apenas: é difícil de se acreditar que somente uma repetição CAG a mais faria tanta diferença na evolução neurológica dos doentes.

Já a correlação positiva entre o tamanho dos (CAG)_n do gene SCA2 e a gravidade da perda sensorial pareceu-nos ser mais consistente, porque ela se apresentou como uma tendência geral e linear, presente em toda a amostra de doentes estudados (figura 3). A perda sensitiva é um achado mais comum entre os pacientes com DMJ tipo 3 (Barbeau et al, 1984; Sequeiros e Coutinho, 1993) (5, 28). Se os presentes achados

forem confirmados, o tamanho do trato CAG no gene SCA2 seria um outro determinante da perda sensorial desses doentes.

Os resultados aqui apresentados são preliminares e merecem ser repetidos por outros estudos, especialmente porque alguns deles foram positivos, apesar da amostra ser pequena. Entendemos que novos estudos observacionais serão necessários, especialmente se incluírem um maior número de casos e se investigarem outros *loci* com repetições CAG.

6. Agradecimentos

Parte desse trabalho foi realizado graças ao apoio da FAPERGS.

8. Tabela

Tabela 1 – Distribuição dos tamanhos dos (CAG)_n dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA nos pacientes com DMJ, de acordo com os seus tipos clínicos

	Tamanho da repetição CAG nos								
	alelos SCA2			alelos SCA6			alelos DRPLA		
	n	Média ± dp	P (teste de Kruskal-Wallis)	n	Média ± dp	P (teste de Kruskal-Wallis)	n	Média ± dp	P (teste de Kruskal-Wallis)
Tipo 1	2	21.7 ± .5		1			3	13.8 ± 1.9	
Tipo 2	14	21.7 ± .7		19	11.8 ± 2		19	13.4 ± 3.2	
Tipo 3	13	22.1 ± .3		14	11.9 ± 2		15	13.4 ± 3.2	
Total	30	22 ± .6	p=0.108	35	11.8 ± 2	p=0.694	39	13.4 ± 3.1	p=0.931

9. Legendas

Figura 1 – A presença da rigidez e/ou bradicinesia de acordo com o tamanho do (CAG)_n do alelo maior do gene SCA6.

Figura 2 – A correlação entre a gravidade das fasciculações e o tamanho do (CAG)_n do alelo maior do gene SCA2.

Figura 3 - A correlação entre o grau da perda sensorial e o tamanho do (CAG)_n nos alelos SCA2.

7. CONCLUSÕES

- 1) Os presentes resultados indicam que a DMJ é a mais freqüente SCA encontrada no Rio Grande do Sul, correspondendo a 81% dos pacientes estudados, a 92% das famílias averiguadas e a uma prevalência de 1,8 / 100.000 habitantes, nessa região.
- 2) Outras formas de ataxias espinocerebelares são bastante raras, tendo sido encontradas uma família com SCA7 e uma doente isolada com SCA8. Esses diagnósticos corresponderam a 4% dos indivíduos estudados e a uma prevalência de 0,2 / 100.000 habitantes.
- 3) Os achados clínicos e moleculares dos pacientes com SCA7 foram semelhantes aos encontrados por outros autores. A presença de retração palpebral em um deles demonstra a importância da investigação molecular como sendo a forma definitiva de diagnóstico das SCAs.
- 4) Os aspectos clínicos e moleculares da paciente portadora de uma expansão no *locus* SCA8 também foram semelhantes aos já descritos na literatura.
- 5) Os achados clínicos e moleculares dos pacientes com DMJ podem ser resumidos aos seguintes aspectos:
 - 5.1) A idade de início média dos casos aqui apresentados foi 7 a 8 anos mais precoce, em geral, do que a de portugueses e açorianos, sendo que esse achado não pôde, até o momento, ser explicado por uma procedência predominante da ilha de Flores.
 - 5.2) A sua sobrevida, a proporção dos tipos, a antecipação média, a proporção de afetados *versus* não afetados, as manifestações neurológicas e moleculares

foram todas semelhantes às encontradas por outros autores, em pacientes procedentes de Portugal, dos Açores, da Alemanha, do Japão, dos Estados Unidos e do Brasil.

- 5.3) A duração média da doença dos pacientes aqui apresentados foi bastante longa, o que permitiu uma classificação mais provavelmente correta dos mesmos.
 - 5.4) Os pacientes com tipo 1 e com transmissão paterna apresentaram as piores antecipações. Os pacientes com tipo 1, em geral, foram os que tiveram as maiores expansões CAG, como era esperado.
 - 5.5) Embora tenhamos tido tantos resultados semelhantes aos de outros e, portanto, sem novidade maior, nós enfatizamos que não se encontrou nenhuma explicação, entre as variáveis estudadas, para o desenvolvimento dos tipos 2 e 3, já que ambos os tipos foram semelhantes no que diz respeito à idade de início, à duração do quadro e ao comprimento das repetições CAG expandidas.
- 6) A análise das manifestações neurológicas dos pacientes com DMJ revelou que:
- 6.1) A duração da doença foi determinante para a progressão da ataxia axial, da ataxia apendicular, da disartria, da disfagia e das fasciculações. As variações encontradas no grau de ataxia axial, de ataxia apendicular e de disartria foram aparentemente devidas apenas à progressão temporal.
 - 6.2) Nenhuma associação foi encontrada entre os tipos clínicos e a gravidade da quase totalidade dos sinais investigados (salvo os usados como definidores), tanto os dependentes como os independentes do tempo de evolução – as exceções sendo:
 - 6.2.1) as hipoestésias de extremidades, que só encontraram associação com o tipo clínico (no caso, o tipo 3).

- 6.2.2) as oftalmoplegias supranucleares, que foram mais graves entre os pacientes com DMJ tipo 3.
- 6.2.3) as oftalmoplegias nucleares, que foram mais intensas entre os pacientes com tipo 1 e inclassificáveis. Elas também se associaram às maiores expansões CAG, o que está de acordo com o resultado anterior.
- 6.3) A tentativa de se associar os diversos sinais neurológicos à idade de início foi impedida, no presente estudo, pelo número reduzido de indivíduos com doença de curta duração. A sugestão de que exista uma relação da idade de início com o aparecimento da rigidez/bradicinesia poderá ser confirmada ou descartada em um estudo de maiores proporções.
- 6.4) Nós também preferimos usar da mesma precaução ao interpretar os resultados que associaram o nistagmo ao sexo, pois estes se basearam em números bastante reduzidos.
- 6.5) As gravidades da distonia e da síndrome piramidal foram diretamente proporcionais aos tamanhos das repetições CAG. Enquanto as manifestações distônicas foram mais frequentes e graves entre os pacientes com DMJ tipo 1, a gravidade da síndrome piramidal não diferiu entre os três tipos clínicos, embora esperássemos que os pacientes com tipo 1 tivessem os achados mais intensos. Essa ausência de significação estatística foi possivelmente devida ao número pequeno de casos com o tipo 1 da doença.
- 6.6) As variações encontradas no nistagmo, na retração palpebral, na rigidez/bradicinesia e na atrofia óptica não encontraram qualquer explicação entre as variáveis estudadas: não foram devidas à progressão temporal, nem aos tipos clínicos, nem às repetições CAG. Nós levantamos a hipótese de que esses sinais sejam causados por um fator modificador ainda ignorado.

- 7) Em relação à hipótese levantada de que o processo patogênico da poliglutamina DMJ poderia ser influenciado, de alguma maneira, pelo tamanho de outras poliglutaminas, mesmo que normais, usando-se como modelo as poliglutaminas codificadas pelos (CAG)_n dos *loci* SCA2, SCA6 e DRPLA, concluiu-se que:
- 7.1) Os resultados do presente trabalho excluíram associações significativas dos (CAG)_n dos *loci* estudados com a idade de início, com a antecipação, com o tipo clínico e com a maioria dos achados neurológicos.
 - 7.2) Houve uma relação entre o tamanho do (CAG)_n do alelo maior SCA6 e a presença de rigidez/bradicinesia. A validade desse resultado foi questionada, por ser a amostra pequena e por serem pequenas as reais diferenças encontradas, dificilmente se atribuindo a elas alguma importância biológica.
 - 7.3) Houve uma correlação positiva entre o tamanho (CAG)_n do alelo maior SCA2 com a gravidade das fasciculações. Também a validade desse achado foi discutível, por ser pequena a amostra de pacientes que apresentavam fasciculações graves e por ser pequena a diferença encontrada entre os grupos.
 - 7.4) A relação direta entre o tamanho do (CAG)_n dos genes SCA2 e a gravidade da perda sensorial pareceu ser um resultado consistente, pois ela se apresentou como uma tendência geral e linear, presente em toda a amostra de doentes estudados. Se esse resultado for confirmado, o tamanho do trato CAG no gene SCA2 seria um dos determinantes da perda sensorial nos pacientes com DMJ.
 - 7.5) Os resultados aqui apresentados são preliminares e merecem ser repetidos por outros estudos, especialmente porque alguns deles foram positivos, apesar da amostra ser pequena. Entendemos que novos estudos observacionais serão necessários, especialmente se incluírem um maior número de casos e se investigarem outros *loci* com repetições CAG.

8. ANEXOS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Coordenadora do GPPG, no uso de suas atribuições aprovou "AD REFERENDUM" o projeto:

Número: 96282

Título: "ATAXIAS CEREBELARES AUTOSSÔMICAS DOMINANTES: UM ESTUDO CLÍNICO, EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR".

Autores: Laura Bannach Jardim, Maria Luíza Pereira, Roberto Giugliani, Ana Cristina Puga, Letícia Rasia de Mello.

O mesmo está em condições de ser aprovado por estar adequado ética e metodologicamente às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

Porto Alegre, 23 de janeiro de 1997.

Atenciosamente


Prof.^a Themis Reverbel da Silveira
Coordenadora do GPPG

PROTOCOLO SCA**FICHA INDIVIDUAL DO AFETADO:**

FAMÍLIA ÚLTIMO SOBRENOME IDENTIFICADO:
 INDIVÍDUO (Nome completo e posição no heredograma)

.....
 Data da ficha:...../...../.....

Idade:..... Sexo: Data de nascimento:...../...../.....

Lugar onde nasceu:

Escolaridade:.....

Profissão: em exercício atual?

Endereço:

Estado civil: Nº de filhos:

Idade de início dos sintomas:

Genitor afetado: pai () mãe () Idade de início no genitor:

História:

Exames realizados:	Data	Resultados
C T:		
RNM:		
Potenciais evocados:		
EMG:		

Colheu DNA? Sim () Não ()

EXAME NEUROLÓGICO**PACIENTE:****DATA:****Atitude:****Funções mentais superiores**Estado de vigília:Coerência:

Orientação no tempo: /5
 no espaço: /5
 na pessoa: /5

Memória: imediata: /3
 recente: /3
 remota:

Linguagem: conteúdo:**Linguagem:** articulação:**Marcha:** espontânea:

provas deficitárias (3):

Equilíbrio estático: OA:
 OF:
 tandem OA (opcional):
 OF (opcional):

Coordenação apendicular:

metria dedo-nariz:
 dedo-dedo:
 calcanhar-joelho:
 diadococinesia MsMs:
 provas de rechaço: Stewart-Holmes:
 Outras:
 provas de indicação de Bárány (opcional):
 outras (opcionais):

Tônus:**Trofismo:****Movimentos Involuntários:**

normais (movimentos associados, sinérgicos):
 anormais: extrapiramidais?
 sincinesias?
 convulsivos?
 fasciculações?

Movimento voluntário - ForçaProvas deficitárias BE:

Mingazzini:

Contra-resistência:

Reflexos miotáticos:

os habituais no homúnculo (mas também peitorais e adutores da coxa, se houver)

os da face aqui: Glabelar:

Nasolabial:

mentoniano:

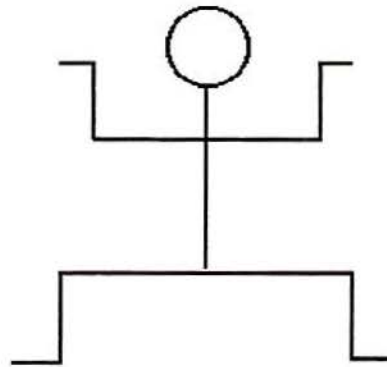
há palmomentual?

outros anormais: Hoffmann:

Trömner:

Outros fásicos:

Reação de Foix-Tévenard:



Reflexos superficiais: cutâneo-plantar:
seus sucedâneos (opcionais):

cutâneos abdominais:

Sensibilidade: modalidades sensoriais simples:

tátil:

algésica:

cinético-postural:

vibratória:

térmica:

Sensibilidade: gnosias: morfognosia:

grafestesia:

localização (há extinção?):

outras:

Pares:

- II:** campos visuais por confrontação:
FO:
- III, IV, VI:** fotomotor e consensual:
assimetrias pupilares?
- movimentos oculares extrínsecos:
acompanhamento:
sacadas:
há paresias? (descrever)
há nistagmos? (descrever)
- pálpebras:
- V** (sensibilidade):
VII (motricidade):
XI:
XII:

Outras observações:**DIAGNÓSTICO SINDRÔMICO, OU TOPOGRÁFICO:**

- 1#
2#
3#

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

INVESTIGAÇÃO: **Ataxias cerebelares autossômicas dominantes: um estudo clínico, epidemiológico e molecular**

OBJETIVOS:

- 1) Determinar as características demográficas e genéticas dos doentes portadores de ataxias espinocerebelares (SCAs).
- 2) Descrever as manifestações neurológicas encontradas nos doentes isolados e nos agregados familiares.
- 3) Caracterizar as mutações responsáveis por cada família de afetados, através da análise molecular dos genes SCA1, SCA2, MJD1 (ou SCA3), SCA6, SCA7 e DRPLA.
- 4) Estender ao maior número de doentes e de familiares o aconselhamento genético, bem como o acompanhamento neurológico dos afetados.

Eu,, fui informado dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre a investigação molecular que será realizada no meu material genético (sangue). Sei que o benefício esperado será o de um diagnóstico definitivo, não havendo, no momento, um tratamento decorrente desse diagnóstico.

Minhas dúvidas foram esclarecidas, e sei que a qualquer momento poderei solicitar mais informações. Sei também que poderei retirar a minha participação deste estudo a qualquer momento em que assim eu o decidir, sem que haja necessidade de justificativas de minha parte.

O profissional certificou-me que as informações obtidas a partir dos meus exames terão caráter confidencial, e só serão fornecidas a terceiros (inclusive meus próprios médicos assistentes) mediante a minha autorização por escrito.

Fui informado de que, caso existam danos à minha saúde, causados diretamente por esta pesquisa, terei direito a tratamento médico e à indenização conforme estabelece a lei. Também sei que, caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Porto Alegre, de de

Assinatura do paciente

Assinatura do investigador

CRONOGRAMA DE CONSULTAS - MARQUE COM UM X OS PASSOS DADOS; ANOTE AS DATAS DAS PRÓXIMAS CONSULTAS

PACIENTE
FAMÍLIA (número)
OU	
TESTE PREDITIVO (CÓDIGO)

Diagnóstico das famílias



Identificação dos candidatos potenciais, através dos Critérios de Elegibilidade



Inscrição no Programa



Avaliação clínica



Indivíduo assintomático em risco (Programa de Teste Preditivo) ↓	Indivíduo já sintomático (Programa de Acompanhamento) ↓
Primeira consulta de aconselhamento genético informação sobre a doença e sobre o teste avaliação da psicologia clínica (entrevista + questionários) ↓	Primeira consulta de aconselhamento genético informação sobre a doença e sobre o teste avaliação da psicologia clínica (entrevista) ↓
Segunda sessão de aconselhamento genético: coleta do exame, preparação para comunicação dos resultados, formulário de consentimento informado ↓	Segunda sessão de aconselhamento genético: coleta do exame, preparação para comunicação dos resultados, formulário de consentimento informado ↓
Comunicação dos resultados ↓	Comunicação dos resultados
Primeira consulta de seguimento da psicologia clínica (entrevista + questionários) ↓	↓
Intervenção psicológica e social, e sua combinação com base nas necessidades de cada caso ↓	Intervenção psicológica e social, e sua combinação com base nas necessidades de cada caso ↓
Avaliação neurológica e sua combinação com base anual, se o indivíduo o desejar ↓	Avaliação neurológica e sua combinação com base anual, se o indivíduo o desejar
Segunda consulta de seguimento da psicologia clínica (entrevista + questionários)	

**PROTOCOLO SCA
FICHA FAMILIAR**

FAMÍLIA ÚLTIMO SOBRENOME IDENTIFICADO:.....

AVALIADA DESDE, POR.....

INCLUI OS SEGUINTE REGISTROS: FC:

CO:

Outros:.....

STATUS EM / /

História colhida a partir do indivíduo (ver heredograma)

Nº de gerações lembradas:.....

Origem do ancestral afetado: conhecida?

desconhecida?

Nº de indivíduos afetados de indivíduos não afetados

Nº de mulheres afetadas de mulheres não afetadas

Nº de homens afetados de homens não afetados

Idade de início: Média: Variação: de a

▲ Idade de início entre genitor e afetado, quando o genitor foi o pai: Média:

Variação: de a

quando o genitor foi a mãe:

Média:.....

Variação: de..... a

DNA:

INDIVÍDUO	Colhido em:	Extraído em:	Em processamento:	Resultado final:	Laboratório:
-----------	-------------	--------------	-------------------	------------------	--------------

HEREDOGRAMA:

(apontar afetados, examinados, e indivíduos que colheram exames bioquímicos e moleculares)

(apontar idade de início e idade "final" = idade atual ou idade de morte †)

