

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Biomarcadores na Doença de Machado-Joseph.

Gabriel Vasata Furtado

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira
Co-orientadora: Profa. Dra. Laura Bannach Jardim

Porto Alegre, novembro de 2018.

Instituições

- Laboratório de Identificação Genética, Centro de pesquisa experimental do Hospital de clínicas de Porto Alegre (HCPA);
- Serviço de Genética Médica do HCPA;
- Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Agências financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundo de incentivo à pesquisa e Eventos do Hospital de clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA)

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer imensamente a minha orientadora, Profa. Doutora Maria Luiza Saraiva-Pereira, a qual me deu todo o apoio necessário para terminar essa tese, me passando muito conhecimento tanto pessoal quando profissional nesses mais de dez anos que trabalhamos juntos, me acolhendo desde a iniciação científica, serei sempre grato.

Agradeço também a minha coorientadora Profa. Dra Laura Bannach Jardim que sempre que precisei esteve disposta a me ajudar e passar os ensinamentos, principalmente na área clínica, mas em muitas outras áreas da vida também.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Identificação Genética, de todos que passaram nesses dez anos que ali estive, e principalmente a Márcia, Eduardo, Ana Carolina e Carolina que durante esses anos de doutorado me aguentaram tanto no laboratório quanto fora dele.

A todo o grupo de neurogenética, especialmente ao Prof. Dr. Jonas Saute.

Ao pessoal do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os quais trabalham bastante, mas é um grupo muito bom e divertido de se estar.

A todos na Holanda, que me receberam muito bem e me fizeram ter uma das melhores experiências da vida, particularmente ao Prof. Harm Kampinga, a que me deu essa oportunidade.

Aos meus amigos, tanto os antigos quanto os feitos durante esses anos de doutorado, vocês sempre me apoiaram e estiveram presentes, não citarei ninguém, pois se és meu amigo sabe que é especial para mim e agradeço sua amizade sempre.

E por fim minha família a quem sempre me apoia em tempos fáceis ou difíceis e não importa a onde estou sei que posso contar com vocês e saibam que vocês podem contar comigo. Marília, José, Daniel e Flávia saibam que amo vocês.

Sumário

Instituições	I
Agências financiadoras:	I
Agradecimentos	II
Sumário	III
Lista de Abreviaturas	V
Resumo	VII
Abstract	IX
1 Introdução	11
1.1 Ataxias Espinocerebelares	11
1.1.1 Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3 (SCA3/MJD)	15
1.1.1.1 Aspectos Clínicos	15
1.1.1.2 Epidemiologia	17
1.1.1.3 Aspectos Moleculares	18
1.1.1.4 Aspectos Genéticos	20
1.2 Biomarcadores	21
1.2.1 Biomarcadores em doenças neurodegenerativas	21
1.2.2 Biomarcadores na doença de Machado-Joseph	23
1.2.2.1 Candidatos a Biomarcadores em MJD	24
1.2.2.1.1 Marcadores de Composição Corporal	24
1.2.2.1.2 Marcadores Neurônais	24
1.2.2.1.3 Marcadores Gerais (sistêmicos)	26
2 Objetivos	28
2.1 Objetivo geral:	28
2.2 Objetivos específicos:	28

3 Resultados	Erro! Indicador não definido.
3.1 Capítulo 1: State biomarkers for Machado-Joseph disease: validation, feasibility and responsiveness to change	Erro! Indicador não definido.
3.2 Capítulo 2: Body composition and peripheral insulin sensitivity in early and pre-symptomatic stages of Machado-Joseph Disease	Erro! Indicador não definido.
3.3 Capítulo 3: Neurotrophins and markers of neuronal damage in Machado-Joseph disease	Erro! Indicador não definido.
3.4 Capítulo 4: <i>GSK3β</i> and <i>HDAC6</i> expression levels as potential biomarkers of lithium in SCA3/MJD	Erro! Indicador não definido.
4 Discussão	Erro! Indicador não definido.
5 Referências	137

Lista de Abreviaturas

- AD – Doença de Alzheimer (*Alzheimer's disease*)
- AO – idade de início (*age of onset*)
- ADAS-Cog – *Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive Subscale*
- BDNF – Proteína Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)
- BMR – taxa metabólica basal (*Basal metabolic rate*)
- CCFS – *Composite-Cerebellar-Functional-Score*
- CTNF – fator neurotrófico ciliar (*Ciliary neurotrophic factor*)
- DRPLA – Atrofia dentatorublopalidolusiana
- GSH-Px – Atividade da glutathiona peroxidase (*glutathione peroxidase activity*)
- GSK3 β - glicogênio sintase cinase 3 beta (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*)
- HD – Doença de Huntington (*Huntington Disease*)
- HDAC6 – histona desacetilase 6 (*Histone Deacetylase 6*)
- HOMA2 – Avaliação do modelo homeostático (*homeostatic model assessment*)
- ICARS – *International Cooperative ataxia rating Scale*
- IMC – Índice de Massa Corporal ou BMI – Body mass index
- INAS – *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*
- MJD – Doença de Machado Joseph (*Machado-Joseph Disease*)
- MRI – Ressonância Magnética
- NESSCA – *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia*
- NGF – fator de crescimento de nervoso (*nerve growth factor*)
- NSE – enolase específica de neurônio (*neuron specific enolase*)
- PD – Doença de Parkinson (*Parkinson's disease*)
- PET – Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons
- SARA – *Scale for the assessment and rating of ataxia*
- SCA – Ataxia Espinocerebelar (*Spinocerebellar Ataxia*)
- SCA3 – Ataxia Espinocerebelar tipo 3 (*Spinocerebellar Ataxia type 3*)
- SD – Desvio padrão (*standart deviation*)
- SPI – Sensibilidade periférica à insulina ou PSI – Peripheral sensitivity to insulin
- TTG – Teste de tolerância à glicose ou GTT – glucose tolerance test

TtoDd – tempo para começar/duração da doença (*Time to onset/disease duration*)

UHDRS – *Unified Huntington's Disease Rating Scale*

UPDRS – *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

VOR – Reflexo vestibulo ocular (*vestibulo-ocular reflex*)

Resumo

A doença de Machado-Joseph (MJD), também conhecida como ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), é uma doença neurodegenerativa de início tardio. SCA3/MJD é a mais comum dentre as ataxias espinocerebelares no mundo, tendo uma alta prevalência no sul do Brasil (seis casos em cada 100.000 indivíduos). SCA3/MJD é caracterizada por degeneração do cerebelo e o principal sintoma é a ataxia; no entanto, os sintomas são variados. A doença inicia normalmente entre os 30-40 anos de idade, podendo se manifestar em qualquer idade até na infância e apresenta uma progressão lenta. A doença é causada por uma mutação no gene *ATXN3*, onde uma expansão de repetições CAG (acima de 52 repetições) leva o indivíduo a manifestar a doença em algum momento da vida, sendo que o número de repetições CAG está associado à idade de início e gravidade da doença. No entanto, o fato das repetições CAG não explicarem completamente essas características e a progressão da doença ser lenta, se faz necessário o estudo de biomarcadores para identificação do início da doença e sua progressão. Nesta tese, serão abordados possíveis biomarcadores de estado e progressão na SCA3/MJD. Através da revisão de estudos com biomarcadores em SCA3/MJD, identificou-se que a proteína NSE, a glutatona peroxidase, o reflexo vestibulo-ocular e vídeo-oculografia são bons candidatos a biomarcadores de estado da doença e as escalas clínicas ainda são os melhores biomarcadores de progressão. Analisando a composição corporal, foi identificado que o IMC está associado a repetições CAG expandidas. No entanto, não achamos associação com a doença, provavelmente devido à seleção dos nossos casos. Além disso, os indivíduos com SCA3/MJD apresentaram maior sensibilidade periférica à insulina quando comparados aos controles. Essa sensibilidade não está associada ao índice de massa corporal (IMC) e se correlaciona com a idade e gravidade da doença. O estudo de proteínas apresentou alteração em algumas neurotrofinas, onde NGF mostrou níveis mais baixos em pacientes com SCA3/MJD do que em controles, além de diminuir os níveis ao longo de 48 semanas. Uma correlação positiva foi observada entre NGF e *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA), além de uma correlação inversa entre BDNF e

Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA). Além disso, confirmamos níveis mais elevados de NSE. O CTNF diminui com a idade em controles, mas correlação semelhante em SCA3/MJD não atingiu significância estatística. A análise de mRNA mostrou que pacientes com SCA3/MJD apresentam expressão reduzida de *HDAC6* e que o uso de lítio aumenta a expressão dos genes *HDAC6* e de *GSK3β*. O presente trabalho inclui o estudo de um amplo espectro de possíveis biomarcadores e é um dos poucos estudos que inclui análises prospectivas. Candidatos a biomarcadores de estado e progressão foram apresentados nesse estudo, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia da doença e para possível uso em futuros ensaios clínico.

Abstract

Machado-Joseph disease (MJD), also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is a late-onset neurodegenerative disease. SCA3/MJD is the most common spinocerebellar ataxias worldwide, being highly prevalent in South Brazil, where it reaches six cases per 100,000 individuals. SCA3/MJD is characterized by cerebellum degeneration and ataxia is the main symptom of the disease. However, symptoms are diverse and progression is slow. The onset of disease usually begins at 30-40 years old, but onset can be seen at any age, even during childhood. SCA3/MJD is caused by a mutation at the *ATXN3* gene, where an expansion of CAG repeats (above 52 repeats) leads to disease onset at some point in life. CAG repeat length is inversely correlated with age of onset and severity. The fact that CAG length does not explain all disease characteristics and the disease presents a slow disease progression; biomarkers studies are required for identification of disease onset and progression. In this thesis, it will be shown some candidates to state and progression biomarkers in SCA3/MJD. Through review of studies on biomarkers, it was identified NSE protein, glutathione peroxidase, vestibulo-ocular reflex and video-oculography as good candidates to biomarkers of disease state and clinical scales are the best progression biomarkers to date. Analyzing body composition, it was identified an association between BMI and CAG expanded repeats. However, no association was found with the disease, probably due to the selection of our cases. In addition, individuals with SCA3/MJD had higher peripheral sensitivity to insulin when compared to controls. This sensitivity was not associated with body mass index (BMI), and correlated with age and disease severity. Alterations in neurotrophins were demonstrated, where lower levels of NGF were shown in SCA3/MJD patients than in controls, with further reduction during 48 weeks long period. A positive correlation was seen between NGF and Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia (NESSCA), and an inverse correlation was seen between BDNF and Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA) in SCA3/MJD at baseline. In addition, higher NSE levels were confirmed. CTNF was shown to decrease with age in controls, and this correlation was not observed in SCA3/MJD. mRNA analyses showed that

SCA3/MJD patients have reduced expression of *HDAC6*, and that treatment with lithium increases *HDAC6* and *GSK3 β* genes expression. We have studied a broad spectrum of possible biomarkers, and this is one of few studies including prospective analyses. Candidates to state and progression biomarkers were presented in this study, contributing to the understanding of disease physiopathology, and for a possible application in future clinical trials.

1 Introdução

1.1 Ataxias Espinocerebelares

As ataxias espinocerebelares (“Spinocerebellar Ataxia” – SCA) são um grupo de doenças neurodegenerativas hereditárias de início tardio com sintomas heterogêneos, sendo principalmente caracterizadas por uma lenta e progressiva disfunção cerebelar, resultando em uma marcha instável (ataxia), perda da coordenação dos movimentos dos membros superiores e problemas na fala (disartria). Elas também podem estar associadas com outros sinais neurológicos, tais como sinais piramidais ou extrapiramidais, comprometimento cognitivo e oftalmoplegia.

Os sintomas citados acima se fazem presentes no grupo como um todo, sendo que algumas delas podem apresentar sintomas específicos. Um exemplo é na SCA7 onde indivíduos veem a apresentar perda visual com retinopatia. Por serem doenças progressivas, os diferentes sintomas tendem a aparecer alguns anos após surgir o primeiro sintoma (este normalmente sendo a ataxia), tornando o diagnóstico baseado apenas na história clínica muitas vezes difícil. Isso faz com que a análise molecular dos genes associados às SCAs para a confirmação das suspeitas clínicas e um correto diagnóstico dos pacientes necessário.

Atualmente, mais de quarenta *loci* distintos associados às formas mendelianas de SCAs são conhecidos (Tabela 1). Todas elas apresentam modo de herança dominante e podem ser subdivididos em três grupos dependendo o tipo de mutação: 1) As ataxias de poliglutaminas, as quais são causadas por uma expansão de CAG nos éxons dos genes correspondentes (também conhecida como doenças de poliglutaminas); 2) ataxias de repetições em regiões não codificantes, e 3) ataxias causadas por mutações convencionais, como deleção, inserção, mutação de ponto e mutação em sítios de splicing (Soong & Paulson, 2007).

Tabela 1 – Genética molecular das ataxias espinocerebelares (adaptado de Bird, 2018)

Doença	Gene ou locus cromossômico	Mutação	Referência
SCA1	<i>ATXN1</i>	Repetições CAG em exon	Subramony & Ashizawa, 2011
SCA2	<i>ATXN2</i>	Repetições CAG em exon	Pulst, 2010
SCA3	<i>ATXN3</i>	Repetições CAG em exon	Paulson, 2015
SCA4	<i>16q22.1</i>	---	Edener et al., 2011
SCA5	<i>SPTBN2</i>	Mutações de ponto ou deleção	Ikeda et al., 2006
SCA6	<i>CACNA1A</i>	Repetições CAG em exon	Gomez, 2008
SCA7	<i>ATXN7</i>	Repetições CAG em exon	Garden, 2012
SCA8	<i>ATXN8/ATXN80S</i>	Repetições CAG-CTG	Ikeda et al., 2007
SCA9 ¹	-----	---	
SCA10	<i>ATXN10</i>	Repetições ATTCT	Matsuura & Ashizawa., 2012
SCA11	<i>TTBK2</i>	Inserção ou deleção (mudança no quadro de leitura)	Houlden, 2008
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	Repetições CAG	Margolis et al., 2011
SCA13	<i>KCNC3</i>	Mutação de ponto	Pulst, 2012
SCA14	<i>PRKCG</i>	Mutação de ponto	Chen et al., 2010
SCA15 ²	<i>ITPR1</i>	Mutação de ponto ou deleção da região 5' do gene	Storey, 2011
SCA16 ²	<i>ITPR1</i>	---	Gardner, 2008
SCA17	<i>TBP</i>	Repetições CAG-CAA em exon	Toyoshima et al., 2012
SCA18	<i>IFRD1</i>	Mutação de ponto (c.514 A>G)	Brkanac et al., 2009
SCA19 ³	<i>KCND3</i>	Deleção de trinucleotídeos	Duarri et al., 2012

Continuação Tabela 1 – Genética molecular das ataxias espinocerebelares.

Doença	Gene ou locus cromossômico	Mutação	Referência
SCA20	11q12.2-11q12.3	Duplicação de 260kb	Storey, 2012
SCA21	SCA21	Mutação de ponto (c.509C>T)	Vuillaume et al., 2002
SCA22 ³	1p21-q21	---	Chung et al., 2003.
SCA23	PDYN	Mutação de ponto	Bakalkin et al., 2010
SCA24 ⁴	1p36	---	Swartz et al., 2002
SCA25	SCA25	---	Stevanin et al., 2005
SCA26	EEF2	Mutação de não repetição	Hekman et al., 2012
SCA27	FGF14	Mutação de ponto ou Inserção (mudança no quadro de leitura)	Van Swieten et al., 2003
SCA28	AFG3L2	Mutação de ponto ou deleção dos exons 14-16	Mariotti et al., 2008
SCA29	ITPR1	Mutação de ponto ou deleção ou mutação em sítio de splicing	Shadrina et al., 2016
SCA30	4q34.3-q35.1	---	Storey et al., 2009
SCA31	BEAN1	Repetições TGGAA	Sato et al., 2009
SCA32	7q32-q33	---	Jiang et al., 2010
SCA34	ELOVL4	Mutação de ponto	Cadieux-Dion et al., 2014
SCA35	TGM6	Mutação de ponto	Wang et al., 2010
SCA36	NOP56	Repetições GGCCTG	Kobayashi et al., 2011
SCA37	DAB1	Repetições ATTTC	Serrano-Munuera et al., 2013
SCA38	ELOVL5	Mutação de ponto	Di Gregorio et al., 2014
SCA40	CCDC88C	Mutação de ponto	Tsoi et al., 2014

Continuação Tabela 1 – Genética molecular das ataxias espinocerebelares.

Doença	Gene ou locus cromossômico	Mutação	Referência
SCA41	<i>TRPC3</i>	Mutação de ponto	Fogel et al. 2015
SCA42	<i>CACNA1G</i>	Mutação de ponto	Coutelier et al., 2015
SCA43	<i>MME</i>	Mutação de ponto	Depondt et al., 2016
SCA44	<i>GRM1</i>	Mutação de ponto	Watson et al., 2017
SCA45	<i>FAT2</i>	Mutação de ponto	Nibbeling et al., 2017
SCA46	<i>PLD3</i>	Mutação de ponto	Nibbeling et al., 2017
SCA47	<i>PUM1</i>	Mutação de ponto	Gennarino et al., 2018
DRPLA	<i>16q22.1</i>	Repetições CAG	Edener et al., 2011.

¹SCA9 foi reservado, no entanto não existe nenhum dado clínico ou molecular da doença. ²SCA16 e SCA15 são as mesmas. ³SCA19 e SCA22 são prováveis formas alélicas no mesmo *locus*. ⁴SCA24 tem padrão de herança autossômico recessivo.

Normalmente as SCAs são denominadas como ataxias espinocerebelares do tipo “N”, onde “N” é um número dado em ordem numérica seguindo a ordem de descobrimento, um caso que foge a essa regra é a atrofia dentatorublo palidolusiana (DRPLA).

A prevalência estimada para as SCAs varia muito entre as regiões, por exemplo 1,6 para cada 100.000 em Singapura (Zhao et al., 2002) e de 5,6:100.000 indivíduos foi encontrada em Portugal (Coutinho et al., 2013), um estudo de meta-análise de ataxias cerebelares hereditárias autossômicas dominantes estimou que a prevalência mundial estimada seria de 2,7 para cada 100.000 indivíduos (Ruano et al., 2014). As SCAs mais comuns são as causadas por expansões CAG em éxons, sendo que a mais comum mundialmente é a SCA3/MJD, seguida por SCA2, SCA1 e SCA6. Apesar disso, em torno de 45% dos pacientes com quadro

clínico de ataxia espinocerebelar ainda permanecem sem diagnóstico (Durr, 2010; Marelli et al., 2011).

1.1.1 Doença de Machado-Joseph ou Ataxia Espinocerebelar tipo 3 (SCA3/MJD)

A doença de Machado-Joseph (*Machado-Joseph Disease* – MJD) foi descrita pela primeira vez em descendentes de famílias de origem açoriana nos Estados Unidos: a família Machado (Nakano et al., 1972), proveniente da ilha de São Miguel, e a família Joseph, proveniente da ilha de Flores (Rosenberg et al., 1976). Em 1994 quando foram realizados os estudos para identificar o gene causador da doença foi descoberto que o gene causador de MJD estava localizado no cromossomo 14, sendo que essa região estava associada à Ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), que até então seria uma ataxia não relacionada com MJD. Depois de identificada a causa específica das duas doenças, ficou comprovada que a mesma mutação que causava MJD era a que causava SCA3, definido as duas como uma mesma doença.

1.1.1.1 Aspectos Clínicos

A SCA3/MJD é uma doença de início tardio, sendo que os pacientes tendem a começar a apresentar sintomas perto dos 40 anos (Sequeiros e Coutinho, 1993). No entanto, a população brasileira mostrou ter um início mais precoce, sendo a idade de início média entre 32 e 34 anos (Lopes-Cendes et al., 1997; Jardim et al., 2001a). Entretanto, casos em pacientes com início aos 4 anos de idade já foram documentados (Carvalho et al., 2008). Após apresentarem os primeiros sintomas os pacientes com SCA3/MJD tem um tempo médio de sobrevida de 21 anos (Kieling et al., 2007).

Por pertencer ao grupo das SCAs, a SCA3/MJD tem sintomas semelhantes às demais doenças pertencentes a esse grupo. Os sintomas começam com instabilidade ao virar, seguido por desequilíbrio de marcha (ataxia). Com o passar dos anos, este progride para um andar de base alargada acompanhada por

incoordenação sutil dos membros superiores e a fala intercortada e mal articulada (disartria). Eventualmente, ataxia da marcha torna-se tão severa que o paciente precisa usar muletas, culminando com o uso de cadeira de rodas. Muitos pacientes também desenvolvem distúrbios oculomotores (nistagmo), espasticidade dos membros inferiores e em alguns casos sinais parkinsonianos. A ataxia de marcha é o primeiro sintoma a ser descrito na grande maioria dos pacientes.

Escalas foram criadas para possibilitar uma melhor avaliação neurológica e assim conseguir uma medida para a gravidade das SCAs. As mais utilizadas são a ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e a SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) (Schmitz-Hubsch et al., 2006; Trouillas et al., 1997). Ambas as escalas visam especificamente a gravidade da ataxia em relação aos componentes axial, membros, ocular e da fala. A escala NESSCA (*Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia*) foi desenvolvida para uma avaliação mais abrangente avaliando 18 itens sendo que 13 deles correspondem a um exame neurológico padrão, analisando achados piramidais, ataxia, ataxia de limbo, nistagmo, retração palpebral, oftalmoparesia, disartria, fasciculação, movimentos distônicos, blefarospasmo, rigidez extrapiramidal, bradicinesia, amiotrofia distal e atrofia óptica e cinco itens dependem das informações relatadas pelos pacientes, mas que representam sintomas comuns apresentados por estes e que trazem desconforto para eles, que são a disfagia, perda sensorial, câimbras, vertigem e disfunção do esfíncter (Kielling et al., 2008).

Um estudo prospectivo de 10 anos de duração utilizando a escala NESSCA demonstrou que os pacientes apresentam uma piora 1,26 pontos por ano (em uma escala que vai de 0 a 40) e que cada CAG adicional na repetição expandida corresponde a uma piora de 0,15 pontos naquela taxa (Jardim et al., 2010), mostrando ser uma doença de avanço clínico lento e progressivo.

Não existe nenhum tratamento específico para as SCA. Porém, sintomas como distônia, câimbras musculares e espasticidade podem ser minimizados com medicamentos e acompanhamento de fisioterapia e fonoaudiologia também são recomendados (Manto & Marmolino, 2009).

1.1.1.2 Epidemiologia

A SCA3/MJD é a SCA mais comum de uma forma geral, sendo responsável por 15% a 45% dos casos (Paulson, 2007; Schöls et al., 2004). Os primeiros indivíduos descritos com SCA3/MJD compartilhavam a origem ancestral açoriana, assim como alguns indivíduos diagnosticados posteriormente. Um pouco mais tarde, com o início dos testes moleculares, novos casos foram identificados em indivíduos com outras etnias.

A SCA3/MJD é encontrada em incidência elevada em diversos países, como Portugal (58%) (Vale et al., 2010), Singapura (53%) (Zhao et al., 2002), China (49%) (Jiang et al., 2005), Holanda (44%) (van de Warrenburg et al., 2002) e Alemanha (42%) (Schols et al., 1997). Em outros países, a frequência de SCA3/MJD é mais baixa, como no Canadá (24%) (Kraft et al., 2005), nos EUA (21%) (Moseley et al., 1998), no México (12%) (Alonso et al., 2007) e na Austrália (12%) (Storey et al., 2000), sendo raramente encontrada na Índia (3%) (Faruq et al., 2009), na África do Sul (4%) (Bryer et al., 2003) e na Itália (1%) (Brusco et al., 2004).

A primeira publicação da SCA3/MJD no Brasil foi a descrição de cinco pacientes de uma mesma família (Teive et al., 1991). Relatos mais recentes apontam para uma frequência de 59,6% de SCA3/MJD dentre os casos de SCA no Brasil. No entanto, no estado do Rio Grande do Sul, a frequência de SCA3/MJD é estimada em 78,4% dos casos de ataxias (Castilhos et al., 2014), 2006). Baseado nessa estimativa, a prevalência mínima estimada de indivíduos afetados seria de 6:100.000 casos, refletindo um possível efeito fundador açoriano (Souza et al., 2016).

Os indivíduos com SCA3/MJD que se encontram nos Açores se concentram principalmente na ilha de Flores e na ilha de São Miguel, onde a prevalência estimada é de 835,2:100.000 e 27,1:100.000 (Coutinho et al., 1994), respectivamente. Acredita-se que essa presença elevada de pacientes com SCA3/MJD nestas ilhas pode ser explicada por um efeito fundador que teve início com o começo da colonização destas ilhas pelos portugueses em 1432 (Sequeiros, 1993). E a existência desta doença em alta frequência em países do

orientes, tais como Índia e Japão, e no Brasil pode ser explicado pelas grandes navegações feitas pelos portugueses nos séculos XV e XVI.

No entanto, existe uma diferença na média de idade de início entre as duas ilhas, onde os doentes originários da ilha de Flores começam a apresentar sintomas, em média, oito anos antes dos doentes originários da ilha de São Miguel, sugerindo uma diferença entre essas duas subpopulações.

Os estudos moleculares sobre a origem ancestral contribuíram para a elucidação de alguns detalhes sobre a origem da mutação causadora da doença. Nesse estudo foi sugerida a existência de dois eventos mutacionais na população portuguesa responsáveis por dois haplótipos distintos nas Ilhas de São Miguel e de Flores. O haplótipo GGC foi associado com os indivíduos originários da ilha de São Miguel e por isso também ficando conhecido como o haplótipo Machado. E o haplótipo ACA foi associado com os indivíduos originários da ilha de Flores e por isso ficou conhecido como haplótipo Joseph. Sendo que os dois haplótipos foram encontrados em pacientes de Portugal continental (Gaspar et al., 2001). No Brasil o principal haplótipo encontrado é o ACA, principalmente no rio grande do sul onde aproximadamente 93% apresenta esse haplótipo, isso é devido a um efeito fundador proveniente dos açores (Furtado et al., submetido para publicação).

1.1.1.3 Aspectos Moleculares

A mutação causadora de SCA3/MJD foi descrita em 1994 (Kawaguchi et al., 1994), sendo identificada como uma expansão de CAG no éxon 10 do gene *ATXN3*, o qual está localizado no *locus* 14q32.1.

O gene apresenta 48.070 pares de bases (pb) e está dividido em 13 éxons (Figura 1), dois éxons (6a e 9a) foram recentemente adicionados (Bettencourt et al., 2010).

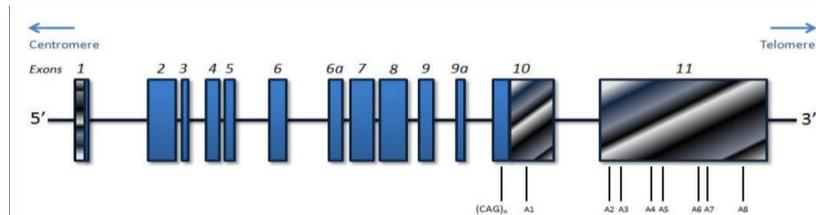


Figura 1. Esquema do gene *ATXN3* com a localização das repetições CAG (Bettencourt & Lima, 2011).

As repetições CAG são polimórficas, podendo variar em indivíduos normais de 12 a 44 repetições. Alelos com 45 a 51 repetições CAG são considerados alelos com penetrância reduzida, sendo que os portadores destes alelos podem vir a manifestar a doença em algum momento da vida. E os alelos expandidos patologicamente são aqueles com 52 ou mais repetições CAG, cujos indivíduos irão manifestar a doença em algum momento de suas vidas (Paulson, 2011).

O gene *ATXN3* codifica a proteína ataxina-3, a qual é composta por 339 aminoácidos mais o número variável de glutaminas. A forma selvagem da proteína apresenta funções de uma enzima de deubiquitinação (DUB) que atuaria na via ubiquitina proteossomo. Também foi proposto o seu envolvimento na regulação da transcrição de proteínas (Ries et al., 2008). *ATXN3* atua também na formação do agressomo junto com HDAC6, selecionando os agregados para este (Bonanomi et al., 2014). O gene *ATXN3* mutante não apresenta alteração na sua transcrição ou tradução, mas a presença anormal de poliglutaminas na proteína ataxina-3 altera a localização da mesma. A ataxina-3 é normalmente uma proteína predominantemente citoplasmática em neurônios (Pozzi et al., 2008). Entretanto, no caso da presença de um maior número de glutaminas na proteína, a mesma é encontrada concentrada no núcleo dos neurônios na forma de inclusões neuronais. Essas inclusões neuronais, que também são encontrados em outras doenças causadas por poliglutaminas, são fortemente ubiquitinadas e contêm chaperonas moleculares de choque de calor e subunidades proteossômicas, sugerindo que eles são repositórios de proteínas malformadas e agregadas (Schmidt et al., 2002). A presença de inclusões intranucleares neuronais ubiquitinadas (NInIs) tem sido reconhecida como uma característica neuropatológica destas doenças, embora sua função na patogênese continua a

ser um motivo de controvérsia (Yamada et al., 2005). Alguns estudos sugerem que as inclusões não são diretamente as estruturas responsáveis pela patogenicidade da doença e, sim, um meio da célula combater as proteínas anormais tornando-as não tóxicas através da agregação (Evert et al., 2006; Rub et al., 2006).

1.1.1.4 Aspectos Genéticos

A SCA3/MJD é uma doença autossômica dominante, sendo esperado que 50% da prole herde o gene mutante. Entretanto, distorção da segregação já foi descrita nesta doença, onde ocorre uma transmissão preferencial do alelo mutante a qual é mais significativa quando o transmissor é o pai (Iughetti et al., 1998).

Fitness aumentado foi descrito em indivíduos afetados, onde estes tinham mais filhos do que os parentes não afetados. As mulheres com SCA3/MJD demonstraram idade mais baixa no primeiro parto e início precoce da menopausa quando comparadas com familiares não afetadas. E essas mulheres normalmente tinham os filhos antes de apresentarem qualquer sintoma, ou seja, antes de saberem que tinham a doença (Prestes et al., 2008).

Uma correlação direta entre o número de repetições CAG com a taxa de progressão da doença já foi amplamente demonstrado nessa patologia (Jardim et al., 2001b). Correlação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início também foi observada, assim como nas demais SCA, no entanto, o número de repetições CAG explica de 45% a 60% desta variabilidade (van de Warrenburg et al., 2002), indicando que outros fatores podem estar envolvidos como moduladores do fenótipo. O efeito da metilação do promotor do gene *ATXN3* foi sugerido recentemente (Emmel et al., 2012) e outros fatores vêm sendo investigados.

Antecipação também se está presente na SCA3/MJD pelo fato sequências com maior número de repetições são instáveis durante a meiose e tendem a se expandir nas próximas gerações. Isto leva ao início mais precoce dos sintomas e a um fenótipo mais severo em gerações subsequentes da família (Richards, 2001).

1.2 Biomarcadores

A revista *Nature* define que “um biomarcador é uma característica biológica que pode ser medida objetivamente e avaliada como um indicador de funções biológicas normais ou patológicas, ou de uma resposta a intervenções terapêuticas. Exemplos incluem padrões de expressão gênica, níveis de uma proteína em particular em fluídos corporais ou mudanças na atividade elétrica no cérebro” (tradução livre do autor; <https://www.nature.com/subjects/biomarkers>). A Organização mundial da saúde define biomarcador como “qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser medido no corpo ou seus produtos e influência ou prevê a incidência de um resultado ou doença” (tradução livre do autor; <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>). Apesar de existirem várias outras definições além destas, elas tendem a serem bastante similares e se sobrepõem.

Podemos dividir os biomarcadores em três grupos: biomarcadores de suscetibilidade, de estado e de progressão. Biomarcadores de suscetibilidade identifica fatores que mostram que o indivíduo irá ou tem alta probabilidade de manifestar uma doença ou característica específica. Biomarcadores de estado indicam a presença de alguma disordem. Enquanto os biomarcadores de progressão refletem o desenvolvimento da doença.

1.2.1 Biomarcadores em doenças neurodegenerativas

Os principais biomarcadores usado em doenças neurodegenerativas são as escalas clínicas - ADAS-Cog para Alzheimer (Rosen et al., 1984), UPDRS para Parkinson (Fahn et al., 1987), UHDRS para Huntington (Huntington Study Group, 1996), SARA para ataxias espinocerebelares (Schmitz-Hübsch et al., 2006) - pois normalmente são simples de serem realizadas e podem ser feitas em qualquer ambiente. A utilização de mais de uma escala clínica para cada doença também não é incomum em ensaios clínicos. No entanto, essas escalas costumam ter uma evolução lenta, dificultando seu uso em ensaios clínicos ou até para o acompanhamento da história natural da doença, sendo necessários outros

marcadores que tenham uma evolução mais rápida para acompanhar os dados clínicos.

Características antropométricas são fáceis de serem medidas e, por isso, também são utilizadas. Como por exemplo, pacientes com a doença de Huntington (HD) possuem um índice de massa corporal (IMC) mais baixo, até mesmo antes de apresentarem sintomas (Tereshchenko et al., 2015). Um IMC alto está associado com maior risco para a doença de Parkinson (PD) (Sääksjärvi et al., 2014). No entanto, uma redução do IMC ao longo do tempo está associada com uma piora na escala clínica UPDRS (Wills et al., 2016). Indivíduos com a doença de Alzheimer (AD) mostraram uma redução de IMC antes da doença apesar de, após o começo da doença, não foram detectadas mudanças (Gu et al., 2014). No entanto, em um estudo se viu que quem tinha um alto IMC associado com a ausência do genótipo $\epsilon 4$ da APOE tinha uma progressão mais lenta da doença em comparação aos outros IMCs.

Exames de neuroimagem, como imagem por ressonância magnética (MRI) e tomografia por emissão de pósitrons (PET), fornecem dados clínicos importante para essas doenças, que os tornam fortes candidatos para biomarcadores em doenças neurodegenerativas (Szymański et al., 2010). Por exemplo, um estudo utilizando MRI viu que a intermediação (*betweenness centrality*) utilizando regiões do cérebro apresenta uma redução em indivíduos com HD que recém manifestaram sintomas ou estão próximo da idade de início estimada em comparação com controles e indivíduos mais afastados da idade de início estimada (Odish et al., 2015).

Análises de fatores moleculares também são bastante estudados, tanto para um maior entendimento da doença como para sua identificação como potenciais biomarcadores. Quantificação de RNA mensageiro é uma das possibilidades e atualmente com o desenvolvimento de sequenciadores de nova geração estudos de transcriptoma têm sido feitos, assim é selecionado alguns genes que são possíveis biomarcadores que após precisam ser confirmados em novas coortes. Essa metodologia já foi utilizada para análise de sangue de HD (Mastrokolas et al., 2015), SCA3/MJD (Raposo et al., 2015) e até mesmo em cérebros de pacientes com ataxia espinocerebelar (Bettencourt et al., 2014). MicroRNA

(miRNA) atualmente vem sendo estudados como biomarcadores em doenças neurodegenerativas (Grasso et al., 2014), e já foi relatado que a alteração nos níveis de alguns miRNA encontrados no plasma mimetizam o que acontece no cérebro de pacientes com HD (Hoss et al., 2015).

Proteínas são os fatores moleculares mais estudados para a análise de biomarcadores, as mais estudadas são as proteínas altamente associadas a causa das respectivas doenças. A doença de Alzheimer por ser uma doença que pode ter várias origens, possui um tipo de marcador específico para cada origem. Por exemplo, quando causado por beta amiloide ($A\beta$), os marcadores podem ser a detecção de beta amiloides no fluído cérebro espinhal ou no sangue. No entanto, a correlação de $A\beta$ no sangue apresenta uma fraca correlação ou, até mesmo, ausência de correlação com os níveis no cérebro (Lashley et al., 2018). Na doença de Parkinson, a presença de α -sinucleína no sangue pode ser usada como biomarcador (Wang et al., 2015), e essa medição de α -sinucleína pode ser feita nas variadas formas (total, oligômeros e fosforilado) e em vários tecidos (plasma, fluído cérebro espinhal e biópsia de pele) (Khodadadian et al., 2018). O caso da doença de Huntington, por ser uma doença de herança dominante, a quantificação da proteína mutante é um bom biomarcador da doença, conseguindo diferenciar indivíduos com a doença de controles, e indivíduos em estágio tardios da doença de indivíduos que recém manifestaram a doença e/ou indivíduos que ainda vão a vir a manifestar (Weiss et al., 2012).

Outros biomarcadores normalmente estudados nessas doenças neurodegenerativas com um aspecto de agregação de proteínas, são proteínas envolvidas na degradação desses agregados, sendo do sistema ubiquitina proteassoma ou do sistema de autofagia, além de fatores importantes para o desenvolvimento e funcionamento do cérebro.

1.2.2 Biomarcadores na doença de Machado-Joseph

Será amplamente discutido no capítulo 1

1.2.2.1 Candidatos a Biomarcadores em MJD

1.2.2.1.1 Marcadores de Composição Corporal

Características antropométricas são de fácil acesso e simples de serem quantificadas. Como falado anteriormente o IMC ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$) é uma medida amplamente usada, nosso grupo já demonstrou anteriormente que indivíduos com SCA3/MJD com duração de doença em torno de 10 anos apresentavam um IMC menor que controles e que isso está associado com o tamanho da CAG (Saute et al., 2012). Um estudo com pacientes com SCAs de toda a Europa (grupo EUROSCA) mostrou que o IMC declina com o tempo, e que o grupo que tinha redução de IMC apresentou uma piora na escala clínica SARA (Diallo et al., 2017).

Componentes da via da insulina podem estar envolvidos com a doença, uma vez que já foi demonstrado que pacientes com SCA3/MJD possuem mais IGFBP-1 (*insulin-like growth factor binding protein 1*) em soro, além disso apresentaram uma maior sensibilidade a insulina de acordo com HOMA2 (avaliação do modelo homeostático) e essa sensibilidade foi associada com a idade de início (Saute et al., 2011).

1.2.2.1.2 Marcadores Neurais

Quando se estuda doenças neurodegenerativas primeiramente vai se pensar em biomarcadores fortemente associados com o sistema nervoso, no caso de proteínas procuram-se principalmente as quais suas principais funções estão associadas a neurônios ou outros tipos celulares do sistema nervoso, normalmente envolvidos com neuroproteção ou dano celular.

Um dos principais alvos quando se estuda algo relacionado com sistema nervoso são as neurotrofinas, sendo a proteína fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *Brain-derived neurotrophic factor*) a neurotrofina mais pesquisada em estudos neuronais e em doenças neurológicas e/ou psiquiátricas. BDNF tem como função promover a sobrevivência e diferenciação de determinadas populações neuronais do sistema nervoso central e periférico. Além disso,

participa do crescimento axonal e da modulação da morfologia e crescimento dos dendritos. É também o principal regulador da transmissão sináptica e da plasticidade das sinapses em neurônios adultos no sistema nervoso central.

Já foram identificadas alterações de BDNF em diversas doenças neurodegenerativas, como em pacientes com doença de Alzheimer (Budni et al., 2016) e Huntington (Allen et al., 2013), onde uma redução da sua expressão é vista. Na doença de Parkinson, níveis de proteína e mRNA estão reduzidos na substância nigra. (Howells et al., 2000). Já no grupo das SCAs, foi verificado que em modelos de camundongos de SCA1 existe a redução da expressão gênica (Hourez et al., 2011) e que em cerebelo de pacientes com SCA6 a expressão gênica está suprimida e as proteínas formam grânulos anormais (Takahashi et al., 2012). Em um modelo celular de MJD, uma redução de expressão gênica foi identificada uma redução de expressão, a análise imunohistoquímica de cérebros de pacientes não demonstrou redução nos neurônios da ponte, mas uma redução significativa foi vista nos neurônios do núcleo denteado (Evert et al., 2003).

Outra neurotrofina é o fator de crescimento de nervoso (NGF – *nerve growth factor*), uma proteína secretada que está envolvida na regulação do crescimento e da diferenciação de neurônios simpáticos e alguns sensoriais. Pacientes com AD apresentam menor quantidade de NGF no soro (Budni et al., 2016), assim como em pacientes com HD (Tasset et al., 2012). NGF foi utilizado em um ensaio clínico para o tratamento de AD, onde foi visto uma melhora nos indivíduos (Tuszynski et al., 2015). Em um ensaio clínico aberto em SCA3/MJD, também foi visto melhora na SARA além de melhora em outras análises clínicas (Tan et al., 2015).

O fator neurotrófico ciliar (CTNF – *Ciliary neurotrophic factor*) é uma proteína capaz de induzir diferenciação neuronal e sua sobrevivência, tendo efeito no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, e pode ser relevante durante ataques inflamatórios reduzindo a destruição tecidual. O CTNF está reduzido em pacientes com PD (Chauhan et al., 2001) e foi utilizado em um ensaio clínico de HD, onde foi demonstrado melhoras em testes eletrofisiológicos (Bloch et al., 2004).

A enolase específica de neurônio (NSE – *neuron specific enolase*, também conhecida como enolase gamma, ENO2) é uma proteína com propriedade neuroprotetora e neurotrófica encontrada nos neurônios do sistema nervoso central. Um aumento nos níveis desta proteína já foi observado em cérebros de modelos de camundongos para PD, nocaute para o gene *PINK1* (Triplett et al., 2015). Em pacientes com AD, houve um aumento dos níveis de NSE em fluido cerebrospinal (Schmidt et al., 2014). Além disso, foi mostrado aumento de NSE no soro quando comparado com controles em duas coortes de pacientes com MJD (Tort et al., 2005 e Zhou et al., 2011).

1.2.2.1.3 Marcadores Gerais (sistêmicos)

Proteínas com funções sistêmicas, que normalmente são expressas ubiquamente e em grande quantidade em todos os tipos celulares, tornam-se bons candidatos a biomarcadores devido a sua fácil identificação. Além disso, podem ter sua expressão alterada facilmente. Nesse aspecto, proteínas envolvidas em rotas metabólicas, como em metabolismo de açúcares e em vias da regulação da replicação e transcrição do DNA, são bons alvos para estudo.

Um possível exemplo é a glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK3 β - *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*) é uma enzima chave no metabolismo do glicogênio, com as mais variadas funções (divisão, proliferação, motilidade e sobrevivência celular), no cérebro essa proteína está envolvida na plasticidade sináptica, provavelmente pela regulação dos receptores de NMDA. O GSK3 β é o principal alvo do lítio, sendo inibidor da atividade da proteína (Stambolic et al., 1996). Na doença de Parkinson, onde o lítio já foi testado como um possível tratamento, um polimorfismo no gene de GSK3 β foi implicado como modificador de risco (Yu et al., 2014). Em modelo de *drosophila* de MJD, a neurodegeneração foi parcialmente aliviada pela inibição da atividade de GSK3 β (Jia et al., 2013)

A histona desacetilase 6 (HDAC6 – *Histone Deacetylase 6*), atua na desacetilação de histonas, regulando a transcrição de genes e o ciclo celular. Além disso, atua na via de degradação de proteínas mal enoveladas, mediando o transporte dessas proteínas através do agrossomo, onde interage com a proteína

ataxina 3 (Bonanomi et al., 2014), o que a torna um bom alvo para análise. Em estudos em cérebro de pacientes com doença de Parkinson, ela foi colocalizada com a α -sinucleína e ubiquitinas (Miki et al., 2011) e, em modelo de camundongo com HD, a HDAC6 induziu autofagia reduzindo a neurodegeneração causada pelas poliglutaminas (Pandey et al., 2007)

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Identificar e avaliar biomarcadores na doença de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3/MJD)

2.2 Objetivos específicos:

- Revisar o "estado da arte" de potenciais marcadores do estado de doença em SCA3/MJD, com foco em marcadores de neurofisiologia e compostos de fluidos biológicos.
- Descrever o índice de massa corporal (IMC) e sensibilidade periférica à insulina (SPI) em pacientes sintomáticos precoces com SCA3/MJD e em indivíduos pré-sintomáticos e correlacioná-los com a gravidade da doença e mutação.
- Verificar alterações de neurotrofinas (BDNF, NGF, CTNF e NSE) em pacientes com SCA3/MJD submetidos ao tratamento com lítio.
- Estudar o possível uso dos níveis de expressão de mRNA dos genes *GSK3 β* e *HDAC6* em leucócitos de pacientes com SCA3/MJD como biomarcadores de intervenção de lítio.

5 Referências

Agrawal Y, Schubert MC, Migliaccio AA et al. (2014). Evaluation of quantitative head impulse testing using search coils versus video-oculography in older individuals. *Otol Neurotol* 35(2):283-288.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK et al. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 138(2):155-175

Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, et al. (2007). Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord* 22:1050-1053.

Bakalkin G, Watanabe H, Jezierska J, et al. (2010). Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Am J Hum Genet* 87:593–603.

Bettencourt C, Santos C, Montiel R, et al. (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics* 11:193-202.

Bettencourt C, Lima M (2011). Machado-Joseph Disease: From first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 6:35.

Bettencourt C, Ryten M, Forabosco P et al. (2014). Insights from cerebellar transcriptomic analysis into the pathogenesis of ataxia. *JAMA Neurol.* 71(7):831-839.

Beurel E. (2011). HDAC6 regulates LPS-tolerance in astrocytes. *PLoS One.* 2011;6(10):e25804.

Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. 1998 Oct 28 [Updated 2018 Sep 27]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/Bird>, 2016

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N et al. (2004). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther.* 15(10):968-975.

Bonanomi M, Mazzucchelli S, D'Urzo A et al. (2014). Interactions of ataxin-3 with its molecular partners in the protein machinery that sorts protein aggregates to the aggresome. *Int J Biochem Cell Biol.* 51:58-64.

Brkanac Z, Spencer D, Shendure J et al. (2009). IFRD1 is a candidate gene for SMNA on chromosome 7q22-q23. *Am J Hum Genet.* 84(5):692-7.

Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, et al. (2004). Mutation Analysis of Spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 255 Italian families. *Arch Neurol* 61:727-733.

Bryer A, Krause A, Bill P, et al. (2003). The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216:47-54.

Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F et al. (2016). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 6(5):331-341.

Cadioux-Dion M, Turcotte-Gauthier M, Noreau A et al. (2014). Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratodermia. *JAMA Neurol.* 4;71:470–475.

Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, et al. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 38:296-299.

Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM (2001) Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat.* 21(4):277-288.

Chen DH, Bird TD, Raskind WH. Spinocerebellar Ataxia Type 14. 2005 Jan 28 [Updated 2010 Mar 23]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors.

GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1399/>

Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW (2003). A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain* 126:1293–1299.

Coutelier M, Blesneac I, Monteil A et al. (2015). A Recurrent Mutation in CACNA1G Alters Cav3.1 T-Type Calcium-Channel Conduction and Causes Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxia. *Am J Hum Genet.* 97:726–737.

Coutinho P, Silva MC, Gonçalves AF, et al. (1994). Epidemiologia da doença de Machado-Joseph em Portugal. *Rev Port Neurol* 3:69-76.

Coutinho P, Ruano L, Loureiro JL et al. (2013). Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal: a population-based prevalence study. *JAMA Neurol.* 70(6):746-755.

de Assis AM, Saute JAM, Longoni A et al. (2017). Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Front Neurol.* 8:485.

de Castilho RM, Furtado GV, Gheno TC et al. (2014). Spinocerebellar ataxias in Brazil--frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum.* 13:17-28

Depondt C, Donatello S, Rai M et al. (2016). MME mutation in dominant spinocerebellar ataxia with neuropathy (SCA43). *Neurol Genet.* 2(5):e94.

Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E et al. (2014). ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am J Hum Genet.* 95:209–217.

Diallo A, Jacobi H, Schmitz-Hübsch T et al. (2017). Body Mass Index Decline Is Related to Spinocerebellar Ataxia Disease Progression. *Mov Disord Clin Pract.* 4(5):689-697.

Duarri A, Jezierska J, Fokkens M, et al. (2012). Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Ann Neurol* 72:870-880.

Durr A (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 9:885-894.

Edener U, Bernard V, Hellenbroich Y, et al. (2011). Two dominantly inherited ataxias linked to chromosome 16q22.1: SCA4 and SCA31 are not allelic. *J Neurol* 258:1223–1227

Emmel VE, Alonso I, Jardim LB, et al. (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.

Evert BO, Vogt IR, Vieira-Saecker AM, et al. (2003). Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62(10):1006-1018.

Evert BO, Schelhaas J, Fleischer H, et al. (2006). Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* 25:272–281.

Fahn S, Elton RL. UPDRS Development Committee. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, editors. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. 2nd edn Macmillan Healthcare Information; Florham Park, NJ: 1987. pp. 153–163.pp. 293–304. 1987

Faruq M, Scaria V, Singh I, et al. (2009). SCA-LSD: a repeat-oriented locus-specific variation database for genotype to phenotype correlations in spinocerebellar ataxias. *Hum Mutat* 30:1037-1042.

Fogel BL, Hanson SM, Becker EBE. (2015) Do mutations in the murine ataxia gene TRPC3 cause cerebellar ataxia in humans? *Mov. Disord*. 30: 284-286.

Furtado GV, De Mattos EP, Gheno TC et al. Polymorphisms at ATXN3: from ancestral haplotypes to functional variants in a comprehensive study in Brazilian patients. (in submission)

Garden G. Spinocerebellar Ataxia Type 7. 1998 Aug 27 [Updated 2012 Dec 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle

(WA): University of Washington, Seattle; 1993-.Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/>

Gardner RJ (2008). "SCA16' is really SCA15. *J Med Genet* 45:192.

Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, et al. (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68:523-528.

Gennarino VA, Palmer EE, McDonnell LM et al. (2018). A mild PUM1 mutation is associated with adult-onset ataxia, whereas haploinsufficiency causes developmental delay and seizures. *Cell* 172: 924-936.

Gomez CM. Spinocerebellar Ataxia Type 6. 1998 Oct 23 [Updated 2008 Jun 16]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1140/>

Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR et al. (1999). Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*. 48(4):839-847.

Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. (2014) Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules*. 19(5):6891-6910.

Gu Y, Scarmeas N, Cosentino S et al. (2014). Change in body mass index before and after Alzheimer's disease onset. *Curr Alzheimer Res*. 11(4):349-56.

Hekman KE, Yu GY, Brown CD et al. (2012). A conserved eEF2 coding variant in SCA26 leads to loss of translational fidelity and increased susceptibility to proteostatic insult. *Hum Mol Genet*. 21:5472–5483.

Hoss AG, Lagomarsino VN, Frank S et al. (2015). Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain. *Mov Disord*. 30(14):1961-1964.

Houlden H. Spinocerebellar Ataxia Type 11. 2008 Jul 22 [Updated 2013 Mar 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle

(WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1757/>

Hourez R, Servais L, Orduz D et al. (2011). Aminopyridines correct early dysfunction and delay neurodegeneration in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *J Neurosci.* 31(33):11795-11807.

Howells DW, Porritt MJ, Wong J et al. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 166(1):127-135.

Huntington Study Group (1996). Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Mov Disord.* 11(2):136-142.

Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al. (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38:184–190.

Ikeda Y, Dalton JC, Day JW, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 8. 2001 Nov 27 [Updated 2007 Feb 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1268/>

Iughetti P, Otto PA, Zatz M, Passos-Bueno MR (1998). Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet* 77: 246-248.

Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, et al. (2001a). 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.

Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, et al. (2001b). Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. *Acta Neurol Scand* 104:224-231.

Jardim LB, Hauser L, Kieling C, et al. (2010). Progression Rate of Neurological Deficits in a 10-year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum* 9:419-428.

Jia DD, Zhang L, Chen Z et al. (2013). Lithium chloride alleviates neurodegeneration partly by inhibiting activity of GSK3 β in a SCA3 Drosophila model. *Cerebellum*. 12(6):892-901.

Jiang H, Tang B, Xia K, et al. (2005). Spinocerebellar ataxia type 6 in mainland China: Molecular and clinical features in four families. *J Neurol Sci* 236:25-29.

Jiang H, Zhu HP, Gomez CM. (2010). SCA32: an autosomal dominant cerebellar ataxia with azoospermia maps to chromosome 7q32-q33. (Abstract) *Mov. Disord*. 25: S192.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-227.

Khodadadian A, Hemmati-Dinarvand M, Kalantary-Charvadeh A et al. (2018). Candidate biomarkers for Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*. 104:699-704.

Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72:543-545.

Kieling C, Rieder CR, Silva AC, et al. (2008). A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol* 15:371-376.

Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. (2011). Expansion of Intronic GGCCTG Hexanucleotide Repeat in NOP56 Causes SCA36, a Type of Spinocerebellar Ataxia Accompanied by Motor Neuron Involvement. *Am J Hum Genet* 89:121–130.

Kraft S, Furtado S, Ranaway R, et al. (2005). Adult onset spinocerebellar ataxia in a Canadian movement disorders clinic. *Can J Neurol Sci* 32:450-458.

Lopes-Cendes I, Teive HGA, Calcagnotto MA, et al. (1997). Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, SCA3/MJD and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 55:519-529.

Luis L, Costa J, Muñoz E et al. (2016). Vestibulo-ocular reflex dynamics with head-impulses discriminates spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3 and Friedreich ataxia. *J Vestib Res* 26(3):327-334.

Mahler A, Steiniger J, Endres M et al. (2014). Increased catabolic state in spinocerebellar ataxia type 1 patients. *Cerebellum* 13:440–446.

Manto M, Marmolino D (2009). Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol* 22:419-429.

Marelli C, Cazeneuve C, Brice A, et al. (2011). Autosomal dominant cerebellar ataxias. *Rev Neurol* 167:385-400.

Margolis RL, O'Hearn E, Holmes SE, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 12. 2004 Oct 1 [Updated 2011 Nov 17]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1202/>

Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, et al. (2008). Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 7:184–188.

Mastrokolas A, Ariyurek Y, Goeman JJ et al. (2015). Huntington's disease biomarker progression profile identified by transcriptome sequencing in peripheral blood. *Eur J Hum Genet.* 23(10):1349-1356.

Matsuura T, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 10. 2002 Apr 23 [Updated 2012 Sep 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1175/>

Miki Y, Mori F, Tanji K et al. (2011). Accumulation of histone deacetylase 6, an aggresome-related protein, is specific to Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions. *Neuropathology.* 31(6):561-568.

Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, et al. (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* 51: 1666–1671.

Motoi Y, Shimada K, Ishiguro K, Hattori N. (2015). Lithium and autophagy. *ACS Chem Neurosci*. 5(6):434-442.

Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972). Machado Disease: A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22: 49-55.

Nibbeling EAR, Duarri A, Verschuuren-Bemelmans CC et al. Exome sequencing and network analysis identifies shared mechanisms underlying spinocerebellar ataxia. *Brain* 140: 2860-2878.

Odish OF, Caeyenberghs K, Hosseini H et al. (2015). Dynamics of the connectome in Huntington's disease: A longitudinal diffusion MRI study. *Neuroimage Clin*. 9:32-43.

Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M et al. (2012). Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. *J Biol Chem*. 287(4):2317-2327.

Pacheco LS, da Silveira AF, Trott A et al. (2013). Association between Machado-Joseph disease and oxidative stress biomarkers. *Mutat Res* 757(2):99-103.

Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y et al. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 447(7146):859-863.

Paulson HL (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27:133-142.

Paulson H. Spinocerebellar Ataxia Type 3. 1998 Oct 10 [Updated 2015 Sep 24]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews*[™] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196/>

Pozzi C, Valtorta M, Tedeschi G, et al. (2008). Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 30:190-200.

Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Silveira I, et al. (2008). Machado-Joseph disease enhances genetic fitness: a comparison between affected and unaffected women and between MJD and the general population. *Ann Hum Genet* 72:57-64.

Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 2. 1998 Oct 23 [Updated 2010 Oct 5]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1275/>

Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 13. 2006 Nov 9 [Updated 2012 Mar 1]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1225/>

Raposo M, Bettencourt C, Maciel P et al. (2015) Novel candidate blood-based transcriptional biomarkers of Machado-Joseph disease. *Mov Disord.* 30(7):968-975.

Richards RI (2001). Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic diseases. *Hum Mol Genet* 10:2187-2194.

Riess O, Rüb U, Pastore A, et al. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7:125–137.

Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. (1984). A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* 141(11):1356-1364.

Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26:703-714.

Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology.* 42(3):174-183.

Rüb U, de Vos RA, Brunt ER, et al. (2006). Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. *Brain Pathol* 16:218–227.

Sääksjärvi K, Knekt P, Männistö S et al. (2014). Reduced risk of Parkinson's disease associated with lower body mass index and heavy leisure-time physical activity. *Eur J Epidemiol.* 29(4):285-292.

Sato N, Amino T, Kobayashi K et al. (2009). Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)_n. *Am J Hum Genet.* 85:544–557.

Saute JA, da Silva AC, Muller AP et al. (2011). Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord* 26(4):731-735.

Saute JA, Donis KC, Serrano-Munuera C et al. (2012). Ataxia rating scales--psychometric profiles, natural history and their application in clinical trials. *Cerebellum* 11(2):488-504.

Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, et al. (2002). Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51:302–310.

Schmidt FM, Mergl R, Stach B et al. (2014). Elevated levels of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase (NSE) in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 570:81-85.

Schmitt-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, et al. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of new clinical scale. *Neurology* 66:1717-1720.

Schöls L, Amoiridis G, Buttner T, et al. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Neurology* 42:924-932.

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3:291-304.

Sequeiros J (1993). Machado-Joseph disease - Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. In: R Lechtenberg (ed): *Handbook of Cerebellar diseases*, Chap. 21. Marcel Decker Publ, New York, NY, pp. 345-351.

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. New York: Raven Press, pp. 139-153.

Serrano-Munuera C, Corral-Juan M, Stevanin G et al. (2013). New subtype of spinocerebellar ataxia with altered vertical eye movements mapping to chromosome 1p32. *JAMA Neurol*. 70:764–771.

Shadrina MI, Shulskaya MV, Klyushnikov SA et al. (2016). ITPR1 gene p.Val1553Met mutation in Russian family with mild Spinocerebellar ataxia. *Cerebellum Ataxias*. 3:2.

Soong BW, Paulson HL (2007). Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 20:438-446.

Souza GN, Kersting N, Krum-Santos AC, et al. (2016). Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clin Genet*. 90:134-140.

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 6(12):1664-1668.

Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, et al. (2005). Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25). *Cerebellum* 4:58-61.

Storey E, du Sart D, Shaw JH, et al. (2000). Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am J Med Genet* 95:351-357.

Storey E, Bahlo M, Fahey M, et al. (2009). A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:408–411.

Storey E. Spinocerebellar Ataxia Type 15. 2006 May 30 [Updated 2011 Apr 21]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1362/>

Storey E. Spinocerebellar Ataxia Type 20. 2007 Feb 27 [Updated 2012 Jun 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1471/>

Subramony SH, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 1. 1998 Oct 1 [Updated 2011 Oct 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1184/>

Swartz BE, Burmeister M, Somers JT et al. (2002). A form of inherited cerebellar ataxia with saccadic intrusions, increased saccadic speed, sensory neuropathy, and myoclonus. *Ann N Y Acad Sci.* 956:441-444.

Szymański P, Markowicz M, Janik A, Ciesielski M, Mikiciuk-Olasik E. (2010) Neuroimaging diagnosis in neurodegenerative diseases. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* ;13(1):23-31.

Takahashi M, Ishikawa K, Sato N et al. (2012). Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology.* 32(6):595-603.

Tan S, Wang RH, Niu HX et al. (2015). Nerve growth factor for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3: an open-label study. *Chin Med J (Engl).* 128(3):291-294.

Tasset I, Sánchez-López F, Agüera E et al. (2012). NGF and nitrosative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurol Sci.* 315(1-2):133-136.

Teive HA, Arruda WO, Trevisol-Bittencourt PC (1991). Machado-Joseph disease: description of 5 members of a family. *Arq Neuropsiquiatr* 49:172-179.

Tereshchenko A, McHugh M, Lee JK et al. (2015). Abnormal Weight and Body Mass Index in Children with Juvenile Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 4(3):231-238.

Tort AB, Portela LV, Rockenbach IC et al. (2005). S100B and NSE serum concentrations in Machado Joseph disease. *Clin Chim Acta*. 351(1-2):143-148.

Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 17. 2005 Mar 29 [Updated 2012 May 17]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/>

Triplet JC, Zhang Z, Sultana R et al. (2015). Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights into mechanisms of familial Parkinson's disease. *J Neurochem*. 133(5):750-765.

Trouillas P, Takayanagi T, Hallet M, et al. (1997). International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *Journal of the Neurological Sciences* 145:205-211.

Tsoi H, Yu AC, Chen ZS et al. (2014). A novel missense mutation in *CCDC88C* activates the JNK pathway and causes a dominant form of spinocerebellar ataxia. *J Med Genet*. 51:590–595.

Tuszynski MH, Yang JH, Barba D et al. (2015). Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 72(10):1139-1147.

Vale J, Bugalho P, Silveira I, et al. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 17:124-128.

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58:702–708.

van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, et al. (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebral ataxia. *Am J Hum Genet* 72:191–199.

Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, et al. (2002). A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 52:666–670.

Wang JL, Yang X, Xia K, et al. (2010). TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain* 133:3510–3518.

Wang X, Yu S, Li F, Feng T. (2015). Detection of α -synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 599:115-119.

Watson LM, Bamber E, Schnekenberg RP et al. (2017). Dominant mutations in GRM1 cause spinocerebellar ataxia type 44. *Am. J. Hum. Genet.* 101: 451-458.

Weiss A, Träger U, Wild EJ et al. (2012). Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. *J Clin Invest.* 122(10):3731-3736.

WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. (2001). Retirado de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>

Wills AM, Pérez A, Wang J et al. (2016). Association Between Change in Body Mass Index, Unified Parkinson's Disease Rating Scale Scores, and Survival Among Persons With Parkinson Disease: Secondary Analysis of Longitudinal Data From NINDS Exploratory Trials in Parkinson Disease Long-term Study 1. *JAMA Neurol.* 73(3):321-328.

Yamada S, Nishimiya J, Nakajima T, Taketazu F (2005). Linear high intensity area along the medial margin of the internal segment of the globus pallidus in Machado-Joseph disease patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:573–575.

Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, et al. (2005). Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6. *Ann Neurol* 57:349–354.

Zhao Y, Tan EK, Law HY, et al. (2002). Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 62:478-481.

Zhou J, Lei L, Shi Y et al. (2011). Serum concentrations of NSE and S100B in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 36(6):504-510.