

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Avaliação das repetições hexanucleotídicas no gene *C9orf72* como possível modificador de idade de início da doença em pacientes com doença de Machado-Joseph**

Yelena Perevalova

*Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular*

Orientadora: Maria Luiza Saraiva-Pereira

**Porto Alegre**

**Abril, 2018**

## **Realização do Trabalho e Financiamento**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética (LIG) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) e no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo Incentivo de Pesquisa HCPA (FIPE-HCPA).

## Sumário

<b>REALIZAÇÃO DO TRABALHO E FINANCIAMENTO</b>	<b>i</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. Doenças Neurodegenerativas</b>	<b>1</b>
<b>2. Ataxias Espinocerebelares</b>	<b>2</b>
<b>3. Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3</b>	<b>3</b>
<b>a. Manifestações Clínicas</b>	<b>3</b>
<b>b. Bases Genéticas</b>	<b>4</b>
<b>c. Bases Moleculares</b>	<b>6</b>
<b>d. Efeitos Modificadores de Idade de Início da Doença de Machado-Joseph</b>	<b>7</b>
<b>4. C9orf72</b>	<b>11</b>
<b>a. Estrutura e Função do gene <i>C9orf72</i></b>	<b>12</b>
<b>b. Expansão GGGGCC</b>	<b>12</b>
<b>c. Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência Frontotemporal</b>	<b>15</b>
<b>5. Justificativa</b>	<b>16</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>

<b>III. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<i>C9orf72</i> gene and Cerebellar Ataxia: A Tenuous Relationship	20
Analysis of <i>C9orf72</i> hexanucleotide repeats length as a potential modifying factor of age of onset in Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3 patients	34
<b>IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

A	adenina
ALS	esclerose lateral amiotrófica ( <i>Amyotrophic lateral sclerosis</i> )
ii	idade de início da doença ( <i>age of onset</i> )
C	citosina
DM1	distrofia miotônica do tipo 1
DNA	ácido desoxirribonucleico ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
ER	retículo endoplasmático ( <i>endoplasmatic reticulum</i> )
FTD	demência frontotemporal ( <i>Frontotemporal dementia</i> )
G	guanina
MJD	doença de Machado-Joseph ( <i>Machado-Joseph disease</i> )
mRNA	RNA mensageiro ( <i>messenger RNA</i> )
polyQ	poliglutamina
RNA	ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
SCA	ataxia espinocerebelar ( <i>spinocerebellar ataxia</i> )
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
T	timina
UTR	região não-traduzida ( <i>untranslated region</i> )

## Resumo

A doença de Machado-Joseph (MJD – *Machado-Joseph disease*), também conhecida como ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3 – *spinocerebellar ataxia type 3*), é uma doença neurodegenerativa, com padrão de herança autossômica dominante, causada por uma expansão do trato de repetições CAG no gene *ATXN3*. Estudos prévios mostram que a idade de início (ii) da doença apresenta uma correlação inversa ao número de repetições CAG no alelo expandido, mas que somente entre 40 e 68% da variação da ii pode ser explicado pelo tamanho da expansão. Considerando que um mecanismo molecular comum para todas as doenças neurodegenerativas foi proposto anteriormente, o restante da variação da correlação pode estar associado ao mecanismo molecular de outras doenças. Expansão da repetição hexanucleotídica (GGGGCC ou G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) no gene *C9orf72* foi identificado como a etiologia em uma proporção significativa dos pacientes de esclerose lateral amiotrófica (ALS – *amyotrophic lateral sclerosis*), demência frontotemporal (FTD – *frontotemporal dementia*) e os afetados da comorbidade ALS-FTD. O presente estudo teve como objetivo investigar o tamanho do trato de hexanucleotídeo no gene *C9orf72* em pacientes com MJD/SCA3 como um potencial modificador de ii. A genotipagem dos alelos do *C9orf72* foi realizada por PCR com primers fluorescentes, seguida de eletroforese capilar, e avaliada no grupo teste e no grupo controle. Foram genotipados 83 pacientes com MJD/SCA3 e 102 controles saudáveis sem história de ataxia. Todos os pacientes e controles foram recrutados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A expansão patogênica do *C9orf72* foi definida como trato contendo mais de 30 repetições hexanucleotídicas. Os indivíduos foram divididos em duas categorias para fins de análises estatísticas: grupo 1) indivíduos com ambos alelos contendo até 6 repetições, inclusive (alelo “pequeno”) e grupo 2) os indivíduos com pelo menos um alelo de 7 até 30 repetições, inclusive (alelo “intermediário”). Nenhum indivíduo com expansão patogênica foi detectado. A frequência alélica de G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> foi estabelecida e nenhuma diferença foi observada entre elas. Além disso, não foi encontrada correlação do tamanho do alelo com pacientes de ii precoce e nem com os pacientes de ii tardia. Portanto, nossos resultados indicam que o tamanho do alelo do *C9orf72* não atua como fator modificador da idade de início da doença em pacientes com MJD/SCA3.

## Abstract

Machado-Joseph disease (MJD), also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is a neurodegenerative disorder of an autosomal dominant trait caused by an expansion of a CAG repeat tract in the *ATXN3* gene. Previous studies show that age of onset (AO) of the disease is inversely correlated with CAG repeat length in the expanded allele that can explain from 40 to 68% of variation in AO. Considering that a common molecular mechanism for all neurodegenerative diseases has been previously suggested, the key to describing this variation could lie in the molecular biology of other diseases. Hexanucleotide repeat (GGGGCC or G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) expansions in *C9orf72* were identified as the etiology in a significant portion of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), patients with frontotemporal dementia (FTD), and those affected by comorbid ALS-FTD. Taking this into consideration, our aim was to investigate *C9orf72* hexanucleotide tract length in MJD/SCA3 patients as a potential modifier of AO. After establishing a reliable protocol to genotype *C9orf72* alleles using PCR with fluorescent primers followed by capillary electrophoresis, 83 MJD/SCA patients and 102 healthy controls with no history of ataxia were genotyped. All individuals were recruited from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Pathogenic expansions were defined as alleles containing more than 30 hexanucleotide repeats. Individuals were divided into two categories for statistical analysis: group 1) those with both alleles containing up to 6 repeats (“small” alleles) and group 2) those with one or both alleles of 7 up to 30 repeats (“intermediate” alleles). No pathogenic expansions were detected. Allelic distribution was established, and no difference was observed between groups. In addition, neither early-onset nor late-onset MJD/SCA3 patients have shown to be correlated with neither the small nor the intermediary *C9orf72* genotype so far. Therefore, results obtained in this study indicate that *C9orf72* allele length is not a modifier of age of onset in MJD/SCA3 patients.

## I. Introdução

### 1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas constituem uma família de patologias reconhecidas mais recentemente, sendo que as primeiras publicações descrevendo uma série de doenças como “neurodegenerativas” surgiram só na segunda metade da década de 60 do século passado (Jennekens 2014). Elas representam um conjunto de condições crônicas heterogêneas cuja consequência é a perda progressiva da funcionalidade e/ou integridade estrutural dos neurônios (Przedborski et al. 2003). A grande maioria dessas doenças se manifestam tardiamente, o que dificultou o seu estudo no passado pelo fato que os indivíduos não sobreviviam até a idade de início da doença (ii). Atualmente, com o envelhecimento da população mundial, as doenças neurodegenerativas apresentam um grande interesse para a saúde pública mundial, com previsão da Organização Mundial de Saúde indicando que, até o ano 2040, as doenças neurodegenerativas vão superar o câncer como a segunda maior causa de morte natural (Gammon 2014).

Devido ao fato dos estudos das doenças neurodegenerativas serem recentes, da dificuldade de obtenção de material biológico do sistema nervoso e das limitações de metodologias, a utilização de genética em estudos moleculares das doenças neurodegenerativas só entrou na pauta em 1979 (Young 2009), com uma discussão do uso de marcadores genéticos para tentar localizar o gene responsável pela doença de Huntington. O resultado foi a identificação de uma região polimórfica do cromossomo 4 e, posteriormente, a identificação do gene conhecido atualmente como *HTT* (Gusella et al. 1983), dando início a era da neurogenética. Mesmo assim, a maioria das doenças neurodegenerativas ainda não tem sua etiologia precisamente descrita. O mecanismo exato da neurodegeneração ainda não foi completamente elucidado, mas, a cada ano, surgem mais evidências de uma via comum, ou pelo menos semelhante molecularmente, entre todas as doenças neurodegenerativas (Lin and Beal 2006; Jellinger 2010; Haass 2010; Avila 2010; Durrenberger et al. 2015).

A classificação dessas doenças apresenta uma série de dificuldades, sendo que existe uma grande sobreposição do quadro clínico e patológico entre doenças mesmo de famílias

moleculares bastante diferentes. Existe uma série de critérios utilizados para identificar e classificar a doença neurodegenerativa de um paciente, levando em consideração a topologia da lesão, as características clínicas e, quando conhecida, a etiologia (Kovacs 2016). É a partir dessa classificação, que surgiu um grupo de doenças do trato de poliglutaminas (doenças poliQ). Essas doenças, na sua maioria, apresentam padrão de herança autossômica dominante, com ii na idade média adulta e a taxa progressiva da doença (Orr and Zoghbi 2007). Essas doenças são causadas por uma expansão do trinucleotídeo CAG em um gene causador, o qual será posteriormente traduzido por um trato de poliQ nas proteínas, havendo a formação de aglomerados proteicos tóxicos para células. É importante notar que mesmo com esse fator descrito, há evidências que só a síntese da proteína mutada não é suficiente para causar a doença (Katsuno et al. 2006; Li and Li 2006; Thompson 2008).

## 2. Ataxias Espinocerebelares

As ataxias espinocerebelares (SCA – *spinocerebellar ataxia*) formam uma família constituída por dezenas de doenças heterogêneas molecularmente e clinicamente semelhantes, as quais só podem ser corretamente identificadas através do uso de exames moleculares (Orr and Zoghbi 2007). De acordo com os critérios descritos anteriormente, podemos descrever as SCAs como desordens genéticas hereditárias (na sua maioria autossômica dominantes), resultando em atrofia cerebelar, com o paciente exibindo marcha atáxica e incoordenação nos movimentos dos membros, na fala e na movimentação ocular, entre outros sintomas (Teive 2009; Jayadev and Bird 2013). Apesar da falta de estudos abrangentes sobre a prevalência mundial das SCAs, existe um grande número de estudos regionais (Ruano et al. 2014).

A patogênese das SCAs é variável. Entretanto, podemos dividi-las em quatro categorias: ataxias poliQs, disfunção dos canais iônicos, alteração nos sinais de transdução e repetições não-codificantes (provavelmente levando à toxicidade de RNA nos neurônios) (Shakkottai and Fogel 2013), sendo que as ataxias poliQs são as mais prevalentes. Tipicamente, esse tipo de SCA tem como etiologia uma expansão do tipo (CAG)<sub>n</sub> localizada na parte codificante do gene (Trott and Houenou 2012). Mas existem exceções, como no caso SCA8, onde é uma expansão (CTG)<sub>n</sub> na região não-codificante que resulta em uma proteína poliglutamina pura lida a partir da fita

complementar. De todas as formas de SCAs, somente 16 têm um gene associado conhecido, indicando a dificuldade de identificação dos fatores genéticos nessas doenças, além da sua provável natureza multifatorial (Teive et al. 2012).

Pelo menos seis tipos diferentes de SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA10) foram identificadas no Brasil, além das famílias sem diagnóstico molecular (de Castilhos et al. 2014). A SCA3, também conhecida como doença de Machado-Joseph (MJD – *Machado-Joseph disease*), é a mais prevalente, sendo responsável por aproximadamente 60% dos pacientes afetados por SCAs no Brasil (de Castilhos et al. 2014; Cintra et al. 2014). No nosso estado (Rio Grande do Sul), a prevalência de MJD/SCA3 é ainda mais marcante (Jardim et al. 2001c; Ruano et al. 2014).

### 3. Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3

#### a. Manifestações Clínicas

A MJD/SCA3, foi identificada na década de 70 por três grupos independentes, estudando famílias residentes no Estados Unidos com ascendência açoriana. Os patriarcas de duas dessas famílias, William Machado (Nakano et al. 1972) e Antone Joseph (Rosenberg et al. 1976), foram imortalizados no nome da doença. E um terceiro grupo foi descrito como a doença “degeneração nigro-espino-dentatal com oftalmoplegia” (Woods and Schaumburg 1972). O quadro clínico da doença é bastante variável, com a manifestação principal sendo a ataxia cerebelar, mas a sintomatologia inclui também espasticidade (Dürr et al. 1996), dificuldade na deglutição (Isono et al. 2013), dificuldade na articulação de fala (Wolf et al. 2017), comprometimento cognitivo (Kawai et al. 2004), entre outros (Jardim et al. 2001a; Jardim et al. 2001b; Lee et al. 2003; Vale et al. 2010; González-Zaldívar et al. 2015). Essa grande variabilidade contribuiu para a dificuldade na classificação dessa doença, junto com sua identificação inicial.

Em 1978, Coutinho e Andrade fizeram a tentativa mais completa em descrever a doença. Foram identificadas três categorias da MJD/SCA3, as quais se distinguem pelos sinais extra-piramidais e/ou sinais periféricos presentes. Os sinais cerebelares, tais como ataxia, disartria e oftalmoplegia externa progressiva, podem ser encontrados em quase todos os pacientes. Os

pacientes MJD/SCA3 tipo 1 apresentam sinais piramidais e extrapiramidais marcantes, tais como hiperreflexia, sinal de Babinski, distonia. Os pacientes do tipo 3 apresentam, na sua maioria, alterações periféricas, tais como dor nos membros, entorpecimento. Por fim, os pacientes do tipo 2 da doença apresentam uma sintomatologia intermediária, sem sinais neurológicos intensos observados, e podem se transformar no tipo 1 ou no tipo 3 após um período prolongado. Os três tipos apresentam ii diferentes, com o tipo 1 se caracterizando por manifestação mais precoce, ao redor de 25 anos, e os tipos 2 e 3 desenvolvendo os primeiros sintomas na quarta década de vida, mas o com tipo 3 representando o subtipo mais tardio, começando mais perto de cinquenta anos (Coutinho and Andrade 1978).

Com o aumento dos estudos nessas doenças raras, foram identificados mais dois subtipos da doença. Um quarto tipo foi relatado em poucas famílias com sintomas de parkinsonismo, como tremores, rigidez e bradicinesia (Tuite et al. 1995; Gwinn-Hardy et al. 2001; Buhmann et al. 2003; Bettencourt et al. 2011b). Esses pacientes, diferentemente dos outros subtipos da MJD/SCA3, respondem bem ao tratamento com levodopa. Em 2009, um possível quinto tipo da MJD/SCA3 foi escrito por um grupo chinês, com sintomas imitando paraplegia espástica hereditária (Wang et al. 2009). Mas os dados referentes a esse tipo da doença ainda não foram confirmados, nem aceitos de forma abrangente.

#### b. Bases Genéticas

A identificação do mecanismo molecular responsável pela MJD/SCA3 é de grande interesse, tanto científico como para o desenvolvimento de terapias e tratamentos. Estudos realizados por Stevanin e colaboradores em 1993 eliminaram os genes causadores de SCA1 e SCA2 como candidatos etiológicos da MJD, que eles denominaram SCA3, por convenção, em um estudo posterior (Stevanin et al. 1995). Esse precedente, exacerbado pela alta heterogeneidade clínica, gerou uma série de confusões sobre a identidade de SCA3 e MJD, necessitando a investigação na cognição dessas síndromes aparentemente clinicamente distintas, mas molecularmente parecidos. Depois de uma série de publicações, MJD e SCA3 foram confirmados como sendo a mesma doença (Matilla et al. 1995; Haberhausen et al. 1995), mas por convenção, até hoje, os dois nomes estão utilizados para denominar essa doença

neurodegenerativa específica. Tomando como exemplo pesquisa em outras doenças neurodegenerativas, o primeiro passo na identificação do *locus* responsável para o desenvolvimento da MJD/SCA3 foi a utilização do mapeamento genético por análise de ligação, com dois grupos identificando uma região do braço longo do cromossomo 14 como associado à doença (Takiyama et al. 1993; St George-Hyslop et al. 1994). Como várias desordens neurodegenerativas e multisistêmicas, como a SCA1 e a doença de Huntington, foram relacionados com expansões trinucleotídicas, esse mecanismo foi uma das linhas principais para investigação na MJD/SCA3. Em 1994, Kawaguchi e colaboradores localizam um trato de repetições CAG na região previamente associada com MJD/SCA3 (Kawaguchi et al. 1994).

Posteriormente, em 2001, Ichikawa e colaboradores descreveram a estrutura do gene *MJD*, hoje em dia conhecido como *ATXN3*, e a expressão desse gene (Ichikawa et al. 2001). A estrutura do gene foi determinada como sendo composta por 11 éxons, intercalados por 10 íntrons, com a expansão CAG localizada no início do décimo éxon. Essa descoberta abriu as portas para investigações iniciais do mecanismo proteico que causa a doença, sendo que a expansão nucleotídica, quando traduzida, gera um trato poliQ estendido. Em termos da expressão, análises por *Northern Blot* mostraram expressão ubíqua do RNA do *ATXN3*, em espécies de vários tamanhos, indicando possíveis sítios de *splicing* no gene ou poliadenilação diferenciada (Ichikawa et al. 2001).

Geneticamente falando, MJD/SCA3 canonicamente apresentava uma doença autossômica dominante de penetrância completa. Estudo abrangente de 149 pacientes afetados, 204 indivíduos em risco e 320 indivíduos normais delimitou a definição do alelo “normal” como apresentando entre 12 e 44 repetições, enquanto os alelos patogênicos foram descritos como aqueles contendo entre 61 e 87 repetições (Maciel et al. 2001). Nesse mesmo trabalho, foi descrito o caso de um indivíduo com 51 repetições sem manifestações clínicas, indicando que um alelo desse comprimento não expressa o fenótipo MJD/SCA3. Entretanto, a questão dos alelos intermediários gerou resultados inconclusivos e estão ainda mais complicados por serem raros. Ao contrário do trabalho de Maciel e colaboradores, uma série de outros estudos mostraram que os alelos intermediários são capazes de desenvolver a doença (van Alfen et al. 2001; Gu et al. 2004), sendo o alelo com 45 repetições o menor alelo patogênicos descrito (Padiath et al. 2005).

É importante notar que essa expansão CAG não é considerada estável; ou seja, a tendência da expansão nessa faixa é aumentar seu tamanho para a próxima geração (Maruyama et al. 1995). O alelo normal é transmitido de forma conservadora, sem mudança, enquanto o alelo mutante tende a acumular repetições (Igarashi et al. 1996). Esse fenômeno molecular é a causa de antecipação: em uma família, a idade de início da doença é mais precoce na próxima geração (Klausen 2007).

### c. Bases Moleculares

A principal característica marcante das doenças poliQs são as chamadas inclusões proteicas formadas por aglomeração de proteínas poliQ mutantes (Zoghbi and Orr 1999). No caso da MJD/SCA3, a proteína que forma esses aglomerados é a ataxina-3, uma proteína expressa de forma ubíqua nos tecidos do sistema nervoso humano (Nishiyama et al. 1996). A função específica dessa proteína não é conhecida, mas modelos em camundongo *knock-out* e análises estruturais indicam uma provável função relacionada com a ubiquitinação (Chow et al. 2004; Schmitt et al. 2007), especificamente relacionando a ataxina-3 com processos de degradação de proteínas (Burnett et al. 2003). Além disso, a interação de tratos poliQ, e especificamente o trato da ataxina-3, com a maquinaria de regulação de transcrição está bem documentada (Shimohata et al. 2000; McCampbell et al. 2000; Li et al. 2002). Dificultando mais a situação, modelos *knock-out* em *Caenorhabditis elegans* não demonstraram diferença de comportamento, nem na expectativa de vida (Rodrigues et al. 2007). Em termos da localização, a ataxina-3 consegue se deslocar entre o núcleo e o citoplasma da célula, indicando sua alta potência transportadora (Chai et al. 2002).

A primeira indicação que a proteína mutante tem provável papel no desenvolvimento da doença entra nessa mesma questão de localização: nos pacientes afetados, a ataxina-3 preferencialmente desloca para o núcleo, formando inclusões (Schmidt et al. 1998). Esse efeito da proteína mutada parece ser ao mesmo tempo crítico para o desenvolvimento da doença e, ao mesmo tempo, ter grande poder neuroprotetor. Estudos com a proteína huntingtina, uma proteína poliQ que responsável, quando expandida, pela doença de Huntington, demonstra que a introdução de aglomerados de peptídeos poliQ no núcleo de neurônios leva até a degeneração

das células, ou seja, eles são altamente tóxicos para células (Yang et al. 2002). Ao mesmo tempo, existem evidências que as inclusões de proteínas poliQ não levam até a morte celular, mas protegem a célula, provavelmente devido ao sequestro de proteína mutante (Arrasate et al. 2004). Esses resultados aparentemente contraditórios demonstram a complexidade da questão da neurodegeneração, e indicam a provável existência de fatores adicionais atuando nesse processo, além da simples inclusão de agregados poliQ.

#### d. Efeitos Modificadores de Idade de Início da Doença de Machado-Joseph

A idade de início da MJD/SCA3 apresenta grande interesse para indivíduos afetados e para pesquisadores investigando a doença por causa da sua grande variabilidade. As primeiras tentativas de descrever os mecanismos que determinam a ii se baseavam, de novo, nos estudos de outras doenças neurodegenerativas. Essas tentativas foram realizadas inicialmente por dois grupos independentes que consideravam o tamanho da expansão, ou seja, o número de repetições CAG, como o principal fator determinante na ii. Em 1995, Maciel e colaboradores descreveram correlação inversa entre o tamanho do alelo expandido e a ii, sendo que alelos menores correspondiam a ii mais tardias (Maciel et al. 1995). Esse estudo determinou que esse fator é capaz de explicar somente cerca de 45,8% da variabilidade da ii em pacientes com MJD/SCA3 em uma amostra de pacientes de origem portuguesa, norteamericana e brasileira. No mesmo ano, Maruyama e colaboradores demonstraram que, em uma população japonesa, esse mesmo fator explicava ao redor de 76% de variação da ii (Maruyama et al. 1995).

Essa inconsistência da influência de tamanho da expansão continuou a ser observado em estudos posteriores nessa área. O estudo de uma coorte holandesa, em 2002, demonstrou que o número de repetições contribuiu entre 52 até 76% na variabilidade da ii da doença (van de Warrenburg et al. 2002), enquanto que, em uma população cubana, esse mesmo fator contribuiu até 81% (González-Zaldívar et al. 2015). Um estudo recente realizado no estado do Rio Grande do Sul apontou uma influência relativamente menor do tamanho de expansão nos pacientes dessa região, sendo que somente 62,1% da variação foi explicada por esse fator (Saute and Jardim 2015). Essas informações demonstram uma variação da influência da expansão em populações distintas, indicando a provável existência de fatores adicionais que atuam no

desenvolvimento de doença, levando às discussões se esse fator é genético ou ambiental (DeStefano et al. 1996).

Na investigação de fatores genéticos, o primeiro suspeito foi o tamanho do alelo normal do *ATXN3*. Um dos primeiros estudos desse aspecto foi realizado em 1996 por Dürr e colaboradores, utilizando uma grande amostragem de pacientes e controles com origens geográficas globais distintas (Dürr et al. 1996). Em uma coorte de 91 pacientes afetados com ii descrita, o alelo expandido representou uma contribuição de 64% para variação da ii. A inclusão de alelo “normal” na análise acrescentou mais 6%, sendo que o sentido de correlação continuou sendo a mesma, ou seja, alelos não-expandidos maiores corresponderam a uma ii mais precoce. No Brasil, um estudo abrangente confirmou esses resultados, com 59,6% e 6,01% de influência do alelo expandido e alelo normal, respectivamente (França et al. 2012). Mas, mesmo levando em conta esse fator, o tamanho do alelo normal apresenta uma contribuição pequena e ainda permanece uma grande porção da variabilidade sem uma causa específica.

Uma outra área de investigação é a pesquisa de variabilidade nas regiões regulatórias e seu efeito sobre a ii da doença. Long e colaboradores identificaram dois polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP – *single nucleotide polymorphism*) na região do 3’UTR como potenciais modificadores de ii em MJD/SCA3 (Long et al. 2015). Em uma população chinesa, a variação da ii foi pouco influenciada pelo alelo expandido (<50%), direcionando os pesquisadores para a busca de outros fatores que poderiam influenciar a ii nesses pacientes. O alelo A do rs709930 e o alelo T do rs910369 foram detectados mais frequentemente em pacientes com MJD/SCA3 quando comparado com controles saudáveis. Além disso, eles foram capazes em diminuir a ii de 2 até 4 anos, mostrando um efeito danoso para os pacientes e contribuindo com 2% na variação da ii. Análises semelhantes realizadas na região 5’UTR não identificaram SNPs clinicamente significativos (Bettencourt et al. 2012). Esse estudo encontrou um único SNP (rs3814834) nessa região e tentativas de caracterizar uma função molecular para essa variante não apresentaram resultados.

Além dos SNPs, fatores epigenéticos presentes nas regiões reguladoras foram levantados como possíveis modificadores da doença. A hipermetilação das ilhas de CpG na região promotora foi identificada como potencial modificadora da doença, mas as análises sempre ficam prejudicadas pela influência do efeito do alelo expandido. A redução de 10% da metilação

foi associada com redução de até 2,4 anos na ii, mas esse efeito praticamente desaparece quando considerado em conjunto com o tamanho da expansão e do alelo normal (Emmel et al. 2011). Portanto, não foi possível confirmar ou excluir completamente o efeito da metilação na região promotora do *ATXN3* em pacientes com MJD/SCA3. Estudos mais recentes, realizados em uma população de família chinesas, avaliou o grau de metilação da região promotora do *ATXN3* em irmãos com o mesmo tamanho da expansão, mas com ii diferentes. Dessa forma, a influência dos fatores genéticos já conhecidos foi eliminada e o efeito ambiental minimizado. Os resultados obtidos mostraram níveis de metilação significativamente maiores nos indivíduos com ii mais precoce (Wang et al. 2017), contradizendo os resultados do trabalho anterior. Esses fatos indicam que variações populacionais podem atuar de forma distinta como fatores moduladores na MJD/SCA3.

Além do alto número de investigações realizadas em fatores intragênicos, os potenciais efeitos modificadores de outros genes, além do *ATXN3*, estão sendo amplamente avaliados. Os genes associados a outras doenças neurodegenerativas são alvos desses estudos, com evidências crescentes que apontam para o fato que a biologia molecular da neurodegeneração de uma forma geral é um mecanismo compartilhado ou, pelo menos semelhante, em várias doenças neurodegenerativas (Durrenberger et al. 2015).

Os primeiros genes investigados foram os causadores de outras doenças poliQ, devido ao fato da mutação pertencer ao mesmo grupo e o quadro clínico ser bastante semelhante. Um estudo abrangente do EUROSCA, um consórcio europeu dedicado à pesquisa de SCAs, foi realizado com o objetivo de localizar genes modificadores de doença compartilhados entre as SCAs e outras doenças de expansões trinucleotídicas (Tezenas du Montcel et al. 2014). O estudo foi conduzido utilizando amostras de 1255 pacientes e incluiu oito genes que causam doenças neurodegenerativas por expansões trinucleotídicas. As análises realizadas pelo grupo demonstraram que três genes atuaram como modificadores para MJD/SCA3. Um deles foi o gene *ATXN2*, o qual está associado à ataxia espinocerebelar do tipo 2 (SCA2) (Pulst et al. 1996). Os alelos de tamanho intermediário nesse gene, definidos como aqueles contendo entre 27 e 29 repetições CAG, foram associados com ii precoce quando comparados com alelos *ATXN2* menores. O outro modificador identificado foi o gene *ATN1*, cuja expansão causa a atrofia dentatorubro-palidoluisiana (Koide et al. 1994; Nagafuchi et al. 1994). A interação de *ATN1*

com o alelo expandido no *ATXN3* foi associado à diminuição na ii de MJD/SCA3. O terceiro gene identificado como um potencial neuroprotetor foi o gene *HTT*, o qual, quando expandido causa a doença de Huntington (MacDonald et al. 1993). Nesse estudo, a presença de alelos curtos no gene *HTT* foi associada a um aumento na ii de pacientes com MJD/SCA3. Não foi identificado nenhum efeito dos genes *ATXN1*, *ATXN7*, *TBP* e *CACNA1A* sob a ii de pacientes com MJD/SCA3. Uma série de experimentos confirmatórios foram realizados posteriormente em quatro populações (caucasianas ou asiáticas) para reforçar a associação entre essas doenças. Entretanto, os resultados não foram replicados, provavelmente por diferenças nas frequências alélicas entre populações distintas (Tezenas du Montcel et al. 2014).

Essas interações gênicas foram estudadas em outras populações e os resultados obtidos evidenciam novamente diferenças populacionais. A análise de uma coorte de 102 pacientes brasileiros com MJD/SCA3 não encontrou associação dos genes estudados pelo EUROSCA e nem influência dos mesmos no quadro clínico dos pacientes (de Castilhos et al. 2014). Entretanto, um estudo anterior do mesmo grupo, identificou o gene *ATXN2* como modificador de uma manifestação clínica, fasciculações, em pacientes com MJD/SCA3 (Jardim et al. 2003). Importante ressaltar que, apesar da população ter a mesma origem, os pacientes incluídos foram diferentes.

Além dessas relações dentro da família de doenças neurodegenerativas, existem evidências possivelmente relacionando outros genes além dos acima descritos como modificadores da ii. O mais polêmico é a associação do alelo  $\epsilon 2$  do gene *APOE*. Dois grupos independentes, um deles incluindo 192 indivíduos de populações de ascendência portuguesa (brasileiros, açorianos e portugueses) (Bettencourt et al. 2011a) e outro com 155 chineses (Peng et al. 2014), identificaram o alelo  $\epsilon 2$  como fator de risco para ii precoce. No primeiro, a inclusão de alelo  $\epsilon 2$  nas análises de modelos lineares aumentou significativamente o efeito da variabilidade de 59,8% até 60,9%, e se traduziu clinicamente pela diminuição da ii em até 5 anos. No estudo de Peng e colaboradores, o efeito também foi drástico, com o alelo  $\epsilon 2$  diminuindo a ii em até 4 anos, e aumentando a explicação da variabilidade de 44,6% até 45,9% (Peng et al. 2014). Além da influência do *APOE*, foi descrito o efeito agravante do alelo *IL6\*C* em pacientes com MJD/SCA3, com uma diminuição na ii de até 4 anos (Raposo et al. 2017). O

mesmo estudo também começou a relacionar os mecanismos moleculares da influência do gene *APOE* com o sistema imune, especificamente compartilhando a via molecular do gene *IL6*. Por outro lado, um estudo mais antigo, de Zhou e colaboradores, analisou dados de 403 pacientes asiáticos e não encontrou efeito do alelo  $\epsilon 2$ , mesmo com as frequências alélicas sendo parecidas com as dos dois estudos anteriores (Zhou et al. 2014). Nesse mesmo estudo, que exclui as variantes do gene *APOE* como possíveis modificadores da doença, os autores de novo reforçaram o papel modificador do alelo normal na MJD/SCA3, elevando o valor preditivo de 65,9% até 66,6%.

Como citado anteriormente, o papel da ataxina-3, tanto na forma normal quanto a proteína mutante, ainda não foi elucidado de forma definitiva. Mas, existem evidências que, agregados dessa proteína e de outras doenças poliQs, podem ter a sua agregação alterada por proteínas de choque térmico, tais como hsp70 (Robertson et al. 2010). Na ação dessas proteínas é igualmente importante a função das chaperonas e de enzimas que guiam a sua atividade. E um desses componentes, a proteína CHIP, inspirou a investigação na sua possível papel na MJD/SCA3, sendo que ele é capaz de suprimir os agregados *in vivo* e *in vitro* (Miller et al. 2005). Um estudo realizado com pacientes brasileiros investigou o possível efeito neuroprotetor de polimorfismos no gene *CHIP* em 210 pacientes com MJD/SCA3 (França et al. 2012). Entretanto, apesar da fundamentação teórica, não foram encontrados polimorfismos com efeito modificador na coorte estudada.

Portanto, a quantidade de dados produzidos até o momento demonstra a dificuldade da identificação de qualquer modificador na MJD/SCA3, sendo que o efeito de variabilidade populacional e/ou do tamanho amostral do estudo. Desta forma, permanece em aberto a procura por modificadores que possam explicar a variabilidade de ii que não é explicada pela variação do tamanho dos alelos mutantes no gene *ATXN3* em pacientes com MJD/SCA3.

#### 4. C9orf72

C9orf72 (*chromosome 9 open reading frame 72*) é uma proteína em grande parte ignorada pelos estudos científicos até 2011, quando foi descrita como a etiologia molecular para um grande número de pacientes de esclerose lateral amiotrófica (ALS - *amyotrophic lateral*

*sclerosis*), demência frontotemporal (FTD - *frontotemporal dementia*) e comorbidade ALS-FTD por dois grupos independentes (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011). A partir daí, ocorreu um aumento exponencial de número de estudos conduzidos associados a essa proteína e seu gene.

#### a. Estrutura e Função do gene *C9orf72*

O gene *C9orf72* está localizado no braço curto do cromossomo 9, região 21.2. Atualmente, duas mutações patogênicas foram descritas nesse gene: um região de expansão hexanucleotídica (GGGGCC)<sub>n</sub>, também conhecida como G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011) e uma mutação de mudança de quadro de leitura em um sítio de *splicing*, com essa última tendo sido descrita em um único paciente (Liu et al. 2016). A expansão na região não-codificante desse gene é o principal alvo de estudo do *C9orf72*. O transcrito está sujeito a um mecanismo de *splicing* alternativo complexo, gerando três variantes de pré-RNA mensageiros (mRNA), codificando um total de duas isoformas da proteína C9orf72 (DeJesus-Hernandez et al. 2011).

Estruturalmente falando, a proteína C9orf72 é homóloga a proteínas da classe DENN (Zhang et al. 2012; Levine et al. 2013), as quais têm função de regulamento das Rab GTPases. A função exata da proteína codificada pelo gene ainda não é conhecida, mas há implicações da proteína na regulação do tráfego endossomal devido a sua interação com proteínas da classe Rab GTPases (Farg et al. 2014). Além disso, interações com proteínas Rab implicam o papel da C9orf72 no processo de autofagia (Webster et al. 2016). Como a proteína só recentemente entrou na visão popular da pesquisa, mais estudos são necessários para determinação de todas as interações de C9orf72 nos processos celulares.

#### b. Expansão GGGGCC

Em 2011, DeJesus-Hernandez e colaboradores e Renton e colaboradores descreveram simultaneamente uma repetição hexanucleotídica G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, localizada na região não-codificante no

íntron 1 do gene *C9orf72* (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011). O aumento do número dessas repetições foi associado com a etiologia de até 20% dos casos de ALS-FTD. A partir daí o papel do *C9orf72* vem sendo investigado por vários grupos em doenças neurodegenerativas. Devido ao fato da região ser rica em GC, a repetição pode formar estruturas do tipo G-quadruplex, uma interação de ligação de hidrogênio de Hoogsteen, que impede a ação da DNA polimerase (Sen and Gilbert 1988).

O mecanismo molecular pelo qual essa mutação se torna patogênica ainda não está definido, mas existem três hipóteses parcialmente descritas e demonstradas experimentalmente. A primeira postula que a mutação produz haploinsuficiência da proteína *C9orf72* no organismo, com estudos mostrando que os níveis de mRNA caem drasticamente em pacientes portadores da expansão hexanucleotídica (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Gijssels et al. 2012), provavelmente pelo impedimento da transcrição do gene (Haeusler et al. 2014). Mesmo com essas evidências moleculares, experimentos *in vivo* apresentam uma outra perspectiva: a depleção de mRNA do *C9orf72* nos neurônios dos murinos não resultou em desenvolvimento de uma série de sintomas neuromotores (Lagier-Tourenne et al. 2013; Koppers et al. 2015). Além disso, a herança dominante da doença em humanos é contrária a teoria de perda de função, sendo que doenças autossômicas dominantes são causadas, principalmente, por mutações de ganho de função. Com a expansão no gene fazendo parte de um íntron, é pouco provável que a estrutura da proteína seria modificada pela presença dessa mutação específica.

A segunda hipótese é o papel da toxicidade de *foci* de RNA formados por transcritos do alelo mutante (Gendron et al. 2014). Uma evidência que apoia essa hipótese é proveniente de uma outra doença neurodegenerativa: a distrofia miotônica do tipo 1 (DM1). A mutação responsável por DM1 se localiza numa região não codificante do gene-causador da doença, assim como a expansão G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>. Especificamente, uma expansão CTG na região 3'UTR do gene *DMPK* (*myotonic dystrophy protein kinase*) resulta no desenvolvimento da DM1 (Brook et al. 1992). O mecanismo molecular pelo qual essa mutação interfere no metabolismo normal da célula foi caracterizado como interferência nos mecanismos de processamento do RNA, incluindo *splicing* alternativo (Lin et al. 2006), e sequestro de proteína MBNL1 (*muscle blind-like protein 1*) (Miller et al. 2000). Baseando nessa prerrogativa, foram investigados os efeitos dos *foci* de RNA no caso de expansão no gene *C9orf72* e foram encontrados resultados

semelhantes ao que ocorre no produto gênico de *DMPK*. Uma série de proteínas que se ligam ao RNA foram colocalizadas com os *foci* de RNA. Uma delas, por exemplo, é a Pur- $\alpha$ , uma proteína ubíqua e multifuncional, que reconhece a região GGGGCC como ligante de forma específica (Xu et al. 2013). Além disso, outra via molecular foi proposta por Burguete e colaboradores em 2015: os grânulos de RNA tendem a se deslocar, se incorporam com as partículas ribonucleoproteicas e, com isso, desencadeiam a disfunção de ramificação dendrítica (Burguete et al. 2015). Esse novo mecanismo mostrou que a ação neurodegenerativa da expansão hexanucleotídica não se limita ao núcleo e à maquinaria transcriptional, mas provavelmente está também envolvida nos passos posteriores do tráfego de RNA dentro da célula. A validade dessa hipótese está sendo contestada por sua ligação íntima com a terceira hipótese: a toxicidade dos dipeptídeos.

Mesmo sendo localizada fora da região codificante, é possível ocorrer a tradução da região da repetição a partir de um mecanismo denominado tradução associada a repetição iniciada por não-ATG (tradução RAN ou *RNA-translation – repeat-associated non-ATG translation*). Esse mecanismo permite que regiões altamente repetitivas, tais como a expansão G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, sirvam como sequência iniciadora de tradução, levando à produção de proteínas não-canônicas (Koppers et al. 2015). A natureza da mutação permite seis diferentes quadros de leitura, que são capazes de resultar em cinco tipos de proteínas dipeptídicas, as quais são capazes de se aglomerar em inclusões proteicas parecidas com as das doenças poliQ (Ash et al. 2013; Mori et al. 2013). Os mecanismos exatos sobre como essas proteínas levam à degeneração estão sendo amplamente discutidos, com teorias que incluem a falha nas vias de degeneração proteica, a formação de folhas amiloides ou a sobrecarga de estresse celular sobre os sistemas de transporte intracelulares. Proponentes dessa hipótese frequentemente entram em conflito com os da teoria de toxicidade de *foci* de RNA, afirmando que a toxicidade vem das proteínas e não dos transcritos, trazendo como comprovação experimentos com utilização de tratos de expansões interrompidos, que não são capazes de desencadear a tradução RAN (Mizielinska et al. 2014). A dificuldade em apoiar essa hipótese vem da ausência de aglomerados de proteínas dipeptídicas nas amostras pós-morte dos pacientes, confundindo ainda mais o mistério da neurodegeneração mediada por *C9orf72*.

### c. Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência Frontotemporal

A esclerose lateral amiotrófica (ALS – *amyotrophic lateral sclerosis*), uma doença neurodegenerativa clássica é caracterizada por ii tardio e uma grande variedade de anomalias relacionadas com o movimento ou a atividade muscular e, na sua grande maioria, de etiologia desconhecida (Zarei et al. 2015). A demência frontotemporal (FTD – *Frontotemporal dementia*) é um termo amplamente utilizado para descrever uma série de síndromes de demência patologicamente heterogêneas e distintas do mal do Alzheimer (Warren et al. 2013). Apesar de ter um quadro clínico altamente variável, uma característica comum da grande maioria dos pacientes com FTD é a presença de inclusões proteicas semelhantes as das doenças neurodegenerativas como MJD/SCA3 (Rabinovici and Miller 2010). A história de comorbidade ALS-FTD é longa, mas só recentemente, com avanços nas tecnologias moleculares, foi proposta a teoria que essas duas doenças possam representar dois extremos de um espectro único de vias moleculares neurodegenerativas comuns (Ferrari et al. 2011). Até 2011, a grande maioria dos casos não tinha nenhuma explicação molecular descrita, com poucos casos de ALS sendo causados por mutações no gene *SOD1*, resultando em inclusões da proteína mutante nos neurônios (Rosen et al. 1993). O grande avanço na área foi a descoberta de expansão G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> no gene *C9orf72* como principal agente etiológico no espectro ALS-FTD, podendo explicar até 34,2% dos casos de ALS e 25,9% dos casos de FTD puro (van Blitterswijk et al. 2012).

Em termos de mecanismos específicos às doenças ALS-FTD relacionadas à expansão, estudos mostram resultados contraditórios. Análises *in vitro* dos transcritos de *C9orf72* humano demonstraram a produção de dipeptídeos tóxicos a partir de tradução RAN (Tabet et al. 2018). Por outro lado, modelos funcionais em *zebrafish* elimina esses tratos tóxicos como a etiologia da doença e apontam para a toxicidade de RNA como culpado (Swinnen et al. 2018), sendo que os transcritos de *C9orf72* demonstravam afinidade para subunidades ribossomais. Uma característica importante é que a presença da expansão no *C9orf72* não indica ausência de outros sinais neurodegenerativos nos pacientes. Um exemplo é a presença das inclusões da proteína TDP-43 em grande número de casos com a expansão de G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (Boeve et al. 2012; Mahoney et al. 2012).

Portanto, a ocorrência de expansão do hexanucleotídeo G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> no gene *C9orf72* está amplamente descrita, mas o efeito dessa alteração no processo de neurodegeneração ainda precisa ser elucidado.

## 5. Justificativa

O estudo de genes modificadores de doenças neurodegenerativas apresenta grande interesse para maior conhecimento tanto da fisiopatologia de MJD/SCA3 quanto para o desenvolvimento de terapias para essa doença. Conforme dito anteriormente, genes relacionados com outras doenças neurodegenerativas podem interagir e podem atuar como modificadores de outras patologias com mecanismos semelhantes. Além disso, existem uma série de evidências para a possível relação entre MJD/SCA3 e *C9orf72*, que serão descritos abaixo.

A MJD/SCA3 e a ALS compartilham vias moleculares de degradação proteica. Tanto a ataxina-3 quanto a superóxido-dismutase 1 (SOD1) foram associadas com vias proteicas que passam pelo retículo endoplasmático (ER, *endoplasmatic reticulum*). A interação entre essas duas proteínas foi demonstrada e essa interação é regulada por um representante de enzimas do ER: a gp78 (Ying et al. 2009). Esse estudo demonstrou a estreita relação da gp78 com as proteínas ataxina-3 e SOD1, sendo que, quando superexpressa, ela é capaz de regular os aglomerados de proteínas mutantes através de ubiquitinação e, conseqüentemente, envio para vias de degradação.

Além da via de degradação compartilhada, foram documentados casos de indivíduos com expansão hexanucleotídica que compartilhavam quadros clínicos e patológicos com pacientes de MJD/SCA3. Um paciente dinamarquês foi identificado como carregador da expansão, com histórico familiar de ataxia, que não entra no quadro clássico de ALS (Lindquist et al. 2013). Na França, um grupo identificou caso de pura ataxia cerebelar ligada com a expansão G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, indicando que existe um mecanismo molecular do *C9orf72* que atua na degradação de cerebelo (Corcia et al. 2016). O caso de paciente italiano carregador da mutação e demonstrando as sintomas de desordens psiquiátricas e ataxia cerebelar progressiva (Meloni et al. 2017). Esses casos clínicos mostram claramente que o papel de *C9orf72* não está confinado

para as vias de doenças de ALS-FTD, e demonstram a necessidade em investigar a influência desse gene em outras doenças neurodegenerativas.

Levando em consideração o papel do gp78 e esses casos clínicos, a questão da relação de *C9orf72* como potencial modificador da MJD/SCA3 permanecia aberto. Até o momento, um único estudo foi realizado na investigação dessa interação (Wang et al. 2015). Nesse estudo, foi descrito o possível papel dos alelos normais “intermediários” (alelos com 7 a 30 repetições). Foi observado que pacientes com pelo menos um alelo intermediário apresentara ii aproximadamente 3 anos mais cedo do que os pacientes com dois alelos de até 6 repetições, inclusive. Portanto, as evidências apresentadas indicam um possível papel das repetições nucleotídicas no *C9orf72* como modificador na MJD/SCA3.

## **II. Objetivos**

### **1. Objetivo Geral**

Avaliar a repetição hexanucleotídica GGGGCC no gene *C9orf72* como possível modificador da idade de início em pacientes brasileiros com doença do Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar tipo 3 (MJD/SCA3).

### **2. Objetivos Específicos**

- Determinar a distribuição alélica da repetição GGGGCC no gene *C9orf72* em amostras controles;
- Avaliar a distribuição alélica GGGGCC no gene *C9orf72* em pacientes com MJD/SCA3;
- Comparar a distribuição alélica nos dois grupos (controles e pacientes com MJD/SCA3);
- Dividir os pacientes com MJD/SCA3 em dois grupos de acordo com a presença ou não de alelos “intermediários” no gene *C9orf72* e comparar com a ii da doença de uma forma geral;
- Comparar apenas os pacientes com MJD/SCA3 do grupo de ii precoce e ii tardia de acordo com a expansão no gene *ATXN3* com a distribuição dos alelos normais no gene *C9orf72*.

### **III. Resultados**

Os resultados desse trabalho serão apresentados na forma de dois manuscritos conforme listados abaixo:

- *C9orf72* gene and Cerebellar Ataxia: A Tenuous Relationship – Review
- Analysis of *C9orf72* hexanucleotide repeats length as a potential modifying factor of age of onset in Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3 patients – Original Article

Os dois manuscritos serão submetidos para publicação no periódico *Clinical Genetics*.

#### IV. Discussão e Conclusões

Durante a realização do nosso estudo, efetuamos uma revisão abrangente da literatura, considerando os possíveis papéis de *C9orf72* no desenvolvimento de sintomatologia atáxica. A função principal da proteína *C9orf72* continua desconhecida, o que dificulta a elucidação do mecanismo de desenvolvimento das doenças relacionadas com esse gene. Cada uma das três vias propostas para a ação da proteína *C9orf72* como agente causador da doença podem ser mecanisticamente relacionados com as doenças atáxicas. Um dos mais promissores nessa área de pesquisa é o papel tóxico dos agregados dipeptídicos para a via de agregação (Brettschneider et al. 2012; Hjerpe et al. 2016), que resulta na remoção dos grandes aglomerados proteicos, tais como os que se formam nas doenças poliQ. Mais detalhes podem ser vistos no nosso artigo de revisão.

Além das possíveis vias moleculares de atuação do gene *C9orf72* para o desenvolvimento de ataxias, durante a última década vários estudos clínicos surgiram relacionando esse gene com esse grupo heterogêneo de doenças, com resultados contraditórios. Enquanto relatos de casos individuais mostram uma possível relação entre esse gene e sintomas atáxicos (Goldman et al. 2014; Corcia et al. 2016), estudos abrangentes incluindo um grande número de pacientes negam essa relação (Fogel et al. 2012; He et al. 2016). É importante notar que tipicamente esses estudos de grande escala só consideram a expansão patogênica, em vez de também analisar os alelos normais como fator etiológico.

O único estudo sobre a possível correlação de *C9orf72* com a MJD/SCA3 foi realizado em 2015, numa coorte chinesa. Nesse estudo foi descoberto um possível papel neuroprotetor dos alelos mais curtos nos indivíduos com essa doença (Wang et al. 2015). Levando em consideração a diferença na distribuição dos alelos normais do *C9orf72* nas populações asiáticas e europeias (van der Zee et al. 2013; He et al. 2015), e o fato que populações diferentes podem manifestar ii distintas (Tezenas du Montcel et al. 2014), não seria adequado a aplicação direta desses resultados aos pacientes brasileiros de MJD/SCA3.

Portanto, identificamos inicialmente uma diferença no perfil de frequências alélicas na nossa população comparada com a distribuição trimodal estrita europeia. Isso pode ser devido a influência das outras populações (tanto colonizadoras, como indígenas) na população

brasileira (Manta et al. 2013), mas ainda foi possível observar a grande influência europeia no perfil genético da nossa população. Nenhuma expansão patológica foi detectada nos indivíduos amostrados, conforme esperado.

Em termos da correlação da *C9orf72* com ii nos pacientes de MJD/SCA3, diferentemente dos resultados do Wang, *et al.*, (2015), não observamos influência neuroprotetora dos alelos curtos. Para garantir que isso não seria um resultado que sofre viés do grande número de pacientes com ii estatisticamente esperado, foi utilizada a técnica de amostragem de fenótipos extremos. Levando em consideração só os pacientes com ii muito precoce ou tardia, nenhuma relação do *C9orf72* foi descoberta com nenhum dos grupos. Dentro dos fenótipos extremos, não detectamos a influência do tamanho dos alelos normais sobre a gravidade fenotípica.

Por fim, considerando as informações geradas por esse estudo, na coorte analisada, o tamanho do trato das repetições hexanucleotídicas do gene *C9orf72* não foi identificado como agente modificador da idade de início doença do Machado-Joseph.

## V. Referências Bibliográficas

- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR and Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805–810. doi: 10.1038/nature02998
- Ash PEA, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin W-L, DeJesus-Hernandez M, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW, Rademakers R et al. (2013) Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77:639–646. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.004
- Avila J (2010) Common mechanisms in neurodegeneration. *Nat Med* 16:1372–1372. doi: 10.1038/nm1210-1372a
- Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Cymbron T, Santos C, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Donis KC, Saraiva-Pereira ML et al. (2011a) The APOE  $\epsilon$ 2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 68:1580–1583. doi: 10.1001/archneurol.2011.636
- Bettencourt C, Raposo M, Kazachkova N, Santos C, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Donis KC, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB et al. (2012) Sequence Analysis of 5' Regulatory Regions of the Machado–Joseph Disease Gene (ATXN3). *The Cerebellum* 11:1045–1050. doi: 10.1007/s12311-012-0373-7
- Bettencourt C, Santos C, Coutinho P, Rizzu P, Vasconcelos J, Kay T, Cymbron T, Raposo M, Heutink P and Lima M (2011b) Parkinsonian phenotype in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3): a two-case report. *BMC Neurol*. doi: 10.1186/1471-2377-11-131
- Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, DeJesus-Hernandez M, Knopman DS, Pedraza O, Vemuri P, Jones D, Lowe V, Murray ME et al. (2012) Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain* 135:765–783. doi: 10.1093/brain/aws004
- Brettschneider J, Van Deerlin VM, Robinson JL, Kwong L, Lee EB, Ali YO, Safren N, Monteiro MJ, Toledo JB, Elman L et al. (2012) Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTL

- indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol (Berl)* 123:825–839. doi: 10.1007/s00401-012-0970-z
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion J-P and Hudson T (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68:799–808.
- Buhmann C, Bussopulos A and Oechsner M (2003) Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 18:219–221. doi: 10.1002/mds.10322
- Burguete AS, Almeida S, Gao F-B, Kalb R, Akins MR and Bonini NM (2015) GGGGCC microsatellite RNA is neuritically localized, induces branching defects, and perturbs transport granule function. *eLife* 4:e08881. doi: 10.7554/eLife.08881
- Burnett B, Li F and Pittman RN (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12:3195–3205. doi: 10.1093/hmg/ddg344
- Cannas A, Solla P, Borghero G, Floris GL, Chio A, Mascia MM, Modugno N, Muroli A, Orosio G, Di Stefano F et al. (2015) C9ORF72 intermediate repeat expansion in patients affected by atypical parkinsonian syndromes or Parkinson's disease complicated by psychosis or dementia in a Sardinian population. *J Neurol* 262:2498–2503. doi: 10.1007/s00415-015-7873-6
- Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A and Paulson HL (2002) Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 99:9310–9315.
- Chow MKM, Mackay JP, Whisstock JC, Scanlon MJ and Bottomley SP (2004) Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 322:387–394. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.131
- Cintra VP, Lourenço CM, Marques SE, de Oliveira LM, Tumas V and Marques W (2014) Mutational screening of 320 Brazilian patients with autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *J Neurol Sci* 347:375–379. doi: 10.1016/j.jns.2014.10.036
- Corcia P, Vourc'h P, Guennoc A-M, Amador MDM, Blasco H, Andres C, Couratier P, Gordon PH and Meininger V (2016) Pure cerebellar ataxia linked to large C9orf72 repeat

- expansion. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* 17:301–303. doi: 10.3109/21678421.2015.1113298
- Coutinho P and Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28:703–703. doi: 10.1212/WNL.28.7.703
- de Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, Lima MA de FD d et al. (2014) Spinocerebellar Ataxias in Brazil—Frequencies and Modulating Effects of Related Genes. *The Cerebellum* 13:17–28. doi: 10.1007/s12311-013-0510-y
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J et al. (2011) Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 72:245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011
- DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P and MacLeod P (1996) A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 59:119–127.
- Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, Chneiweiss H, Benomar A, Lyon-Caen O, Julien J et al. (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 39:490–499. doi: 10.1002/ana.410390411
- Durrenberger PF, Fernando FS, Kashefi SN, Bonnert TP, Seilhean D, Nait-Oumesmar B, Schmitt A, Gebicke-Haerter PJ, Falkai P, Grünblatt E et al. (2015) Common mechanisms in neurodegeneration and neuroinflammation: a BrainNet Europe gene expression microarray study. *J Neural Transm Vienna Austria* 122:1055–1068. doi: 10.1007/s00702-014-1293-0
- Emmel V, Alonso I, Jardim L, Saraiva-Pereira M and Sequeiros J (2011) Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients? *Clin Genet* 79:100–102. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01508.x

- Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, Halloran MA, Gleeson PA, Blair IP, Soo KY et al. (2014) C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet* 23:3579–3595. doi: 10.1093/hmg/ddu068
- Ferrari R, Kapogiannis D, Huey ED and Momeni P (2011) FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res* 8:273–294.
- Fogel BL, Pribadi M, Pi S, Perlman SL, Geschwind DH and Coppola G (2012) C9ORF72 Expansion is Not a Significant Cause of Sporadic Spinocerebellar Ataxia. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 27:1835–1836. doi: 10.1002/mds.25245
- França MC, Emmel VE, D'Abreu A, Maurer-Morelli CV, Secolin R, Bonadia LC, da Silva MS, Nucci A, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML et al. (2012) Normal ATXN3 Allele but Not CHIP Polymorphisms Modulates Age at Onset in Machado–Joseph Disease. *Front Neurol*. doi: 10.3389/fneur.2012.00164
- Gammon K (2014) Neurodegenerative disease: brain windfall. *Nature* 515:299–300.
- Gendron TF, Belzil VV, Zhang Y-J and Petrucelli L (2014) Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol (Berl)* 127:359–376.
- Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Philtjens S, Kleinberger G, Janssens J, Bettens K, Van Cauwenberghe C, Pereson S et al. (2012) A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol* 11:54–65. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70261-7
- Goldman J, Quinzii CM, Dunning-Broadbent J, Waters C, Mitsumoto H, Brannagan TH, Cosentino S, Huey E, Nagy P and Kuo S-H (2014) Multiple System Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis in a Family with Hexanucleotide Repeat Expansions in C9orf72. *JAMA Neurol* 71:771–774. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5762
- González-Zaldívar Y, Vázquez-Mojena Y, Laffita-Mesa JM, Almaguer-Mederos LE, Rodríguez-Labrada R, Sánchez-Cruz G, Aguilera-Rodríguez R, Cruz-Mariño T, Canales-Ochoa N, MacLeod P et al. (2015) Epidemiological, clinical, and molecular characterization of Cuban families with spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Cerebellum Ataxias* 2:1. doi: 10.1186/s40673-015-0020-4

- Gu W, Ma H, Wang K, Jin M, Zhou Y, Liu X, Wang G and Shen Y (2004) The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol* 52:107–111. doi: 10.1159/000080221
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR and Sakaguchi AY (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234–238.
- Gwinn-Hardy K, Singleton A, O'Suilleabhain P, Boss M, Nicholl D, Adam A, Hussey J, Critchley P, Hardy J and Farrer M (2001) Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch Neurol* 58:296–299.
- Haass C (2010) Initiation and propagation of neurodegeneration. *Nat Med* 16:1201–1204. doi: 10.1038/nm.2223
- Haberhausen G, Damian MS, Leweke F and Müller U (1995) Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci* 132:71–75.
- Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EAJ, Shaw PG, Kim M-S, Maragakis NJ, Troncoso JC, Pandey A, Sattler R et al. (2014) C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 507:195–200. doi: 10.1038/nature13124
- He J, Tang L, Benyamin B, Shah S, Hemani G, Liu R, Ye S, Liu X, Ma Y, Zhang H et al. (2015) C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in Chinese sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 36:2660.e1–8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.06.002
- He M, Yan W-Q, Zeng S, Liu Z, Zhou Y, Zeng X-F, Zeng J-S, Jiang H, Shen L, Tang B-S et al. (2016) C9ORF72 repeat expansion is not detected in sporadic ataxia patients in mainland China. *J Neurol Sci* 361:181–183. doi: 10.1016/j.jns.2015.12.034
- Hjerpe R, Bett JS, Keuss MJ, Solovyova A, McWilliams TG, Johnson C, Sahu I, Varghese J, Wood N, Wightman M et al. (2016) UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell* 166:935–949. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.001
- Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F et al. (2001) The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 46:413–422. doi: 10.1007/s100380170060

- Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, Rogaeva EA, Sasaki H, Wakisaka A, Zhou Y-X, Takano H, Endo K and Sanpei K (1996) 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 Mol Genet* 5:923–932.
- Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S and Nakamura Y (2013) Differences in dysphagia between spinocerebellar ataxia type 3 and type 6. *Dysphagia* 28:413–418. doi: 10.1007/s00455-013-9450-4
- Jardim L, Silveira I, Pereira ML, do Céu Moreira M, Mendonça P, Sequeiros J and Giugliani R (2003) Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand* 107:211–214.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J and Giugliani R (2001a) Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)<sub>n</sub>. *Arch Neurol* 58:899–904.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J and Giugliani R (2001b) Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand* 104:224–231.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Céu Moreira M, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J and Giugliani R (2001c) A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248:870–876.
- Jayadev S and Bird TD (2013) Hereditary ataxias: overview. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 15:673–683. doi: 10.1038/gim.2013.28
- Jellinger KA (2010) Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* 14:457–487. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x
- Jennekens FGI (2014) A short history of the notion of neurodegenerative disease. *J Hist Neurosci* 23:85–94. doi: 10.1080/0964704X.2013.809297
- Katsuno M, Adachi H, Waza M, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M and Sobue G (2006) Pathogenesis, animal models and therapeutics in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp Neurol* 200:8–18. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.021

- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M and Akiguchi I (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221–228. doi: 10.1038/ng1194-221
- Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaka F and Sobue G (2004) Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 61:1757–1760. doi: 10.1001/archneur.61.11.1757
- Klausen PR (2007) Trends in birth defects research. Nova Biomedical Books, New York
- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A and Hayashi T (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6:9–13. doi: 10.1038/ng0194-9
- Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng H, Terpstra ML, Zundel CAC, Vieira de Sá R, Schellevis RD, Waite AJ, Blake DJ, Veldink JH et al. (2015) C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol* 78:426–438. doi: 10.1002/ana.24453
- Kovacs GG (2016) Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17020189
- Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li H-R, Jiang J, Watt AT, Chun S and Katz M (2013) Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 110:E4530–E4539.
- Lee WY, Jin DK, Oh MR, Lee JE, Song SM, Lee EA, Kim G-M, Chung JS and Lee KH (2003) Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Korean patients. *Arch Neurol* 60:858–863. doi: 10.1001/archneur.60.6.858
- Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH and Hayes MJ (2013) The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics* 29:499–503. doi: 10.1093/bioinformatics/bts725
- Li F, Macfarlan T, Pittman RN and Chakravarti D (2002) Ataxin-3 Is a Histone-binding Protein with Two Independent Transcriptional Corepressor Activities. *J Biol Chem* 277:45004–45012. doi: 10.1074/jbc.M205259200
- Li S and Li X-J (2006) Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol Neurodegener* 1:19. doi: 10.1186/1750-1326-1-19

- Lin MT and Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795. doi: 10.1038/nature05292
- Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, Swanson MS and Thornton CA (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15:2087–2097. doi: 10.1093/hmg/ddl132
- Lindquist S, Duno M, Batbayli M, Puschmann A, Braendgaard H, Mardosiene S, Svenstrup K, Pinborg L, Vestergaard K, Hjermind L et al. (2013) Corticobasal and ataxia syndromes widen the spectrum of C9ORF72 hexanucleotide expansion disease. *Clin Genet* 83:279–283. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01903.x
- Liu F, Liu Q, Lu CX, Cui B, Guo XN, Wang RR, Liu MS, Li XG, Cui L and Zhang X (2016) Identification of a novel loss-of-function C9orf72 splice site mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 47:219.e1-219.e5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.027
- Long Z, Chen Z, Wang C, Huang F, Peng H, Hou X, Ding D, Ye W, Wang J, Pan Q et al. (2015) Two novel SNPs in ATXN3 3' UTR may decrease age at onset of SCA3/MJD in Chinese patients. *PloS One* 10:e0117488. doi: 10.1371/journal.pone.0117488
- MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, Taylor SA, James M and Groot N (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971–983.
- Maciel P, Costa MC, Ferro A, Rousseau M, Santos CS, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P and Sequeiros J (2001) Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58:1821–1827.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimarães J and Loureiro JE (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57:54–61.
- Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, Yeatman T, Warrington EK, Schott JM, Fox NC et al. (2012) Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 135:736–750. doi: 10.1093/brain/awr361

- Manta FS de N, Pereira R, Vianna R, Araújo ARB de, Gitaí DLG, Silva DA da, Wolfgramm E de V, Pontes I da M, Aguiar JI, Moraes MO et al. (2013) Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLOS ONE* 8:e75145. doi: 10.1371/journal.pone.0075145
- Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T and Nishio T (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado—Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4:807–812.
- Matilla T, McCall A, Subramony SH and Zoghbi HY (1995) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 3 and Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 38:68–72. doi: 10.1002/ana.410380113
- McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G et al. (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9:2197–2202.
- Meloni M, Farris R, Solla P, Mascia MM, Marrosu F and Cannas A (2017) C9ORF72 Intermediate Repeat Expansion in a Patient With Psychiatric Disorders and Progressive Cerebellar Ataxia. *The Neurologist* 22:245. doi: 10.1097/NRL.0000000000000147
- Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA and Swanson MS (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19:4439–4448. doi: 10.1093/emboj/19.17.4439
- Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, Williams A, Rodriguez-Lebron E, Harper SQ, Davidson BL, Rebagliati MR and Paulson HL (2005) CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:9152–9161. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3001-05.2005
- Mizielinska S, Gronke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, Moens T, Norona FE, Woollacott IOC, Pietrzyk J et al. (2014) C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science* 345:1192–1194. doi: 10.1126/science.1256800
- Mori K, Arzberger T, Grässer FA, Gijssels I, May S, Rentzsch K, Weng S-M, Schludi MH, van der Zee J, Cruts M et al. (2013) Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72

- hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol (Berl)* 126:881–893. doi: 10.1007/s00401-013-1189-3
- Nagafuchi S, Yanagisawa H, Ohsaki E, Shirayama T, Tadokoro K, Inoue T and Yamada M (1994) Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 8:177–182. doi: 10.1038/ng1094-177
- Nakano KK, Dawson DM and Spence A (1972) Machado disease A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22:49–49.
- Nishiyama K, Murayama S, Goto J, Watanabe M, Hashida H, Kanazawa I, Katayama S, Nakamura S and Nomura Y (1996) Regional and cellular expression of the Machado-Joseph disease gene in brains of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 40:776–781.
- Orr HT and Zoghbi HY (2007) Trinucleotide Repeat Disorders. *Annu Rev Neurosci* 30:575–621. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042
- Padiath QS, Srivastava AK, Roy S, Jain S and Brahmachari SK (2005) Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B:124–126. doi: 10.1002/ajmg.b.30088
- Peng H, Wang C, Chen Z, Sun Z, Jiao B, Li K, Huang F, Hou X, Wang J, Shen L et al. (2014) APOE ε2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population. *Neurobiol Aging* 35:2179.e15–18. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.020
- Przedborski S, Vila M and Jackson-Lewis V (2003) Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *J Clin Invest* 111:3–10. doi: 10.1172/JCI200317522
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunke A et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14:269–276. doi: 10.1038/ng1196-269
- Rabinovici GD and Miller BL (2010) Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs* 24:375–398. doi: 10.2165/11533100-000000000-00000

- Raposo M, Bettencourt C, Ramos A, Kazachkova N, Vasconcelos J, Kay T, Bruges-Armas J and Lima M (2017) Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients. *NeuroMolecular Med* 19:41–45. doi: 10.1007/s12017-016-8416-8
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L et al. (2011) A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257–268. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010
- Robertson AL, Headey SJ, Saunders HM, Ecroyd H, Scanlon MJ, Carver JA and Bottomley SP (2010) Small heat-shock proteins interact with a flanking domain to suppress polyglutamine aggregation. *Proc Natl Acad Sci* 107:10424–10429.
- Rodrigues A-J, Coppola G, Santos C, Costa M do C, Ailion M, Sequeiros J, Geschwind DH and Maciel P (2007) Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB J* 21:1126–1136. doi: 10.1096/fj.06-7002com
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59. doi: 10.1038/362059a0
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C and Shore P (1976) Autosomal dominant striatonigral degeneration: A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 26:703–703. doi: 10.1212/WNL.26.8.703
- Ruano L, Melo C, Silva MC and Coutinho P (2014) The Global Epidemiology of Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia: A Systematic Review of Prevalence Studies. *Neuroepidemiology* 42:174–183. doi: 10.1159/000358801
- Saute JAM and Jardim LB (2015) Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opin Orphan Drugs* 3:517–535. doi: 10.1517/21678707.2015.1025747
- Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, Trottier Y, Auburger G, Laccone F, Klockgether T, Völpel M, Epplen JT, Schöls L et al. (1998) An Isoform of Ataxin-3 Accumulates in the

- Nucleus of Neuronal Cells in Affected Brain Regions of SCA3 Patients. *Brain Pathol* 8:669–679. doi: 10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x
- Schmitt I, Linden M, Khazneh H, Evert BO, Breuer P, Klockgether T and Wuellner U (2007) Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 362:734–739. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.062
- Sen D and Gilbert W (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334:364–366. doi: 10.1038/334364a0
- Shakkottai VG and Fogel BL (2013) Clinical Neurogenetics. *Neurol Clin* 31:987–1007. doi: 10.1016/j.ncl.2013.04.006
- Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K and Sano Y (2000) Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 26:29–36.
- St George-Hyslop P, Rogaeva E, Huterer J, Tsuda T, Santos J, Haines JL, Schlumpf K, Rogaev EI, Liang Y and McLachlan DC (1994) Machado-Joseph disease in pedigrees of Azorean descent is linked to chromosome 14. *Am J Hum Genet* 55:120.
- Stevanin G, Cancel G, Dürr A, Chneiweiss H, Dubourg O, Weissenbach J, Cann HM, Agid Y and Brice A (1995) The gene for spinal cerebellar ataxia 3 (SCA3) is located in a region of approximately 3 cM on chromosome 14q24. 3-q32. 2. *Am J Hum Genet* 56:193.
- Stevanin G, Chneiweiss H, Le Guern E, Ravise N, Dürr A, Penet C, Agid Y and Brice A (1993) Genetic heterogeneity of autosomal dominant cerebellar ataxia type I: evidence for the existence of a third locus. *Hum Mol Genet* 2:1483–1485.
- Swinnen B, Bento-Abreu A, Gendron TF, Boeynaems S, Bogaert E, Nuyts R, Timmers M, Scheveneels W, Hersmus N, Wang J et al. (2018) A zebrafish model for *C9orf72* ALS reveals RNA toxicity as a pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol (Berl)*. doi: 10.1007/s00401-017-1796-5
- Tabet R, Schaeffer L, Freyermuth F, Jambeau M, Workman M, Lee C-Z, Lin C-C, Jiang J, Jansen-West K, Abou-Hamdan H et al. (2018) CUG initiation and frameshifting enable production of dipeptide repeat proteins from ALS/FTD *C9ORF72* transcripts. *Nat Commun*. doi: 10.1038/s41467-017-02643-5

- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K and Ohta S (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4:300–304. doi: 10.1038/ng0793-300
- Teive HA (2009) Spinocerebellar ataxias. *Arq Neuropsiquiatr* 67:1133–1142.
- Teive HAG, Munhoz RP, Arruda WO, Lopes-Cendes I, Raskin S, Werneck LC and Ashizawa T (2012) Spinocerebellar ataxias: genotype-phenotype correlations in 104 Brazilian families. *Clin Sao Paulo Braz* 67:443–449.
- Tezenas du Montcel S, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, Forlani S, Rakowicz M, Schöls L, Mariotti C et al. (2014) Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain J Neurol* 137:2444–2455. doi: 10.1093/brain/awu174
- Thompson LM (2008) Neurodegeneration: A question of balance. *Nature* 452:707. doi: 10.1038/452707a
- Trott A and Houenou LJ (2012) Mini-review: spinocerebellar ataxias: an update of SCA genes. *Recent Pat DNA Gene Seq* 6:115–121.
- Tuite PJ, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH and Lang AE (1995) Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol* 38:684–687. doi: 10.1002/ana.410380422
- Vale J, Bugalho P, Silveira I, Sequeiros J, Guimarães J and Coutinho P (2010) Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 17:124–128. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02757.x
- van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, Gabreëls-Festen A, Praamstra P, Kremer BP and Horstink MW (2001) Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol* 49:805–807.
- van Blitterswijk M, DeJesus-Hernandez M and Rademakers R (2012) How do C9ORF72 repeat expansions cause ALS and FTD: can we learn from other non-coding repeat expansion disorders? *Curr Opin Neurol* 25:689–700. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835a3efb
- van de Warrenburg BPC, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D et al. (2002) Spinocerebellar

- ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58:702–708.
- van der Zee J, Gijssels I, Dillen L, Van Langenhove T, Theuns J, Engelborghs S, Philtjens S, Vandenbulcke M, Sleegers K, Sieben A et al. (2013) A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLN: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum Mutat* 34:363–373. doi: 10.1002/humu.22244
- Wang C, Chen Z, Yang F, Jiao B, Peng H, Shi Y, Wang Y, Huang F, Wang J, Shen L et al. (2015) Analysis of the GGGGCC Repeat Expansions of the C9orf72 Gene in SCA3/MJD Patients from China. *PLOS ONE* 10:e0130336. doi: 10.1371/journal.pone.0130336
- Wang C, Peng H, Li J, Ding D, Chen Z, Long Z, Peng Y, Zhou X, Ye W, Li K et al. (2017) Alteration of methylation status in the ATXN3 gene promoter region is linked to the SCA3/MJD. *Neurobiol Aging* 53:192.e5-192.e10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.014
- Wang Y, Du J, Wang J, Chen J, Chen C, Luo Y, Xiao Z, Jiang H, Yan X, Xia K et al. (2009) Six cases of SCA3/MJD patients that mimic hereditary spastic paraplegia in clinic. *J Neurol Sci* 285:121–124. doi: 10.1016/j.jns.2009.06.027
- Warren JD, Rohrer JD and Rossor MN (2013) Clinical review. Frontotemporal dementia. *BMJ* 347:f4827.
- Webster CP, Smith EF, Bauer CS, Moller A, Hautbergue GM, Ferraiuolo L, Myszczyńska MA, Higginbottom A, Walsh MJ, Whitworth AJ et al. (2016) The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *EMBO J* 35:1656–1676. doi: 10.15252/embj.201694401
- Wolf AE, Mourão L, França MC, Machado Júnior AJ and Crespo AN (2017) Phonoarticulation in spinocerebellar ataxia type 3. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg* 274:1139–1145. doi: 10.1007/s00405-016-4240-x
- Woods BT and Schaumburg HH (1972) Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 17:149–166.

- Xu Z, Poidevin M, Li X, Li Y, Shu L, Nelson DL, Li H, Hales CM, Gearing M and Wingo TS (2013) Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* 110:7778–7783.
- Yang W, Dunlap JR, Andrews RB and Wetzel R (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11:2905–2917.
- Ying Z, Wang H, Fan H, Zhu X, Zhou J, Fei E and Wang G (2009) Gp78, an ER associated E3, promotes SOD1 and ataxin-3 degradation. *Hum Mol Genet* 18:4268–4281. doi: 10.1093/hmg/ddp380
- Young AB (2009) Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come! *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:12722–12728. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3767-09.2009
- Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, Pagani W, Lodin D, Orozco G and China A (2015) A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int* 6:171. doi: 10.4103/2152-7806.169561
- Zhang D, Iyer LM, He F and Aravind L (2012) Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet*. doi: 10.3389/fgene.2012.00283
- Zhou Q, Ni W, Dong Y, Wang N, Gan S-R and Wu Z-Y (2014) The Role of Apolipoprotein E as a Risk Factor for an Earlier Age at Onset for Machado-Joseph Disease Is Doubtful. *PLoS ONE* 9:e111356. doi: 10.1371/journal.pone.0111356
- Zoghbi HY and Orr HT (1999) Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Curr Opin Neurobiol* 9:566–570.