

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ANÁLISE MOLECULAR DE INDIVÍDUOS COM  
DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH**

**TIAGO SANTOS CARVALHO**

Porto Alegre

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ANÁLISE MOLECULAR DE INDIVÍDUOS COM  
DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH**

*TIAGO SANTOS CARVALHO*

Orientador

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica  
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, fevereiro de 2004

...” e é justamente a possibilidade de realizar um sonho o que torna a vida interessante . E quando se quer alguma coisa, de todo coração, todo universo conspira para que possa consegui-la”.

Paulo Coelho

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter iluminado meu caminho em todas as conquistas de minha vida.

Ao Dr. Roberto Giugliani, pela confiança e oportunidade concedida.

À Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Pereira, pela incansável orientação e paciência durante todas as etapas deste trabalho, e sobretudo pela sua amizade e exemplo de profissionalismo.

À Dr.<sup>a</sup> Laura Bannach Jardim, pela constante disponibilidade para a resolução de dúvidas sobre a doença de Machado-Joseph.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética pela amizade e cooperação mútua.

À todos os funcionários, professores e bolsistas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo convívio e amizade ao longo destes anos.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo na conclusão deste trabalho.

Aos pacientes e seus familiares que aceitaram participar deste estudo e tornaram possível a realização deste trabalho.

À FAPERGS, CNPq, FIPE-HCPA e PRONEX-MCT, pelo financiamento desta pesquisa.

À Ligia Santos, minha mãe, por toda sua dedicação, carinho e amor infindáveis em todos os momentos da minha vida.

À Simone Rossetto, minha esposa, que tanto amo, por ter sido o meu primeiro contato com a Bioquímica e mostrar-me como ela é linda, por suas sábias palavras nos momentos de

dificuldade e angústia, pela dedicação, colaboração e perseverança para que eu conseguisse chegar até aqui.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1. Ataxias Espinocerebelares.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Doença de Machado-Joseph.....</b>	<b>06</b>
<b>2.1. Contexto Histórico.....</b>	<b>06</b>
<b>2.2. Epidemiologia.....</b>	<b>07</b>
<b>2.3. Aspectos clínicos e patológicos.....</b>	<b>08</b>
2.3.1. Idade, modo de início e duração total da doença.....	09
2.3.2. Achados cerebelares e oculares.....	10
2.3.3. Achados piramidais e sinais de neurônio motor inferior e de nervos periféricos.....	10
2.3.3. Outros achados.....	11
2.3.5. Cronologia dos sintomas.....	11

---

<b>2.4. Tipos Clínicos.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. O gene da DMJ.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6. Diagnóstico e Tratamento da DMJ.....</b>	<b>14</b>
<b>JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>ARTIGO 1</b>	
<i>A non-radioactive protocol for molecular detection of patients with the Machado-Joseph Disease.....</i>	<i>19</i>
<b>ARTIGO 2</b>	
<i>Machado-Joseph Disease: Molecular analysis of patients from South Brazil.....</i>	<i>35</i>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DAS FIGURAS

### ARTIGO 1:

<b>Figura 1:</b> CAG expansion detection in the <i>MJD1</i> gene.....	33
<b>Figura 2:</b> Expanded allele analysis in the <i>MJD1</i> gene in 6% (w/v) of polyacrilamide gel.....	34

### ARTIGO 2:

<b>Figura 1:</b> CAG expansion detection in the <i>MJD1</i> gene.....	57
<b>Figura 2:</b> Polymerase chain reaction analysis of the CAG trinucleotide repeats in MJD.....	58
<b>Figura 3:</b> Distribution of CAG repeat size in the MJD gene in expanded alleles.....	59
<b>Figura 4:</b> Correlation of age of onset with CAG repeat length in the MJD chromosomes of 72 affected individuals.....	60
<b>Figura 5:</b> Correlation of mean age of onset with CAG repeat length in the MJD chromosomes of 72 affected individuals.....	61
<b>Figura 6:</b> Correlation of CAG repeat length in the MJD gene among parents and sons.....	62
<b>Figura 7:</b> Correlation of age of onset of the MJD among of parents and sons.....	63



## LISTA DAS TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1:</b> Localização cromossômica das ataxias espinocerebelares.....	05
--	----

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1:</b> Distribution of CAG expansion size and mean age of onset.....	54
--	----

<b>Tabela 2:</b> Correlation between age of onset and CAG repeat size on male and female.....	55
---	----

<b>Tabela 3:</b> Mean age of onset and CAG mean repeat size in parents and sons.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
°C	graus Celsius
C	citosina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DMJ	doença de Machado-Joseph
DMSO	dimetil sulfóxido
DRPLA	Atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
G	guanina
HCL	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
M	molar
min	minutos
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
O <sub>2</sub>	oxigênio
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>Pfx</i> DNA Polimerase	DNA polimerase de <i>Pyrococcus</i> sp.
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso/volume
SCA	Ataxia espinocerebelar
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	solução de citrato de sódio
T	timina
TA	temperatura ambiente
<i>Taq</i> DNA Polimerase	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	unidades
μL	microlitro
v/v	volume/volume
W	watts
λ	comprimento de onda
pmoles	picomoles

## RESUMO

As ataxias espinocerebelares (SCAs) constituem um grupo de doenças neurodegenerativas fatais que apresentam uma grande heterogeneidade clínica. A doença de Machado-Joseph (DMJ), ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3), é causada por uma expansão de uma seqüência repetitiva CAG em um gene, denominado *MJD1*, localizado no braço longo do cromossomo 14, expansão codificadora de uma seqüência poliglutamínica constituinte da proteína ataxina 3. Indivíduos normais apresentam entre 12 a 41 repetições, enquanto indivíduos afetados apresentam 61 a 84 repetições CAGs neste gene.

Este trabalho teve como objetivos principais a padronização de metodologias moleculares para o identificação e a quantificação do número de repetições CAG no gene responsável pela da DMJ.

Um grupo de 112 pacientes, pertencentes a 77 famílias, com suspeita clínica de algum tipo de ataxia espinocerebelar foi avaliado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após a extração de DNA destes pacientes, este material foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região de interesse e posterior transferência destes fragmentos (1) para uma membrana de *nylon* pelo método de *Southern blot*, visando ao estabelecimento de um protocolo não-radioativo para detectar a presença do alelo normal e/ou mutante; e (2) análise em gel de poliacrilamida para quantificação do número de repetições presentes no alelo mutante.

As análises laboratoriais identificaram um total de 77 pacientes com uma expansão CAG no gene da *MJD1*. Considerando-se apenas indivíduos não relacionados, a frequência

encontrada foi de 61% (47 indivíduos). Os protocolos estabelecidos demonstraram-se bastante eficazes e sensíveis para o diagnóstico da DMJ e quantificação do alelo expandido da respectiva doença.

---

## ABSTRACT

Spinocerebellar ataxias (SCAs) is a group of fatal neurodegenerative diseases that show a wide clinical variability. Machado-Joseph disease (MJD), or spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is caused by an expansion of a CAG repeat in a gene, named *MJD1*, located in the long arm of chromosome 14. This expansion codifies a polyglutamine sequence that is part of the protein. Normal individuals show between 12 and 41 repeats, while affected individuals can show 61 to 84 CAG repeats in this gene.

The main aim of this work was to establish a molecular protocol for the identification and quantification of CAG repeats in the gene associated to MJD.

A group composed by 112 individuals, belong 77 families, with a clinical suspicion of a type of SCA was examined at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Following DNA isolation from these patients, regions of interest were amplified by PCR using specific primers. After this procedure, amplified regions were blotted to a nylon membrane by *Southern blot* procedure, aiming the establishment of a non radioactive protocol to identify the normal or mutant alleles, followed by polyacrilamine gel electrophoresis analysis for determining the size of the expanded allele.

This approach was able to identify 77 patients, with a CAG expansion in the *MJD1* gene. Considering only unrelated individuals, the frequency was 61% (47 individuals). The established protocols demonstrated to be very efficient for the identification of MJD cases as well as for determining size of expanded allele in MJD patients.

## **INTRODUÇÃO**

### **1. ATAXIAS ESPINOCEREBELARES**

As ataxias espinocerebelares (SCAs) constituem um grupo de condições neurológicas com grande heterogeneidade clínica e genética. A palavra “ataxia” deriva da palavra grega taxis, a qual significa, literalmente, ordem. Deste modo, “ataxia” pode ser traduzida como falta de ordem ou desordem, embora seu sentido moderno seja o de incoordenação. A expressão “ataxia espinocerebelar” tem sido utilizada para designar as doenças genéticas do cerebelo e de suas conexões, tanto as autossômicas recessivas como as autossômicas dominantes.

As ataxias de herança autossômica dominante constituem um grupo heterogêneo de doenças com início na vida adulta e com fenótipos clínicos variáveis. As pessoas afetadas apresentam uma série de achados neurológicos cerebelares, como a ataxia axial, a disartria, o nistagmo, a dismetria, a disdiadococinesia, a decomposição de movimentos e o tremor intencional, resultantes do envolvimento do cerebelo e de suas vias aferentes e eferentes. Apesar dos sintomas e sinais de degeneração do cerebelo, medula e tronco cerebral serem predominantes, podem também ocorrer alterações nos gânglios da base, nervos ópticos, retina e nervos periféricos, podendo também estar associados a sinais de demência (Harding, 1984; Rosenberg, 1990; Currier e Subramony, 1993).

No passado, pelo desconhecimento dos defeitos genéticos e bioquímicos, as classificações das ataxias basearam-se essencialmente nas suas características clínicas, neuropatológicas e no modo de transmissão (Subramony e Currier, 1991). Porém estes

parâmetros tornaram-se pouco satisfatórios, devido à variação intra-familiar das características clínicas, resultante do fato de um mesmo genótipo causar vários fenótipos, bem como pela falta de descrições clínicas completas, a falta freqüente de exames neurológicos nos demais membros das famílias de forma a documentar a variação clínica e a possibilidade de um mesmo fenótipo ou fenótipos semelhantes resultarem de diferentes genótipos (Silveira, 1996).

Com o advento de métodos de biologia molecular, tornou-se possível classificar as inúmeras formas existentes de ataxias espinocerebelares de acordo com o gene específico envolvido.

Atualmente, vinte e um diferentes *loci* já foram mapeados e associados a uma ataxia espinocerebelar autossômica dominante. A SCA1 foi primeiramente descrita por Yakura e colaboradores em 1974, os quais sugeriram que o gene da atrofia olivopontocerebelosa encontrava-se no braço curto do cromossomo 6 (Yakura *et al.*, 1974). Três anos após, Jackson e colaboradores confirmaram a existência de um tipo de ataxia espinocerebelar nessa região, baseados em estudos de ligação associados ao complexo HLA (Jackson *et al.*, 1977). A clonagem do gene responsável pela SCA1 ocorreu em 1993, simultaneamente com a identificação da respectiva mutação: uma expansão do trinucleotídeo CAG, que codifica uma seqüência poliglutamínica, o qual é repetitivo e instável (Orr *et al.*, 1993).

Neste mesmo ano, o *locus* da SCA2, ou ataxia de Holguín, foi mapeado no cromossomo 12q23-q24.1 por Gispert e colaboradores, o qual também apresenta uma expansão do trinucleotídeo CAG na região codificadora do gene (Gisper *et al.*, 1993).

No ano seguinte, o gene responsável pela SCA3, ou doença de Machado-Joseph (DMJ), foi clonado e a mutação patogênica identificada era, novamente, uma expansão de seqüência repetitiva CAG localizada na região 14q24.3-14q32.1 (Kawaguchi *et al.*, 1994).

Em 1994, Koide e colaboradores descreveram que a síndrome autossômica dominante conhecida como atrofia dentatorubropalidolusiana (DRPLA), a qual se caracteriza por uma ataxia progressiva, coreoatetose, distonia, convulsões, mioclônus e demência, localizava-se no cromossomo 12p13 (Koide *et al.*, 1994). Neste *locus* também foi encontrada uma expansão de uma seqüência CAG instável. Também em 1994, a análise genética de uma família escandinava com ataxia hereditária, caracterizada por neuropatia sensitiva, revelou a existência de um quarto *locus*, ligado ao marcador D16S422, localizado no 16q24-16ter, a qual passou a ser designada de SCA4 (Gardner *et al.*, 1994).

A identificação de 170 membros, dos quais 56 clinicamente doentes, pertencentes a uma grande família descendente dos avós do presidente Abraham Lincon, permitiram a descoberta de uma nova forma de ataxia autossômica dominante, então denominada de SCA5 e localizada na região centromérica do cromossomo 11 (Ranum *et al.*, 1994).

No início do ano de 1997, foi identificada, em oito pacientes com sintomatologia de ataxia espinocerebelar, uma pequena expansão de um trinucleotídeo CAG no interior de um gene codificador de um canal de cálcio, localizado no cromossomo 19p13.1. A análise deste gene nas famílias dos doentes revelou que os indivíduos afetados apresentavam um número maior de repetições em comparação com os indivíduos normais, permitindo concluir que esta expansão poliglutamínica era a causa de uma nova forma de ataxia espinocerebelar, designada SCA6 (Zhuchenko *et al.*, 1997).

Em 1995, o gene da SCA7 foi mapeado no cromossomo 3p12-3p21.1, onde também encontra-se uma repetição CAG expandida e instável, a qual é responsável por uma ataxia espinocerebelar associada à degenerescência retiniana (Benomar *et al.*, 1995; Gouw *et al.*, 1995).



No ano de 1999, cinco novos *loci* foram localizados e, em alguns casos, as mutações foram identificadas. O gene da SCA8 foi mapeado no cromossomo 13q21, sendo que a mutação é de uma seqüência repetitiva CTG, localizada em uma região não transcrita do gene (na porção 3' terminal) (Koob *et al.*, 1999). Em uma família mexicana, foi identificado um novo gene no cromossomo 22q13-22qter, o qual foi designado de SCA10 (Zu *et al.*, 1999). A SCA11 foi mapeada no cromossomo 15q14-15q21.3 em uma família cujas manifestações eram quase exclusivamente cerebelares (Worth *et al.*, 1999). O gene relacionado à SCA12, encontrado em uma família de origem alemã, localiza-se no cromossomo 5q31-5q33, o qual também apresenta uma seqüência repetitiva CAG que está expandida nos indivíduos afetados (Holmes *et al.*, 1999). A SCA17 foi mapeada no cromossomo 6q27, sendo que esta mutação também era devido a uma seqüência repetitiva CAG (Koide *et al.*, 1999).

No ano 2000, a SCA13 e a SCA14 foram descritas, as quais localizam-se no cromossomo 19, regiões q13.3-q13.4 e q13.4-qter respectivamente (Herman-Bert *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000). A SCA16 foi mapeada no cromossomo 8q22.1-8q24.1, após a análise de quatro gerações de uma família de origem japonesa (Miyoshi *et al.*, 2001). Já no ano de 2002, três novos *loci* foram localizados, porém as mutações responsáveis por estas alterações não foram identificadas. A SCA18 foi mapeada no cromossomo 7q22-7q32, após a análise de cinco gerações de uma família americana (Brkanac *et al.*, 2002). O gene relacionado à SCA19, também encontrado em uma família de origem alemã, localiza-se no cromossomo 1p21-1q21 (Verbeek *et al.*, 2002). A SCA 21 foi mapeado no cromossomo 7p21.3-7p15.1, em uma família de origem francesa (Vuillaume *et al.*, 2002).

No ano de 2003, dois novos *loci* foram identificados, a SCA15 e a SCA22. A SCA15 localiza-se no cromossomo 3p24.2-3pter (Knight *et al.*, 2003). A SCA 22 foi mapeada no

cromossomo 1p21-1q23, após a análise de várias gerações de uma família chinesa (Chung *et al.*, 2003).

A tabela 1 mostra, de uma forma resumida, as localizações dos genes associados com algum tipo de ataxia espinocerebelar.

Tabela 1: **Localização cromossômica das ataxias espinocerebelares (SCAs)**

<i>NOME</i>	<i>LOCUS</i>
Ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA 1)	6p22-6p23
Ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA 2)	12q23-12q24.1
Ataxia espinocerebelar tipo 3 ou Doença de Machado-Joseph (SCA 3 ou DMJ)	14q24.3-14q32.1
Atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana (DRPLA)	12p13
Ataxia espinocerebelar tipo 4 (SCA 4)	16q24-16qter
Ataxia espinocerebelar tipo 5 (SCA 5)	11q13.1-11q13.3
Ataxia espinocerebelar tipo 6 (SCA 6)	19p13.1
Ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA 7)	3p12-3p21.1
Ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA 8)	13q21
Ataxia espinocerebelar tipo 10 (SCA 10)	22q13-22qter
Ataxia espinocerebelar tipo 11 (SCA 11)	15q14-15q21.3
Ataxia espinocerebelar tipo 12 (SCA 12)	5q31-5q33
Ataxia espinocerebelar tipo 13 (SCA 13)	19q13.3-19q13.4
Ataxia espinocerebelar tipo 14 (SCA 14)	19q13.4-19qter
Ataxia espinocerebelar tipo 15 (SCA 15)	3p24.2-3pter
Ataxia espinocerebelar tipo 16 (SCA 16)	8q22.1-8q24.1
Ataxia espinocerebelar tipo 17 (SCA 17)	6q27
Ataxia espinocerebelar tipo 18 (SCA 18)	7q22-7q32
Ataxia espinocerebelar tipo 19 (SCA 19)	1p21-1q21
Ataxia espinocerebelar tipo 21 (SCA 21)	7p15.1-7p21.3
Ataxia espinocerebelar tipo 22 (SCA 22)	1p21-1q23

## 2. A DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH

A doença de Machado-Joseph (DMJ) ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA 3) é a degeneração espinocerebelar, autossômica dominante, mais freqüentemente encontrada em pacientes descendentes de portugueses provenientes do Arquipélago dos Açores. O início da doença é quase sempre precedido por desequilíbrio e alterações da marcha. A idade de início dos sintomas clínicos é variável, existindo casos com início na primeira década de vida e outros em que os primeiros sintomas apareceram depois dos 70 anos, porém, mais freqüentemente o início das manifestações clínicas ocorre entre os 25 e os 55 anos de idade, ou seja, durante a idade reprodutiva.

### 2.1 – Contexto Histórico

A DMJ foi descrita pela primeira vez por Nakano e colaboradores, em 1972, os quais caracterizaram a família Machado, de ascendência açoriana (da Ilha de São Miguel), a qual era afetada por uma forma progressiva de ataxia, nistagmo, hiporreflexia, variados graus de amiotrofia e sinais de lesão no cordão posterior da medula (Nakano *et al.*, 1972). No mesmo ano, Woods e Schaumburg descreveram doentes provenientes dessa mesma ilha, vivendo em Massachusetts, afetados por uma degenerescência nigro-espinodentada com oftalmoplegia nuclear, os quais foram identificados como família Thomas (Woods e Schaumburg, 1972).

Quatro anos depois, Rosenberg e colaboradores descreveram uma nova família nos Estados Unidos, com sobrenome Joseph, também de origem açoriana, a qual foi observada a ocorrência de ataxia progressiva, disartria, nistagmo, bradicinesia, fasciculações de língua e de

face, postura distônica, hiperreflexia e sinais de Babinski em sete gerações (Rosenberg *et al.*, 1976). Romanul e colaboradores descreveram, em 1977, outra família açoriana residente em Massachusetts, com sinais clínicos heterogêneos entre os diversos doentes que reunia as diferentes características descritas nas três famílias anteriores. Concluíram, então, que tratava-se de uma única doença com expressividade clínica variável, propondo a designação de doença açoriana (Romanul *et al.*, 1977).

Entretanto, a designação de doença de Machado-Joseph foi proposta por Coutinho e Andrade somente em 1978, após a observação de quarenta doentes, provenientes de quinze famílias açorianas, que apresentavam fenótipos variáveis dentro de uma mesma família (Coutinho e Andrade, 1978).

Em 1993, Takiyama e colaboradores mapearam e localizaram o gene responsável pela DMJ no braço longo do cromossomo 14 (região q24.3-q32.1) por análise de ligação dos *loci* de microssatélites D14S55 e D14S48 em famílias japonesas (Takiyama *et al.*, 1993). O gene da DMJ foi identificado no ano seguinte, com o isolamento de seu DNA complementar (cDNA) de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano (Kawaguchi *et al.*, 1994). Esse gene, denominado *MJDI*, caracteriza-se pela presença de uma seqüência repetitiva do trinucleotídeo CAG na região 3' terminal, o qual codifica para resíduos de glutamina na porção carbóxi-terminal da proteína.

## 2.2 – Epidemiologia

Os melhores estudos epidemiológicos referem-se às populações portuguesas e açorianas. Em Portugal, as prevalências calculadas para a DMJ são 3,8:100.000 (continente e

ilhas), 36,9:100.000 nos Açores (27,1 na ilha de São Miguel e 8,2 na de Flores) e 1:100.000 no continente (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Nas comunidades portuguesas dos Estados Unidos e Canadá, a DMJ também apresenta uma prevalência relativamente elevada (cerca de 25:100.000) (Sequeiros e Coutinho, 1993). Existem descrições de famílias com DMJ provenientes das mais variadas regiões como Japão (Yuasa *et al.*, 1986), Itália (Suite *et al.*, 1986), Índia (Jain e Maheshwari, 1990), China (Guo-Xiang, 1994), Israel (Goldberg-Stern *et al.*, 1994), entre outros.

Os primeiros relatos sobre famílias brasileiras com o diagnóstico clínico de DMJ foram apresentados na década de oitenta e no início dos anos noventa (Lisboa e Mariotto, 1984; Radvany *et al.*, 1988; Teive *et al.*, 1994; Cassa *et al.*, 1994). Estudos recentes indicaram que a DMJ é a mais frequente SCA encontrada no Rio Grande do Sul, totalizando 81% dos pacientes estudados (92% das famílias averiguadas) com uma prevalência de 1,8:100.000 habitantes nessa região (Jardim *et al.*, 2001).

### **2.3 – Aspectos Clínicos e Patológicos**

Considerando que a DMJ é difícil de ser diferenciada com precisão das outras SCAs apenas por sintomatologia clínica ou por estudos anatomo-patológicos, uma série de achados neurológicos e familiares devem ser avaliados para facilitar o seu diagnóstico (Jardim, 2000). Desde as primeiras descrições, a DMJ foi considerada uma doença bastante pleiomórfica. Parte disso se explica pela variação na idade de início, e por três tipos de evolução a ela relacionada. Quanto mais precoce, mais graves e menos periféricos são os sinais, e vice-versa.

A observação de três evoluções clínicas diversas fundamentou uma classificação clínica que até hoje é bem aceita, a qual mencionaremos posteriormente.

### **2.3.1. Idade, modo de início e duração total da doença**

É difícil determinar uma idade média de início da doença, pois ela varia de acordo com a população estudada. Sabe-se que, de uma forma geral, a mesma encontra-se na faixa dos 38 a 40 anos entre pacientes portugueses ou de ascendência portuguesa, mas que tende a ser mais precoce em indivíduos indianos, japoneses e afro-americanos (Sequeiros e Coutinho, 1993). É importante salientar que as famílias originárias da ilha de Flores apresentam idades de início 8 anos mais precoce, em média, do que as famílias originárias da ilha de São Miguel, ambas nos Açores. Até o momento, não existem estudos que demonstrem diferenças significativas na idade de início de homens e mulheres.

Conforme descrito por Sequeiros e Coutinho em 1993, após analisarem 143 pacientes portugueses (78 homens e 65 mulheres), a ataxia da marcha foi o sintoma clínico mais frequentemente encontrado (92%), enquanto que nos demais pacientes a queixa inicial foi a de diplopia.

A duração média da doença, ou seja, o tempo entre o seu início e a morte do paciente, é de 15,6 anos entre os portugueses, variando entre 7 e 29 anos (Sequeiros e Coutinho, 1993). Já em alemães, a duração média é de 21 a 25 anos (Klockgether, 1998) e em pacientes brasileiros é de 17 anos, variando entre 5 e 30 anos (Jardim *et al.*, 2001).

### **2.3.2. Achados cerebelares e oculares**

Os achados cerebelares, encontrados em 97,8% dos casos portugueses, abrangem ataxia de marcha, disartria e incoordenação apendicular, nessa ordem de aparecimento e de gravidade (Sequeiros e Coutinho, 1993). Já em pacientes brasileiros a ocorrência destes sintomas é de 93% (Jardim *et al.*, 2001).

A oftalmoplegia supranuclear é a segunda característica clínica mais frequentemente descrita em doentes portugueses (90,5%), porém em pacientes brasileiros sua frequência é 52,5% (Jardim *et al.*, 2001). Outro achado típico encontrado em pacientes com DMJ é a retração palpebral, a qual foi encontrada em 25,7% dos casos estudados por Sequeiros e Coutinho (Sequeiros e Coutinho, 1993) e 27,4% dos pacientes analisados por Jardim e colaboradores (Jardim *et al.*, 2001).

### **2.3.3. Achados piramidais e sinais de neurônio motor inferior e de nervos periféricos**

A hiperreflexia foi encontrada em 79,2% dos casos examinados por Sequeiros e Coutinho durante os primeiros anos da doença, frequência semelhante à encontrada por Jardim e colaboradores (74%) (Sequeiros e Coutinho, 1993; Jardim *et al.*, 2001). Esta mesma característica também foi encontrada com bastante frequência em indivíduos ainda assintomáticos (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Os sinais de neurônio motor inferior e de nervos periféricos foram encontrados em 55% dos casos descritos por Sequeiros e Coutinho. A frequência da ocorrência de

fasciculações foi de 13% dos relatos portugueses e de 41% dos brasileiros (Sequeiros e Coutinho, 1993; Jardim *et al.*, 2001). Em 29% dos pacientes foram encontradas alterações sensoriais, sejam elas cinético-posturais, vibratórias ou táteis (Sequeiros e Coutinho, 1993).

#### **2.3.4. Outros Achados**

Outros achados clínicos presentes em pacientes portugueses com DMJ foram a disfagia (alguns doentes se engasgavam com a própria saliva) (59%), distúrbios do sono (47%) e considerável perda de peso (54%) após 5 a 10 anos do início dos sintomas clínicos (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Em pacientes brasileiros com DMJ, a disfagia foi encontrada em 63,5% dos casos (Jardim *et al.*, 2001).

#### **2.3.5. Cronologia dos sintomas**

Os primeiros sintomas clínicos apresentados por pacientes portugueses com DMJ são os piramidais e cerebelares, acompanhados posteriormente por oftalmoplegia. Após cinco anos do início da doença podem aparecer, então, os sinais extrapiramidais; em caso de ausência deste tipo de sintoma ocorre apenas o agravamento dos achados clínicos iniciais (Sequeiros e Coutinho, 1993). Já em pacientes brasileiros, a ataxia da marcha, a disartria, a disfagia e as fasciculações são as manifestações que progridem com a passagem do tempo. O mesmo não acontece com o nistagmo, a síndrome piramidal, a incoordenação apendicular, a



oftalmoplegia, a distonia, a rigidez/bradicinesia, a retração palpebral e a atrofia óptica (Jardim *et al.*, 2001).

## 2.4 – Tipos Clínicos

Em 1978, Coutinho e Andrade propuseram dividir em três tipos as diferentes características clínicas expressas por doentes com DMJ, classificação a qual está em uso até os dias de hoje.

Tipo 1: os pacientes com o tipo 1 da DMJ apresentam início precoce da doença (24,6 anos, nos estudos portugueses) e um desenvolvimento bastante rápido da mesma. As características mais frequentemente encontradas são os achados cerebelares e oftalmoplégicos, e intensos sinais piramidais e extrapiramidais (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Tipo 2: os pacientes portadores do tipo 2 da DMJ possuem uma forma intermediária da doença. A idade de início dos sintomas clínicos ocorre em torno dos 40,3 anos e caracteriza-se pela presença de incoordenação, com ou sem achados piramidais e oftalmoplegia progressiva. Os achados periféricos e extrapiramidais são leves ou ausentes. Costuma-se afirmar que todos os pacientes são do tipo 2 no início da doença, e que somente após cinco anos de evolução é que os tipos 1 e 3 se estabelecem ou não (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Tipo 3: os pacientes classificados com o tipo 3 da DMJ possuem um início mais tardio, em torno de 47,1 anos, e uma evolução mais lenta da doença. Estes pacientes apresentam ataxia, oftalmoplegia, sinais periféricos importantes e poucos achados piramidais ou extrapiramidais (Sequeiros e Coutinho, 1993).

## 2.5 – O Gene da DMJ

O gene da DMJ, o qual é designado *MJD1*, localiza-se no braço longo do cromossoma 14 na região q24.3-32.1 e é constituído por dois exons e por um intron. Este gene contém uma região com repetições do trinucleotídeo CAG perto do início do segundo exon, cujo número destas repetições é polimórfico na população geral, mas que, a partir de um certo limite, passa a desencadear neurodegeneração.

O cDNA do gene *MJD1* apresenta 1776 pb e codifica para uma proteína de 42 kDa, a qual foi denominada de ataxina 3. A função metabólica desta proteína, que possui uma longa sequência poliglutamínica e que encontra-se predominantemente no núcleo da células, é desconhecida até o momento.

A mutação no gene da DMJ consiste na expansão deste trato de CAGs sempre bem acima dos limites da variação normal, correspondendo a praticamente uma duplicação do tamanho habitual. Indivíduos normais apresentam de 12 a 41 repetições CAG, enquanto os afetados pela DMJ podem apresentar entre 61 e 84 repetições.

Uma forte correlação entre o número de repetições CAGs e a gravidade dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes foi observada, porém apenas cerca de metade da variabilidade clínica pode ser explicada pela variação no tamanho da expansão do gene da DMJ (Sequeiros, 1996). Portanto, fica evidente a existência de outros fatores genéticos e/ou ambientais que possam influenciar no curso natural da doença. Esses fatores podem ser denominados de fatores modificadores.

Entre os principais fatores modificadores que podemos salientar encontram-se: o sexo do genitor afetado, pois sabe-se que a transmissão paterna do alelo mutante é mais instável

(Maciel *et al.*, 1995; Maruyama *et al.*, 1995) e o tamanho do alelo normal, pois a presença de polimorfismos intragênicos está associado a maiores expansões e contrações meióticas (Igarashi *et al.*, 1996; Maciel *et al.*, 1999).

## 2.6 – Diagnóstico e Tratamento da DMJ

Após a identificação do gene *MJD1* por Kawaguchi e colaboradores (Kawaguchi *et al.*, 1994), foi possível o desenvolvimento de um diagnóstico laboratorial para a DMJ, o qual é essencial para estabelecer o diagnóstico atualmente. Devido à inexistência de algum tipo de marcador bioquímico específico para a DMJ, somente a análise molecular é capaz de estabelecer um diagnóstico laboratorial para os casos sintomáticos e assintomáticos.

Uma dificuldade encontrada referente ao manejo de pacientes com DMJ é a inexistência, até o momento, de um tratamento farmacológico eficaz para os sintomas clínicos da doença. Desta forma, um tratamento curativo também parece estar distante. Portanto, a manutenção da qualidade de vida diária e do bem-estar dos pacientes restringe-se ao suporte físico e emocional dos doentes, através de atendimentos psicológicos, fisioterápicos e fonoaudiológicos.

No futuro, a terapia gênica aliada a agentes farmacológicos talvez possa ajudar no combate ao avanço da sintomatologia da DMJ.

Uma questão extremamente importante que se encontra nas famílias de doentes com DMJ é a disponibilidade de acesso a testes preditivos. Entretanto, existe uma série de implicações éticas e legais que devem ser levadas em consideração. O oferecimento destes

testes deve fazer parte de um aconselhamento genético abrangente, o qual ajude cada indivíduo ou casal a tomar as decisões adequadas às suas necessidades.

## JUSTIFICATIVAS

Uma série de justificativas pode ser listada para o estudo da DMJ no nosso meio. Devemos considerar, em primeiro lugar, que uma parte significativa da colonização do Rio Grande do Sul é de origem açoriana, em especial a capital Porto Alegre, e que a DMJ apresenta uma prevalência relativamente elevada no Arquipélago de Açores (cerca de 1:4.000) (Sequeiros e Coutinho, 1993).

Outra justificativa importante é a elevada incidência da DMJ em relação às demais SCAs em nosso Estado, apresentando uma frequência relativa de 81% nos pacientes estudados por Jardim e colaboradores (Jardim *et al.*, 2001).

Devemos considerar que, antes da caracterização molecular da doença, o diagnóstico da DMJ baseava-se apenas no fenótipo apresentado pelo paciente, levando, muitas vezes, a um diagnóstico impreciso, devido à dificuldade de semelhança clínica existente entre as diferentes SCAs. A imprecisão do diagnóstico tornava mais difícil o aconselhamento genético de famílias em risco.

A partir do conhecimento da alteração molecular responsável pela doença, tornou-se prioritária a implementação de protocolos de investigação laboratorial para a mesma, o qual proporciona a detecção da presença e a quantificação de expansões do trinucleotídeo CAG no gene da DMJ, contribuindo para o diagnóstico precoce dos doentes, ajudando no aconselhamento genético das famílias em risco e, quando indicado, proporcionando o diagnóstico de casos pré-sintomáticos.

## OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- ✓ Desenvolver um protocolo laboratorial não radioativo para a caracterização de pacientes com DMJ;
- ✓ Identificar a presença da expansão trinucleotídica CAG em indivíduos com suspeita clínica de DMJ;
- ✓ Determinar o tamanho da expansão trinucleotídica CAG nos pacientes portadores desta mutação;
- ✓ Identificar outros portadores da mutação em questão entre os familiares do caso índice;
- ✓ Correlacionar o tamanho da expansão no caso-índice com o tamanho da expansão em outros membros afetados pela doença da mesma família;
- ✓ Correlacionar o tamanho da expansão trinucleotídica com a idade de início dos sintomas clínicos nos pacientes com DMJ.

## **RESULTADOS**

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de dois artigos científicos, os quais serão submetidos para publicação.

## **ARTIGO 1**

*A non-isotopic protocol for molecular detection of patients with the Machado-Joseph Disease*

---

Artigo a ser submetido para publicação no *American Journal of Medical Genetics*  
(*Neuropsychiatric Genetics*).



# **A NON-ISOTOPIC PROTOCOL FOR THE DETECTION OF CAG REPEATS IN PATIENTS WITH MACHADO-JOSEPH DISEASE**

Tiago Santos Carvalho<sup>1,2</sup>, Laura Bannach Jardim<sup>1,3</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,4</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre – Brazil;

<sup>2</sup>Departments of Biochemistry, <sup>3</sup>Internal Medicine and <sup>4</sup>Genetics – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – Brazil

Running title: Molecular detection of patients with MJD

Corresponding author:

Dr. Maria Luiza Pereira, PhD.  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
CEP 90035-003  
Porto Alegre – RS – Brazil

Telephone number: +55 51 3316 8011

Fax number: +55 51 3316 8010

E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

**ABSTRACT**

Spinocerebellar ataxias (SCAs) is a group of fatal neurodegenerative diseases with a wide clinical heterogeneity. Machado-Joseph disease (MJD) or spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is caused by an expansion of a CAG repeat in a gene located on the long arm of chromosome 14, which codify for a polyglutamine tract within the protein. Normal individuals show from 12 to 41 repeats, while in affected individuals 61 to 84 CAG repeats can be found. Protocol was based on the amplification of region of interest, followed by transferring fragments to a nylon membrane by the *Southern blot* method. Using this strategy, a novel non-isotopic method was establish to detect the presence of the normal or/and expanded allele. The same strategy can be used to estimate the size of the present expansion in the gene through the determination of the number of repeats found in the analyzed sample.

Key Words:

Machado-Joseph Disease

Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxias

Neurogenetics

Trinucleotide Repeats

Chemiluminescence

## INTRODUCTION

The spinocerebellar ataxias (SCAs) is a heterogeneous group of debilitating and fatal neurodegenerative diseases that cause generalized incoordination, affecting mostly the walking, speaking and swallowing. These diseases are characterized by a progressive degeneration, which affect the cerebellum and the spinocerebellar stem in various grades. Considering models of genetic heredity, these diseases can be divided into autosomal dominant, such as Machado-Joseph disease (MJD), autosomal recessive, and isolated cases (Ranum *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1996).

Onsets of these diseases are, in general, in the adult life and show a great clinical heterogeneity and a slow and progressive evolution. Up to date, 21 different types of SCAs were characterized, 7 of them are caused by a trinucleotide expansion (Jardim *et al.*, 2001).

Machado-Joseph disease (MJD), or spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), presents gait ataxia, dysarthria, dystonia, ophtalmoplegia, hyperreflexia, and dysphagia as the main clinical manifestations (Sequeiros and Coutinho, 1993). This pathology shows a high prevalence in the Archipelago of Azores and in Portuguese communities from the USA and Canada (1:4000) (Silveira, 1997). MJD is also frequent in other specific populations, such as Japanese, Italian, Spanish and Brazilian. Onset of the disease can vary from 25 to 55 years old, and is characterized by unbalance and march alteration.

In 1993, Takiyama and co-workers located the gene responsible for MJD in the long arm of chromosome 14 (14q24.3-q32.1) by linking association of the *loci* to D14S55 and D14S48 microsatellites (Takiyama *et al.*, 1993). MJD gene was identified a year later, with the isolation of its complementary DNA (cDNA) from a cDNA library from human brain

(Kawaguchi *et al.*, 1994). The gene is characterized by the presence of CAG repeats in the carboxi-terminal portion of the protein, which codify a polyglutamine tract. Analysis of size of this expansion in normal individuals and in MJD patients demonstrated that the molecular basis of MJD is the size of this hypervariable region. Normal individuals show between 12 to 41 CAG repeats, while affected individuals show between 61 to 84 repeats (Kawaguchi *et al.*, 1994; Silveira, 1997). Size of CAG expansion is inversely correlated to onset and disease gravity, although size of repeat in isolation cannot be used to predict disease onset (Maciel *et al.*, 1995; Silveira, 1997).

Before the characterization of the gene, the diagnosis of MJD was based only in the phenotype presented by the patient, which led to an erroneous diagnosis very often, due to similar features shown by patients with other SCA. This limitation was a difficulty to allow a proper genetic counseling in families at risk.

Following the characterization of the molecular alteration associated to the disease, the introduction of laboratory protocols for the detection of the CAG repeat tract in the *MJD1* gene became a priority. An early diagnosis can contribute to the genetic counseling of families at risk and, when necessary, to the diagnosis of pre-symptomatic cases.

We present here a novel non-isotopic protocol for detecting CAG expansion in the *MJD1* gene. The protocol aimed the identification of a normal and/or an expanded allele. In addition, number of repeats in expanded alleles can be also determined through a similar technique.

## MATERIALS AND METHODS

*Samples:* (1) positive controls: samples from thirteen individuals with MJD that show an expansion in the (CAG)<sub>n</sub> in the *MJD1* locus, previously identified by a radioactive technique; (2) negative controls: samples from thirteen individuals with no clinical suspicion of MJD. A sample of peripheral blood (10mL) from positive and negative controls was collected and kept at -20°C, until being processed.

*DNA extraction:* The applied protocol was based on DNA isolation using high salt concentration (Miller *et al.*, 1988). DNA was diluted in a 10 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA solution, to obtain a final concentration of 100 ng/μL.

*DNA amplification:* DNA fragments of interest were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1985). A 200 ng sample of genomic DNA was amplified using 20 μmoles of each of forward and reverse primers (MJD1 - 5' CCAGTGACTACTTTGATTTCG 3', and MJD2 - 3' AAGTGTAGGTACTTTCCGGT 5') (Kawaguchi *et al.*, 1994), 0.5 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase, which was added to the mixture after the initial denaturing time. Amplification conditions were 5 minutes at 96°C, followed by 30 cycles of 60 seconds at 94°C, 60 seconds at 50°C, and 90 seconds at 72°C, followed by a final extension cycle at 72°C for 5 minutes. Amplicons were analyzed in an 1% (w/v) agarose gel, followed by treatment of this gel with ethidium bromide solution and the visualization of these products under ultraviolet light.

*DNA transfer to a nylon membrane:* DNA fragments were transferred by capilarity from the agarose gel to a nylon membrane (Hybond™ N<sup>+</sup>), using a solution containing 3 M sodium chloride and 0.3 M sodium citrate. DNA was fixed to the membrane through ultraviolet light exposure during 4 minutes (Southern, 1975; Ausubel *et al.*, 1992).

*Probe labelling and allele detection using ECL™ 3'- oligolabelling and detection system kit (Amersham):* Protocol was based on the instructions provided by the manufacturer. Some modifications were made according to the characteristics of the experiment.

*DNA fragments resolution in polyacrilamide gel and transfer to a nylon membrane:* following PCR amplification, amplicons were analysed by electrophoresis in a 6% (w/v) polyacrilamide gel (acrilamide: bis-acrilamide 19:1) in a solution containing 7 M urea, 89 mM tris-borate, and 2 mM EDTA. DNA was transferred to a nylon membrane (Hybond™ N<sup>+</sup>) for 120 minutes based on the *Southern* method. Membrane was then denatured for 20 minutes in a solution containing 1.5 M NaCl and 0.5 M Tris-HCl. Finally, membrane was used for the hybridisation with a labelled probe as described previously.

## RESULTS

*PCR Optimization:* PCR protocol for amplifying the region of interest of MJD gene was established using primers MJD1 and MJD2, which would be expected to amplify a product would present variable size from 239 bp to the normal allele (considering a variation from 12 to 41 CAG repetitions) and from 343 bp to 412 bp to the mutant allele (to variations from 61 to 84 repetitions). PCR conditions did not allow a specific amplification of the regions of interest, even changing reagents concentrations (such as primers), adding formamide or dimethylsulfoxide solution (DMSO). The amplified material was analyzed by electrophoresis in agarose gel and can be visualized in figure 1a. Due to amplification of unspecific products, a further step using hybridization with a CAG probe to the products was essential for selecting normal from mutant alleles.

*Normal and mutant allele detection using a non-radioactive protocol:* amplicons from PCR were transferred to a nylon membrane and hybridized to a labeled probe. Detection of the normal and/or mutant allele was obtained as shown in figure 1b. The applied protocol allowed the identification of individuals carrying alleles with a CAG expansion, which is the mutation responsible for MJD.

*Quantification of the expanded allele:* of a variation in the protocol described above was tested for the development of a method of determination of CAG expansion size in affected individuals. Presence of alleles with different sizes was identified, as shown in figure 2, which can be quantified by the using a suitable allelic ladder.

## DISCUSSION

The molecular defect of MJD was determined as being a mutant allele containing an expanded CAG tract in the carboxi-terminal portion of the protein. Based on the high number of cases with clinical suspicion of MJD, which symptoms and signs overlap with SCAs, the establishment of a molecular protocol for detecting both normal and mutant alleles in the *MJD1* gene was essential for the accurate diagnosis of index cases and family studies.

In general, protocols established previously by other groups were derived from hybridization using an isotopic marker to label a probe. Thus, a non-radioactive technique was thought to be developed in order to minimize risks of exposure to nasty chemicals as well as reduce eventual contamination and radioactive spills.

The complexity to establish a PCR reaction in this case can be explained by the instability associated to the dynamic mutations, which may cause simultaneous amplifications of unspecified fragments along with the expected one. In order to increase reaction specificity, additional reagents were used to the basic PCR protocol, such as 2% (v/v) formamide and 4 to 8% (v/v) dimethylsulfoxide (Newton and Graham, 1994). However, no major improvement was observed. In addition to these reagents, a hot start procedure was also applied. This procedure relies upon physical separation of reagents until a high temperature has been reached in order to avoid non-specific primer/template and primer/primer annealing events. However, this procedure was not sufficient to lead to a considerable improvement in the results.



The use of PCR associated to a blotting protocol followed by a hybridization step with a specific probe showed to be a suitable strategy to distinguish normal from mutant alleles. As far as we are aware, the use of chemiluminescence for detecting mutant alleles in the *MJD1* gene is a pioneer and effective initiative of our group for identification of MJD patients.

Similar strategy was also used to verify the size of expanded alleles in affected patients. The results obtained in this study were not quantified properly and were limited to the visualization of these alleles. However, this limitation can be overcome by the employment of an allelic ladder for a proper determination of sizes of mutant MJD alleles.

The present study allowed the introduction of an effective laboratory protocol for the identification of patients with the MJD. The developed protocol can be used directly for the diagnosis of individuals with clinical suspicion of this disease and can be adapted for the detection of other diseases that show similar molecular basis (i.e., dynamic mutations). The determination of expansion size and the presence of additional factors (such as polymorphism in the gene) can affect the degree of instability of the hypervariable region. Therefore, the detection of these factors can help for a better understanding of the MJD physiopathology.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank patients and their relatives for the cooperation in participating of this study and Dr. Isabel Guimarães, from the Unigene Laboratory in Porto – Portugal, for helping in the diagnosis of MJD patients, which were used as positive controls. The present work was funded by FAPERGS.

**REFERENCES**

- AUSUBEL F, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JÁ, STRUHL K (1992): "Short protocols in molecular biology." 2<sup>nd</sup> edition. New York: Wiley & Sons, pp 2-24 – 2-30.
- JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML, FERRO A, ALONSO I, MOREIRA MC, MENDONÇA P, FERREIRINHA F, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): A Survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil – 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA 7, SCA 8, or unidentified disease – causing mutations. *J. Neurol.* 248: 870-876.
- KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M, AIZAWA M, INOUE M, KATAYAMA S, KAWAKAMI H, NAKAMURA S, NISHIMURA M, AKIGUCHI I, KIMURA J, NARUMIYA S, KAKIZUKA A (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-227.
- MACIEL P, GASPAR C, DESTEFANO AL, SILVEIRA I, COUTINHO P, RADVANY J, DAWSON DM, SUDARSKY L, GUIMARÃES J, LOUREIRO JEL, NEZARATI MM, CORWIN LI, LOPES-CENDES I, ROOKE K, ROSENBERG R, MACLEOD P, FARRER LA, SEQUEIROS J, ROULEAU GA (1995): Correlation between CAG Repeat Length and Clinical Features in Machado-Joseph Disease. *Am J Hum Genet* 57: 54-61.
- MACIEL P, GASPAR C, GUIMARÃES L, GOTO J, LOPES-CENDES I, HAYES S, ARVIDSSON K, DIAS A, SEQUEIROS J, SOUSA A, ROULEAU GA (1999): Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Eur J Hum Genet* 7: 147-156.
- MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HS (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- NEWTON CR, GRAHAM A (1994): "PCR". UK: BIOS Scientific Publishers Limited pp. 16-38.
- RANUM LPW, LUNDGREN JK, SCHUT LJ, AHRENS MJ, PERLMAN S, AITA J, BIRD TD, GOMEZ C, ORR HT (1995): Spinocerebellar Ataxia Type 1 and Machado-Joseph Disease: Incidence of CAG Expansions among Adult-Onset Ataxia Patients from 311 Families with Dominant, Recessive, or Sporadic Ataxia. *Am J Hum Genet* 57: 603-608.
- SAIKI RD, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HÁ, ARNHEIMN (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science* 230: 1350-1354.

SEQUEIROS J, COUTINHO P (1993): Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. *Adv Neurol* 61: 139-153.

SILVEIRA I, LOPES-CENDES I, KISH S, MACIEL P, GASPAR C, COUTINHO P, BOETEZ MI, TEIVE H, ARRUDA W, STEINER CE, JUNIOR WP, MACIEL JA, JAIN S, SACK G, ANDERMANN E, SUDARSKY L, ROSENBERG R, MACLEOD P, CHITAYAT D, BABUL R, SEQUEIROS J, ROULEAU GA (1996): Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurol* 46: 214-218.

SILVEIRA I (1997): Mapeamento Cromossômico da Doença de Machado-Joseph e Heterogeneidade Genética das Ataxias Dominantes. "Porto ": Dissertação de Doutorado.

SOUTHERN EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.

TAKIYAMA Y, NISHIZAWA H, TANAKA H, KAWASHIMA S, SAKAMOTO H, KARUBE Y, SHIMAZAKI H, SOUTOME M, ENDO K, OHTA S, KAGAWA Y, KANAZAWA I, MIZUNO Y, YOSHIDA M, YUASA T, HORIKAWA Y, OYANAGI K, NAGAI H, KONDO T, INUZUKA T, ONODERA O, TSUJI S (1993): The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4:300-304.

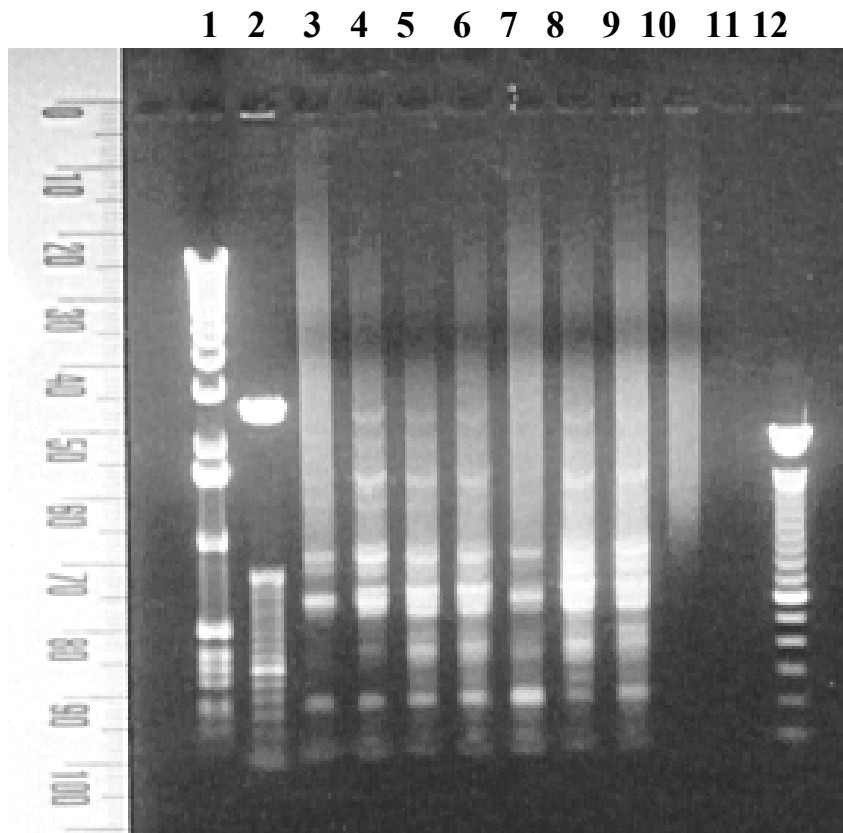
**FIGURE LEGENDS:**

Figure 1: CAG expansion detection in the *MJDI* gene. a) Analysis of amplicons from PCR in an 1% (w/v) agarose gel. Lane 1: 1 kb ladder; lane 2: 50 bp ladder; lanes 3, 4, and 10: individuals with no clinical suspicion of MJD (negative controls); lanes 5, 6, 7, 8, and 9: individuals with clinical suspicion of MJD (positive controls); lane 11: negative control for the PCR reaction (no DNA); lane 12: 100 bp ladder. b) Exposure of a autoradiograph film after *Southern blot* of gel from part “a” hybridized to a (CAG)<sub>15</sub> probe. Lanes 1, 2, and 12: ladders; lanes 3, and 4: samples from individuals with normal alleles; lanes 5, 6, 7, 8, and 9: samples from individuals presenting a normal and an expanded allele in the *MJDI* gene; lane 10: sample that did not present amplification in the PCR; lane 11: negative control for the PCR reaction (no DNA). NA= normal allele; EA= expanded allele.

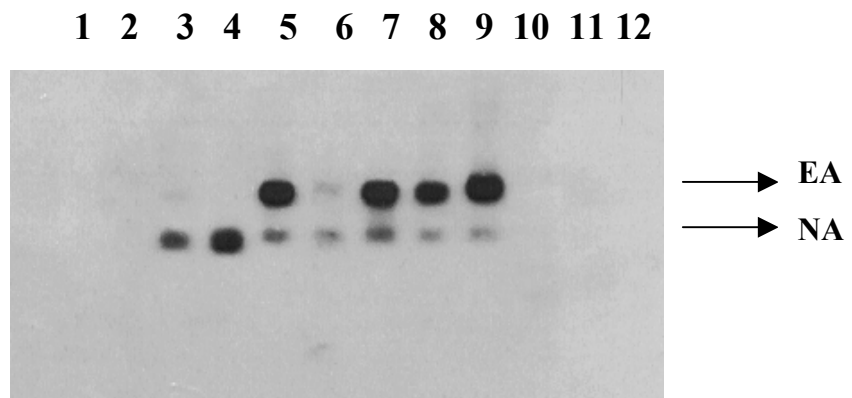
Figure 2: Expanded allele analysis in the *MJDI* gene in a 6% (w/v) polyacrilamide gel. Lanes 1 to 6: samples from individuals with MJD presenting expanded alleles with different sizes.

# FIGURE 1

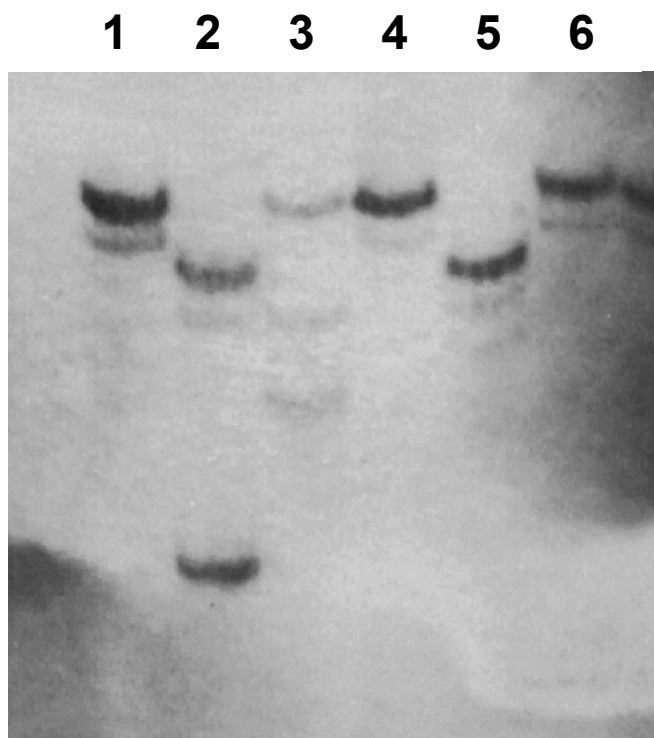
**a**



**b**



## FIGURE 2



## **ARTIGO 2**

*Machado-Joseph Disease: Molecular analysis of patients from South Brazil*

---

Artigo a ser submetido para publicação no *American Journal of Medical Genetics*

*(Neuropsychiatric Genetics)*



## **MACHADO-JOSEPH DISEASE: MOLECULAR ANALYSIS OF PATIENTS FROM SOUTH BRAZIL**

Tiago Santos Carvalho<sup>1,2</sup>, Laura Bannach Jardim<sup>1,3</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,4</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre – Brazil;

<sup>2</sup>Departments of Biochemistry, <sup>3</sup>Internal Medicine and <sup>4</sup>Genetics – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – Brazil

Running title: Molecular detection of patients with MJD

Corresponding author:

Dr. Maria Luiza Pereira, PhD.  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
CEP 90035-003  
Porto Alegre – RS – Brazil

Telephone number: +55 51 3316 8011

Fax number: +55 51 3316 8010

E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

**ABSTRACT**

Machado-Joseph Disease (MJD) is an autosomal dominant multisystem neurodegenerative disorder characterized by cerebellar ataxia, spasticity, progressive external ophthalmoplegia, dystonia, bulging eyes, facial myokymia, and peripheral neuropathy. Unstable CAG trinucleotide repeat expansion in the MJD gene on the long arm of chromosome 14 has been identified as the pathological mutation for MJD. The number of CAG repeats units in expanded alleles of the *MJD1* gene was reported to range from 61 to 84, whereas that in normal alleles ranges from 12 to 41. Our results indicated that the CAG repeat number was inversely correlated with the age of onset, as well as there was a tendency towards the phenomenon of anticipation in MJD families. We also demonstrated that was possible development a molecular protocol for the diagnostic of the MJD and quantification of the expanded allele, based on polymerase chain reaction, polyacrylamide gel electrophoresis and staining with silver nitrate.

## Key Words:

Machado-Joseph Disease

Spinocerebellar Ataxias

Trinucleotide Repeats

Neurodegenerative Diseases

## INTRODUCTION

Hereditary ataxia is a complex group of debilitating and usually fatal neurodegenerative diseases that lead to generalized incoordination particularly affecting gait, speech, and swallowing. This group of disorders is characterized by progressive degeneration that affects the cerebellum, brain stem, and spinocerebellar tracts, to varying degrees (Ranum *et al.*, 1995). To date, twenty one different *loci* responsible for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA) have been mapped. The prevalence of the various SCAs varies considerably among different populations, but MJD appears to be the most prevalent disease in all groups ethnic, accounting for 25 to 35% of all dominant ataxias (Zoghbi and Orr, 1999).

MJD is characterized by a wide range of clinical manifestations, including ataxia, progressive external ophthalmoplegia, pyramidal and extra pyramidal signs, dystonia with rigidity, distal muscular atrophies, facial myokymia and eyelid retraction (Coutinho and Andrade, 1977; Lima and Coutinho, 1980). Typically, patients will become confined to a wheelchair and will later be bedridden, the median survival time after onset is 20 years. Disease manifestations usually start during adulthood, with a mean age of onset of  $37 \pm 14$  years (Sequeiros and Coutinho, 1993), while among Brazilian patients the mean age of onset was recently established by our group was  $32 \pm 12$  years (Jardim *et al.*, 2001).

The disease locus was mapped to chromosome 14q32.1 in Japanese families, and linkage analysis in families of Portuguese Azorean origin as well as in Portuguese American and Brazilian pedigrees confirmed this finding (Takiyama *et al.*, 1993; Sequeiros *et al.*, 1994; Twist *et al.*, 1995). The gene was identified a year later and contained a CAG repeat motif in the 5' region of the coding sequence, which encodes a polyglutamine tract (Kawaguchi *et al.*,

1994). This CAG tract was observed to be expanded in MJD patients, and number of units in expanded alleles was reported to range from 61 to 84, whereas 12 to 41 repeats were observed in normal alleles (Kawaguchi *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1997). The *MJD1* gene codes for an intracellular protein of unknown function, with a predicted molecular weight of 42kDa. The *MJD1* gene product, ataxin 3, is a cytoplasmatic protein, although it has occasionally been found within the nucleus in patient's tissues (Paulson *et al.*, 1997).

As previously shown in other diseases caused by CAG expansion, inverse correlation of age at onset or clinical features of MJD patients with the size of expanded CAG repeat in the *MJD1* gene has been demonstrated, in a phenomenon known as genetics anticipation (Nagafuchi *et al.*, 1994; Koide *et al.*, 1994; Imbert *et al.*, 1996; Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996). Yet, the correlation of repeat size with age at onset is not perfect, and some clinical features do not correlate with repeat length, suggesting that factors other than number of repeats may influence the clinical presentation in this disorder (Andrew *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1994).

No effective treatment or biochemical marker is known for this incapacitating disorder; none of the proposed therapies has been shown to affect progression or prognosis. Genetic counseling is the only means of contending with the disease.

In this study, we have developed a fast and reliable protocol for detecting normal and expanded alleles in the *MJD1* gene based on the polymerase chain reaction (PCR). In addition, number of CAG repeats was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver nitrate staining. Through this protocol, a correlation between age at onset and number of CAG repeats was established.

## MATERIALS AND METHODS

*SUBJECTS:* This study was performed using DNA samples from 112 individuals with signs and/or symptoms of ataxia, all of them from same geographic origin: the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul. The suspicion of MJD or another SCA was determined by clinical examination by experienced neurologists and geneticists using previously established diagnostic criteria (Lima and Coutinho, 1980). Age at onset was based on information provided by the patient and/or a close relative.

*DNA ISOLATION:* Peripheral blood was collected from patients and their relatives, after signing an informed consent form. DNA isolation protocol was based on a salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988). DNA was then diluted to a final concentration of 100 ng/μL in a solution containing 10 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA.

*AMPLIFICATION OF MJD1 GENE BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION:* The region of interest, containing the CAG repeats and adjacent areas, was amplified by PCR using primers MJD 52 (5'-CCAGTGACTTTGATTGC-3') and MJD 25a (a slight modification of MJD 25, of sequence 5'-GGCTGGCCTTTCACATGGAT-3') (Kawaguchi *et al.*, 1994). PCR was performed in a final volume of 25 μl, containing 100 ng of genomic DNA, 5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM KCl, 0.1 mM DTT, 0.01 mM EDTA, 5% (w/v) glycerol, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 μmoles of each primer; 0.3 mM of each dNTP, and 2 U of PLATINUM<sup>®</sup> Pfx DNA polymerase. After a denaturing step at 94°C for 1 minute, 30 cycles were performed consisting of 15 seconds at 94°C, 30 seconds at 59°C, 30 seconds at 68°C, and a 5 minutes final extension at 68°C (Laccone *et al.*,

1999). Amplicons were analyzed in a 1.5% (w/v) agarose gel followed by ethidium bromide staining and the visualization of products under ultraviolet light.

*DETERMINATION OF NUMBERS OF CAG REPEATS:* Amplicons were separated by electrophoresis on a 5% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide:bis-acrylamide 19:1). Typically, 5  $\mu$ l aliquots of each PCR sample were resolved at 7 W for 2 hours, followed by a further run for 7 h at 8 W (Vuillaume *et al.*, 1998). Gel was then stained using silver nitrate solution. The size of different alleles was estimated by comparing with samples from patients that had expansion previously determined by a different method and in other laboratory. These samples were used as positive controls.

*STATISTICAL ANALYSIS:* Statistical analyses were performed using Pearson's correlation test, t test (with  $P < 0.05$ ), and analysis of variance with linear tendency.

## RESULTS

*PCR OPTIMIZATION:* Optimization of PCR was just reached using a highly specific DNA polymerase, using primers *MJD52* and *MJD25a*. Amplicon produced allowed to distinguish normal from expanded allele. In this protocol, normal alleles vary in size from 196 bp to 283 bp (considering variations from 12 to 41 CAG repeats), and mutant alleles were shown to range from 370 bp to 400 bp (for variations of 70 to 80 CAG repeats) (Maciel *et al.*, 1995). The amplified product was analyzed by electrophoresis in an agarose gel and is shown in figure 1.

*STANDARDIZATION OF EXPANDED ALLELE QUANTIFICATION:* Figure 2 shows the size of mutant alleles by comparing with others samples of MJD patients with known alleles size, that were previously determinate by a different method. Electrophoresis and staining conditions were optimized and allowed quantification of expanded alleles in MJD patients.

*FREQUENCY OF CAG REPEAT EXPANSION FOR MJD:* We have examined 112 individuals, according to criteria defined in material and methods. Seventy-seven individuals showed an expanded allele in the *MJD1* gene. Therefore, considering unrelated individuals, the frequency of the mutant allele (> 69 repeats) was established to be 61.0% (47 individuals).

*DISTRIBUTION OF CAG REPEATS SIZE:* All 77 patients with an expanded allele were included in the protocol for determining size of expanded allele, which vary from 69 to 81 repeats. The most frequent showed 73 CAG repeats (19.5%) followed by expansions with 77 CAG repeat (16.9%). No allele with 79 CAG repeat was identified.

*MEAN AGE OF ONSET:* We were able to trace age of onset in 72 MJD patients, and mean was established to be  $33 \pm 11$  years among them.

*MJD REPEATS SIZE VERSUS AGE OF ONSET:* Seventy two affected individuals out of forty two MJD families were examined further in order to determine the relationship between the CAG array size and age of onset of MJD. This result is shown in figure 4. The Pearson correlation coefficient obtained was  $r = - 0.49$  ( $P = 0.001$ ).

*CORRELATION OF CAG EXPANSIONS AND MEAN AGE OF ONSET:* When comparing size of the CAG expansions showed by patients and mean age of onset, we observed a tendency of decrease the mean age of onset with the increase of trinucleotide repeat length ( $P = 0.001$ ). However, the deviation from linearity was not significant ( $P = 0.13$ ), as shown in table 1 and figure 5.

*CORRELATION OF SIZE OF THE CAG EXPANSIONS AND MEAN AGE OF ONSET IN MALES AND FEMALES:* The mean age of onset of MJD and mean value of the CAG expansions length in males and females were compared. Results found do not show a significant difference when the both genders are compared ( $P = 0.75$  for ages and  $P = 1.0$  for CAG repeats CAG) (table 2) . Gender distribution in the population studied (77 individuals) were 46.7% males (36 individuals) and 53.3% females (41 individuals).

*CAG EXPANSIONS SIZE ON JUVENILE AND ADULTS:* Ten individuals (between 9 to 21 years of age) showed CAG expansions size ranging from 73 to 80, with a mean of  $76.7 \pm 2$  repeats; this is statistically significant from the adult population. Among adults (62 individuals between 22 to 58 years of age), that showed expansion length ranged from 70 to 78 with a mean value of  $73.6 \pm 2.1$  CAG repeats ( $P = 0.001$ ).

*ANALYSIS OF MEAN AGE APPERANCE OF CLINICAL SYMPTOMS AND MEAN CAG LENGTH IN PARENTS AND SONS:* MJD was clinically and molecularly confirmed in four families. Three affected individuals have inherited a paternal expanded allele and only one was



maternally inherited. Table 3 shows that the mean age of onset in parents was  $39 \pm 8.4$  years, while in sons was  $16.5 \pm 5.8$  years. Data show that mean CAG expansion length of parents is  $75 \pm 1.4$  repeats, while  $77.5 \pm 0.6$  repeats is the length of inherited expansions by sons. Figures 6 and 7 show the anticipation intergenerational present in MJD.

*CASE OF MJD IN CHILDREN:* In the sample studied here, there were two individuals with disease onset during childhood. In one case, patient began with clinical features at 9 years of age and the expanded allele was composed by 78 CAG repeats. This patient inherited the expanded allele from her father, who carry 76 CAG repeats and his age of onset was 30 years. In the second case, patient began with clinical features when she was 10 years old and her expanded allele was established to be 80 CAG repeats. The expanded allele, in this case, was also paternally inherited. However, her father did not show any clinical symptoms yet, her uncles (brothers of her father) are already affected.

*ANALYSIS OF MJD FAMILIES:* We have analyzed ten families with vertical transmission of mutant allele. All families showed increase in the length of CAG to the next generation, except in one case that resulted in a decrease of 3 CAG repeats. In four cases, these transmissions were increased by 1 CAG repeat; in two cases, an increase of 2 CAG repeats were observed, and other transmissions were characterized by an increase of 4, 5, and 7 CAG repeats.

## DISCUSSION

Several large studies showed that MJD was the most frequent dominant ataxia, being responsible for 17% of autosomal dominant non-Portuguese families studied in Canada (Silveira *et al.*, 1996), for 50% of German families (Schöls *et al.*, 1995), for 74% of families from mainland Portugal and for 89% of families from Azores (Silveira *et al.*, 1996), and for 81% of patients with some SCA from South of Brazil (Jardim *et al.*, 2001). In our study the frequency found on unrelated individuals was 61%. This finding could be the result of our ethnic origin, due to the Portuguese predominant occupation of Southern territory of Brazil – from where all cases originated.

In this study, the optimization of a molecular diagnostics of MJD based on PCR was obtained due to an enzyme with high specificity; this enzyme was able to amplify only the desired alleles (normal and mutant). PCR conditions were also optimized in order to obtain the required fragment(s). Therefore, the protocol presented here is distinct from that described by Kawaguchi *et al.* (1994).

Nowadays, most methods developed to accurately measure trinucleotide repeats imply radioactive analysis or fluorescent techniques, which limits laboratory management. The optimization of a quantification protocol of expanded alleles through silver nitrate staining showed very efficient. Sensitivity of this method seems equivalent to that observed when using radioactive labeled compounds (Koide *et al.*, 1994 and Orr *et al.*, 1993). No intermediary alleles were detected. The distribution of the expanded alleles is within 61 to 84

repeats range, which is in agreement to data reported previously (Takyiama *et al.*, 1997; Maciel *et al.* 1995).

The most frequent expanded MJD allele contains 73 CAG repeats (19.5%). This repeat length can be related to the kind of sample, mainly represented by an adult population (86%). Analyzing all our cases we found CAG mean repeat  $\pm$  SD is  $74.2 \pm 2.33$ . These data are very similar to the described by Jardim and co-workers in 2001. In the future, the possibility of analyzing the size of offsprings alleles of these affected individuals will give further information to confirm intergenerational instability.

The mean age of onset of MJD patients was 33 years, similar to those found by other studies in Brazilian patients (Lopes-Cendes *et al.*, 1997; Jardim *et al.*, 2001). Therefore, it is important to stress that onset in Brazilian patients is usually earlier than in Portuguese and Azorean patients (Sequeiros *et al.*, 1993), but is latter than in Indian, Japanese and Black American patients (Sequeiros *et al.*, 1993).

When analyzed the MJD repeat size and the age of onset a correlation coefficient of  $r = -0,49$  was found (figure 4). This result is in agreement to data previously reported (Kawaguchi *et al.*, 1994; Maciel *et al.* 1995; Hisieh *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 1998; Jardim *et al.*, 2001). As expected, we observed a significant negative correlation between the age of onset and the number of CAG repeats of the expanded alleles. This indicates a tendency for age of onset to decrease as the CAG repeat length increase. Likewise, we also verify a strong correlation of size of CAG repeat and mean age of onset ( $P= 0.13$  for deviation from linearity) (figure 5). However, the size of the repeat cannot be used solely to predict the age of onset accurately in affected mutations carriers. A wide variation in age of onset could be seen among individuals with the same expanded repeat number.

As shown in the table 2, the average age of onset was similar among males (32.9 years) and females (33.7 years). These data are similar to those found in other study on Brazil (Jardim *et al.*, 2001). Other similarity was the CAG mean repeat size on males and females, which was exactly the same.

Our results about CAG expansion size on juvenile age and adult age demonstrated a significantly difference among the two populations, suggesting that the greater CAG expansions result in a more severe phenotype (Maciel *et al.*, 1995 and Soong *et al.*, 1997). Our data also showed that the mean age of onset in offspring's was 22.5 years earliest than the observed in their parents, as well as the CAG mean repeat size in offspring's was 2.5 CAG repeat larger than their parents (table 3). Although only a small number of cases was analyzed, a strong anticipation phenomenon was observed in those cases (figures 6 and 7).

Although the number of families with vertical transmission of mutant allele in the present study is limited (ten families), we could observe that 90% of cases showed an increase in the length of CAG. This finding supports the hypothesis that intergenerational instability is one of the most important features on the disease associated trinucleotide expansions, leading to variation (in the majority case increasing) in size of the repeat among and within families. This phenomenon partly explains the variable age of onset and severity of the disease, and is the likely basis for the occurrence of anticipation (Maciel *et al.*, 1999).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank patients and their relatives for the cooperation in the realization of this study. The present work was supported by FAPERGS, CNPq, FIPE-HCPA and PRONEX-MCT.

**REFERENCES**

- ANDREW S, GOLDEBERG Y, KREMER B, TELENUS H, THEIMANN J, ADAM S, STARR E, SQUITIERI F, LIN B, KALCHMAN M, GRAHAM K, HAYDEN M (1993): The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4:398-403.
- COUTINHO P AND ANDRADE C (1978): Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurol* 28: 703-709.
- HSIEH M, TSAI H, LU T, YANG C, WU H, LI S (1997): Studies of the CAG repeat in the Machado-Joseph disease gene in Taiwan. *Hum Genet* 100:155-162.
- IMBERT G, SAUDOU F, IVERT G, DEVYS D, TROTTIER Y (1996): Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamina repeats. *Nat Genet* 14:284-290.
- JARDIM LB, PEREIRA ML, SILVEIRA I, FERRO A, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): Neurologic Finding in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol* 58:899-904.
- JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML, FERRO A, ALONSO I, MOREIRA M, MENDONÇA P, FERREIRINHA F, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil – 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA 7, SCA 8 or unidentified disease – causing mutations. *J Neurol* 248:870-876.
- JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML, MOREIRA M, MENDONÇA P, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2002): Searching for modulation effects of SCA2, SCA6 and DRLPA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Act Neurol Scan*.
- KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M, AIZAWA M, INOUE M, KATAYAMA S, KAWAKAMI H, NAKAMURA S, NISHIMURA M, AKIGUCHI I, KIMURA J, NARUMIYA S, KAKIZUKA A (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221-227.
- KOIDE R, IKEUCHI T, ONODERA O, TANAKA H, IGARASHI S, ENDO K, TAKAHASHI H, KONDO R, ISHIKAWA A, HAYASHI T, SAITO M, TOMODA A, MIIKE T, NAITO H, IKUTA F, TSUJI S (1994): Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentatorubralpallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13.
- LACCONE F, MAIWALD R, BINGEMANN S (1999): A fast polymerase chain reaction-mediated strategy for introducing repeat expansions into CAG-repeat containing genes. *Hum Mutat* 13:497-502.

- LIMA L, COUTINHO P (1980): Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azoren Portuguese family. *Neurol* 30:319-322.
- LOPES-CENDES I, TEIVE H, CARDOSO F, VIANA E, CALCAGNOTTO M, COSTA J, TREVISOL-BITTENCOURT P, MACIEL J, ROSSEAU M, SANTOS A, ARAÚJO A, ROULEAU G (1997): Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutations in 25 newly described Brazilian families. *Braz J Genet* 20:717-724.
- MACIEL P, GASPAR C, DESTEFANO A, SILVEIRA I, COUTINHO P, RADVANY J, DAWSON D, SUDARSKY L, GUIMARÃES J, LOUREIRO J, NEZARATI M, CORWIN L, LOPES-CENDES I, ROOKE K, ROSENBERG R, MACLEOD P, FARRER L, SEQUEIROS J, ROULEAU G (1995): Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57:54-61.
- MACIEL P, GASPAR C, GUIMARÃES L, GOTO J, LOPES-CENDES I, HAYES S, ARVIDSSON K, DIAS A, SEQUEIROS J, SOUSA A, ROULEAU G (1999): Study of three intragenic polymorphism's in the Machado-Joseph disease gene (*MJD1*) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Euro J Hum Gen* 7:147-156.
- MILLER S, DYKES DD, POLESKY HS (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- NAGAFUCHI S, YANAGISAWA H, SATO K, SHIRAYAMA T, OHSAKI E, BUNDA M, TAKEDA T, TADOKORO L, MURAYAMA N, TANAKA Y, KIKUSHIMA H, UMINO K, KUROSAWA H, FURUKAWA T, NIHEI K, INOUE T, SANO A, KOMURE O, TAKAHASHI M, YOSHIZAWA T, KANAZAWA I, YAMADA M (1994): Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nat Genet* 6:14-18.
- ORR H, CHUNG M, BANFI S (1993): Expansion of an unstable CAG repeat in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet* 4: 221-226.
- PAULSON H, PERES M, TROTTIER Y, TROJANOWSKI J, SUBRAMONY S, DAS S, VIG P, MANDEL J, FISCHBECK K, PITTMAN R. (1997): Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19: 333-334.
- PULST S, NEICHIPORUK A, NEICHIPORUK T, GISPERT S, CHEN X, LOPES-CENDES I, PEARLMAN S, STARKMAN S (1996): Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14:269-276
- RANUM L, SHUT L, LUNDGREN J, ORR H, LIVINGTON D (1994): Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet* 8:280-284.

- RANUM L, LUNDGREN J, SCHUT L, AHRENS M, PERLMAN S, AITA J, BIRD T, GOMEZ C, ORR H (1995): spinocerebellar ataxia type I and Machado-Joseph Disease: Incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet* 57:603-608.
- ROSENBERG R, NYHAN W, BAY C, SHORE P (1976): Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurol* 26:703-714.
- ROSENBERG R (1995): autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurol* 45:1-5.
- SANPEI K, TAKANO H, IGARASHI S, SATO T, OYAKE M, SASAKI H, WAKISAKA A (1996): Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique (1996): Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14:277-284.
- SEQUEIROS J, COUTINHO P (1993): Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds) *Advances in neurology*. Raven Press, New York, pp 139 – 153.
- SEQUEIROS J (1993): Machado-Joseph disease – Epidemiology, genetics and genetic Epidemiology. In: Lechtenber R, editor. *Handbook of Cerebellar diseases*. First edition. New York: Marcel Decker Publ; p.351-354.
- SEQUEIROS J, SILVEIRA I, MACIEL P, COUTINHO P, MANAIA A, GASPAT C, BURLET P, LOUREIRO L, GUIMARÃES J, TANAKA H, TAKIYAMA Y, SAKAMOTO H, NISHIZAWA M, NOMURA Y, SEGAWA M, TSUJI S, MELKI J, MUNNICH A (1994): Genetics linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 portuguese-azoren kidreds. *Genomics* 21:645-648.
- SCHÖLS L, VIEIRA-SAECKER A, SCHOLS S, PRZUNTEK H, EPPLIN J, RIESSO (1995): Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet* 4:1001-1005.
- SILVEIRA I, LOPES-CENDES I, KISH S, MACIEL P, GASPAR C, COUTINHO P, BOETZ M, TEIVE H, ARRUDA W, STEINER C, PINTO-JÚNIOR W, MACIEL J, JAIN S, SACK G, ANDERMANN E, SUDARSKY L, ROSEMBER R, MACLEOD P, SEQUEIROS J, ROULEAU G (1996): Frequency of spinocerebellar ataxia type I, dentarubropallidolusian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurol* 46: 214-218.
- SILVEIRA I, COUTINHO P, MACIEL P, GASPAR C, HAYES S, DIAS A, GUIMARÃES J, LOUREIRO L, SEQUEIROS J, ROULEAU G (1998): Analysis of SCA1, DRPLA, MJD,



- SCA 2 and SCA 6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet* 81:134-138.
- SOONG B, CHENG C, LIU R, SHAN D (1997): Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindred's. *Ann Neurol.* 41(4):446-452.
- TAKIYAMA Y, NISHIZAWA M, TANAKA H, KAWASHIMA S, SAKAMOTO H, KARUBE Y, SHIMAZAKI H, SOUTOME M, ENDO K, OHTA S, KAGAWA I, MIZUNO Y, YOSHIDA M, YUASA T, HORIKAWA Y, OYANAGI K, NAGAI H, KONDO T, INUZUKA T, ONODERA O, TSUJI S (1993): The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4:300-303.
- TAKIYAMA Y, NISHIZAWA M (1997): Machado-Joseph disease: Cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the *MJD 1* gene. *Neurol* 49:604-606.
- TWIST E, CAUSAUBON L, RUTTLEDGE M, RAO V, MACLEOD P, RADVANY J, ZHAO Z (1995): Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J Med Genet* 31:823-829.
- VUILLAUME I, SCHRAEN S, ROUSSEAU J, SABLONNIERE B (1998): Simple nonisotopic assay for detection of (CAG)<sub>n</sub> repeats expansions associated with seven neurodegenerative disorders. *Diagn Mol Pathol* 7(3):174-179.
- ZOGHBI H AND ORR H (1999): Polyglutamine disease: protein cleavage and aggregation. *Neurobiol* 9(5): 566-570.

**FIGURE LEGENDS:**

Figure 1 – CAG expansion detection in the *MJD1* gene. Agarose gel 1.5% (w/v) for the PCR amplification products analysis. Lane 1: ladder 100 bp; lane 2: negative control for the PCR reaction (without DNA); lanes 3, 4, 5, and 6: individuals with MJD (presence of expanded allele); lane 7 and 8: individuals without MJD (absence of expanded allele); lane 9: negative control; lane 10 positive control. NA= normal allele; EA= expanded allele.

Figure 2 – Polymerase chain reaction analysis of the CAG trinucleotide repeats in MJD. Samples from thirteen affected patients with 75, 76, 72, 73, 71, 71, 76, 77, 72, 72, 72, 72 and 71 triplet repeats were amplified and detected in lanes 4 to 16, respectively. Four controls were analysis in lanes 2, 3, 17 and 18. The size of the triplet repeat was compared to controls and to a molecular weight marker of 100 bp (lane 1) and 50 bp (lane 19).

Figure 3 – Distribution of CAG repeat size in the *MJD1* gene in expanded alleles.

Figure 4 – Correlation of age of onset with CAG repeat length in the MJD chromosomes of 72 affected individuals. The regression line is defined by  $Y = - 2,2728 X + 201,89$  (Y: age at onset, X: repeat length).

Figure 5 – Correlation of mean age of onset with CAG repeat length in the MJD chromosomes of 72 affected individuals.

Figure 6 – Correlation of age of onset of the MJD among of parents and sons.

Figure 7 – Correlation of CAG repeat length in the MJD gene among parents and sons.

**Table 1 – Distribution of CAG expansion size and mean age of onset.**

N° INDIV.	N° CAG	AGE OF ONSET (YEARS)		
		MEAN	SD	RANGE
2	70	42.5	6.4	38 – 47
7	71	33.9	5.8	28 – 45
12	72	39.1	10.2	27 – 58
14	73	36.2	12.9	12 – 58
4	74	43.0	9.1	31 – 50
8	75	33.4	10.8	21 – 50
10	76	31.2	7.2	21 – 42
11	77	25.7	4.9	20 - 34
3	78	16.0	7.5	09 – 24
0	79	0	0.0	0
1	80	10.0	0.0	10
<b>TOTAL</b>	72			

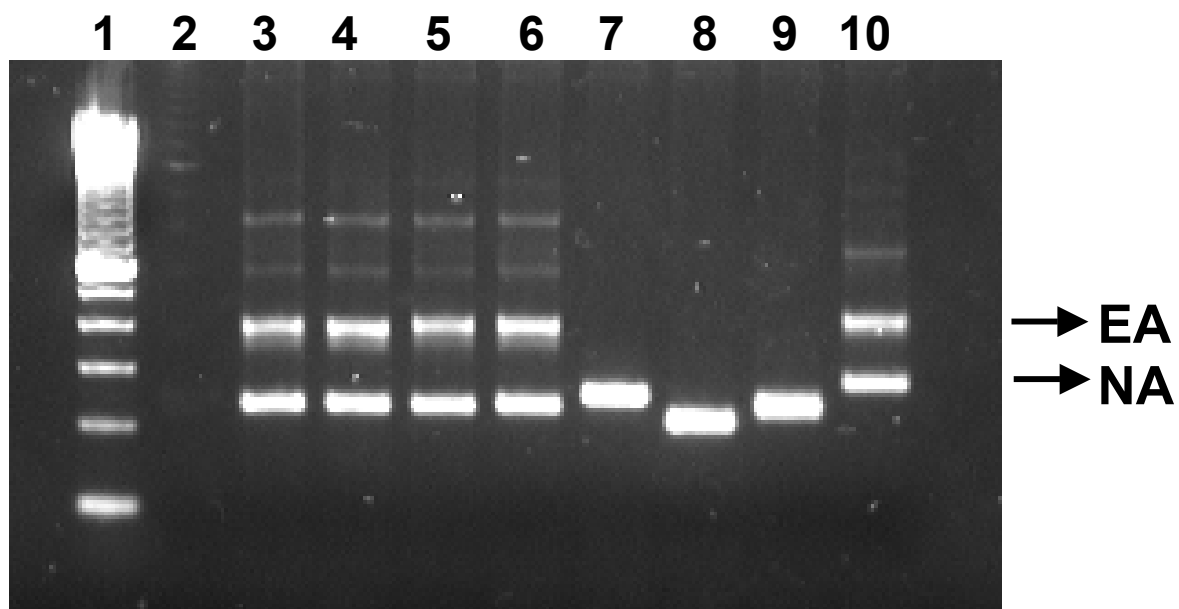
**Table 2 – Correlation between age of onset and CAG repeat size on male and female.**

	<b>MALE</b>		<b>FEMALE</b>	
	<b>AGE OF ONSET</b>	<b>CAG REPEAT</b>	<b>AGE OF ONSET</b>	<b>CAG REPEAT</b>
<b>MEAN</b>	32.9	74.3	33.7	74.3
<b>SD</b>	10.6	2.2	10.9	2.5
<b>N</b>	35	36	37	41

**Table 3 – Mean age of onset and CAG mean repeat size in parents and sons.**

<b>FAMILY</b>	<b>PARENTS</b>			<b>SONS</b>		
	<b>CAG</b>	<b>AGE</b>	<b>GENDER</b>	<b>CAG</b>	<b>AGE</b>	<b>GENDER</b>
<b>1</b>	75	44	MALE	77	20	MALE
<b>2</b>	73	48	MALE	78	15	MALE
<b>3</b>	76	30	MALE	78	9	FEMALE
<b>4</b>	76	34	FEMALE	77	22	MALE
<b>MEAN</b>	75	39		77.5	16.5	
<b>SD</b>	1.4	8.4		0.6	5.8	

**FIGURE 1**

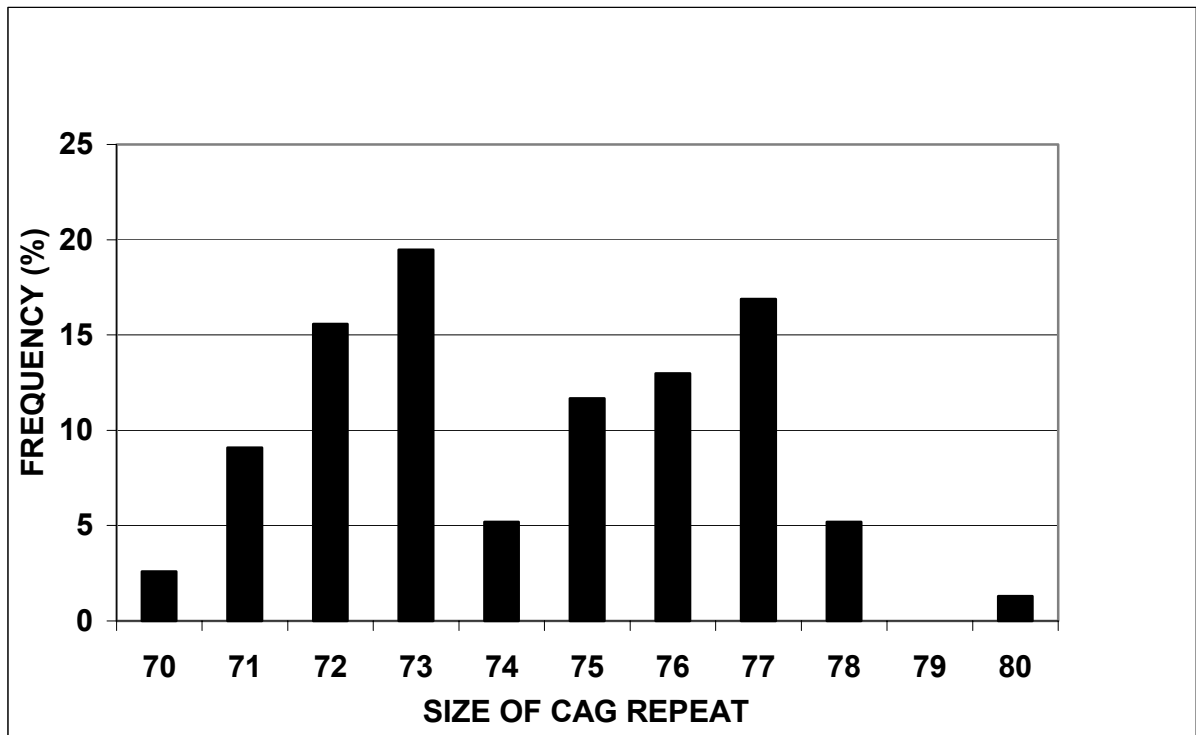


## FIGURE 2

**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19**

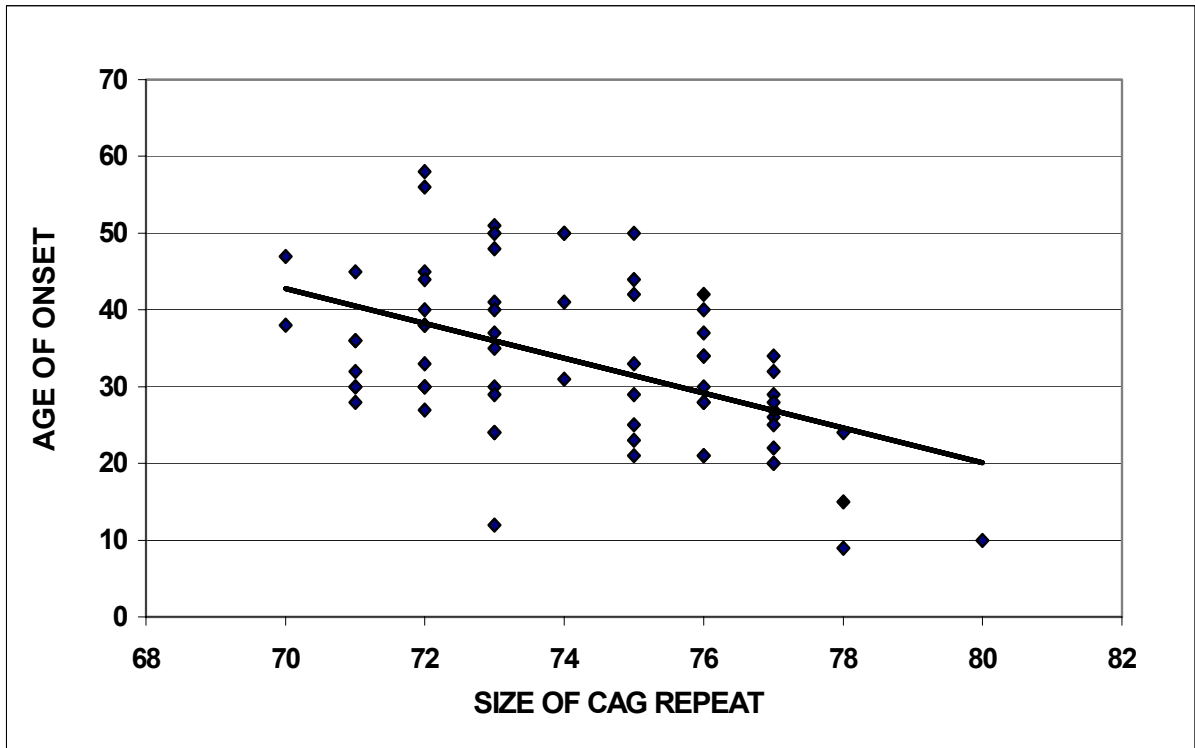


**FIGURE 3**

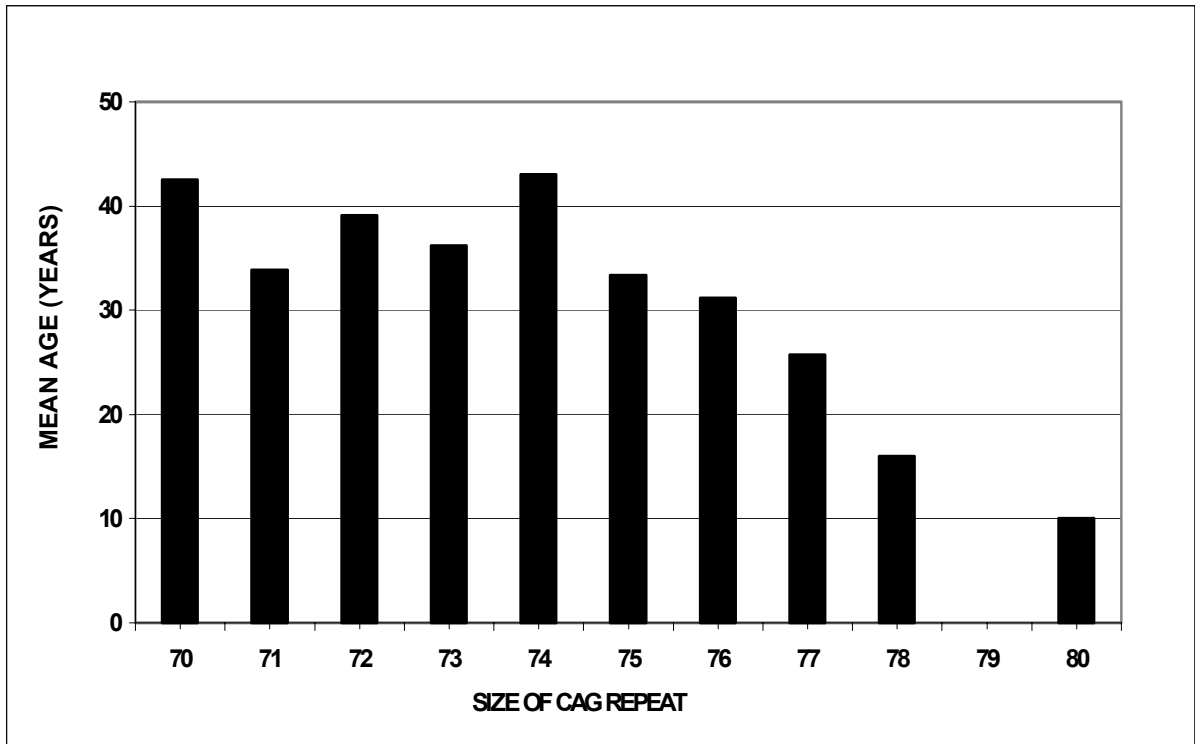




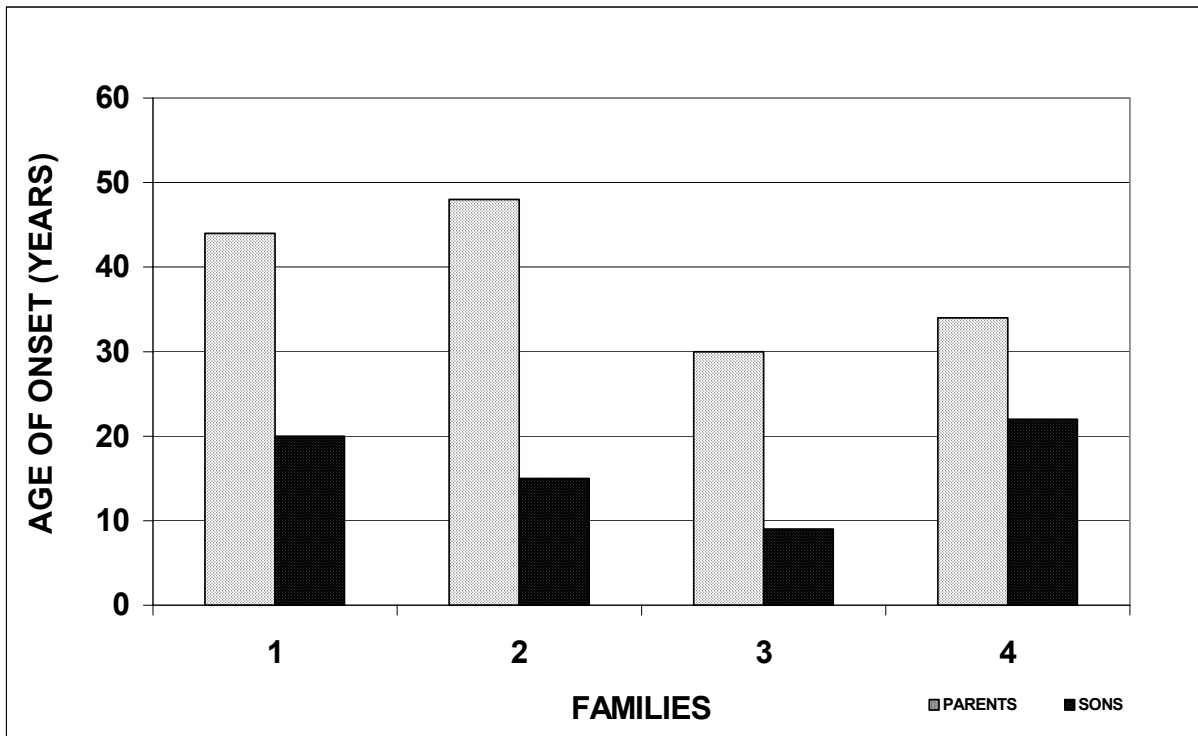
**FIGURE 4**



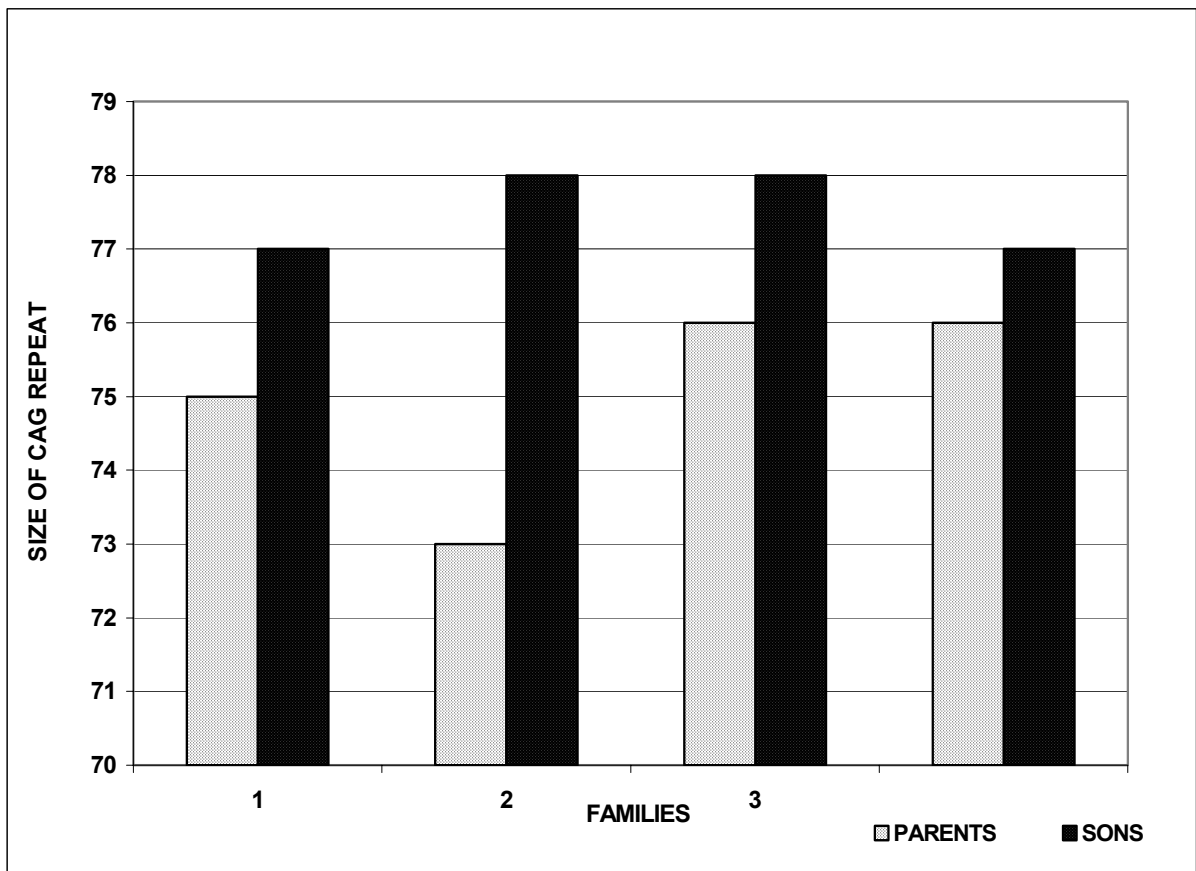
**FIGURE 5**



**FIGURE 6**



**FIGURE 7**



## CONCLUSÕES

Os achados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ A introdução de protocolos laboratoriais não-radioativos para a identificação de pacientes com DMJ demonstrou-se bastante eficaz.
- ✓ Os protocolos estabelecidos podem ser adaptados para a detecção de outras doenças genéticas causadas pelo mesmo tipo de mutação (mutações dinâmicas).
- ✓ A padronização das condições ideais para análise do tamanho da expansão trinucleotídica em pacientes com a respectiva mutação mostrou-se sensível e reprodutível, apesar da presença simultânea de fragmentos inespecíficos além do fragmento esperado.
- ✓ Através da determinação do tamanho exato da expansão CAG se torna possível uma maior contribuição para a melhor compreensão da fisiopatologia da DMJ.
- ✓ A DMJ é a mais freqüente SCA encontrada no Rio Grande do Sul, correspondendo a 61 % das famílias averiguadas.
- ✓ A idade média de início da doença dos casos analisados neste trabalho foi 7 anos mais precoce, em geral, do que a encontrada em portugueses e açorianos.
- ✓ Não existiu diferença significativa da presença da doença em um dos sexos em relação ao outro, entre os pacientes que compuseram a amostra.
- ✓ Nenhuma associação foi encontrada entre o sexo dos pacientes e o tamanho da expansão trinucleotídica ou a idade de início dos sintomas clínicos.
- ✓ Existe uma correlação inversa entre a idade de início da doença e o número de repetições CAG.

✓ A instabilidade intergeracional das expansões de trinucleotídeos foi demonstrada e parece ser uma das responsáveis pela ocorrência de antecipação nas famílias analisadas.

✓ O diagnóstico molecular da DMJ pode contribuir para a identificação precoce dos doentes, ajudar no aconselhamento genético das famílias em risco e, quando indicado, proporcionar o diagnóstico de casos pré-sintomáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENOMAR A, KROLS L, STEVANIN G, CANCEL G, LE GUERN E, DAVID G, OUHABI H, MARTIN JJ, DÜRR A, ZAIM A, RAVISE N, BUSQUE C, PENET C, VAN REGERMOTER N, WEISSENBAACH J, YAHYAOU M, CHKILI T, AGID Y, VAN BROECKHOVEN C, BRICE A (1995): The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21. *Nat Genet* 10:84-88.
- BRKANAC Z, FERNANDEZ M, MATSUSHITA M, LIPE H, WOLFF J, BIRD T, RASKIND WH (2002): Autosomal dominant sensory/motor neuropathy with Ataxia (SMNA): Linkage to chromosome 7q22-q32. *Am J Med Genet.* 114:450-457.
- CASSA E, SOUZA P, JARDIM E (1994): The epidemiology of Machado-Joseph disease at region of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. A preliminary study (Abstract). 3<sup>rd</sup> International Workshop on Machado-Joseph disease (Azores).
- 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 .
- COUTINHO P, ANDRADE C (1978): Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 28: 703-709.
- CURRIER R, SUBRAMONY S (1993): Distinguishing between the adult ataxias. In: Lechtenberg R (ed) *Handbook of cerebellar diseases.* Marcel Dekker, New York: 337-343.
- GARDNER K, ALDERSON K, GALSTER B, KAPLAN C, LEPPERT M, PTACEK L (1994): Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA 4) in a Utah kindred. *Neurology* 44(2):A361.
- GISPER S, TWELLS R, OROZCO G, BRICE A, WEBER J, HEREDERO L, SCHEUFLER K, RILEY B, ALLOTEY R, NOTHERS C, HILLERMANN R, LUNKES A, KHATI C, STEVANIN G, HERNANDEZ A, MAGARINO C, KLOCKGETHER T, DURR A, CHNEIWEISS H, ENCZMANN J, FARRAL M, BECKMANN J, MULLAN M, WERNET P, AGID Y, FREUND H-J, WILLIAMSON R, AUGURBER G, CHAMBERLAIN S (1993): Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA 2) to human chromosome 12q23-24.1. *Nat Genet* 4:295-299.

- GOLDBERG-STERN H, D'JALDETTI R, MELAMED E, GADOTH N (1994): Machado-Joseph disease on a Yemenite Jewish family in Israel. *Neurology* 44:1298-1301.
- GOUW LG, KAPLAN CD, HAINES JH, DIGRE KB, RUTLEDGE SL, MATILLA A, LEPPERT M, ZOGHBI HY, PTACEK LJ (1995): Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat Genet* 10:89-93.
- GUO-XIANG W (1994): A six years study of Machado-Joseph disease of non-Portuguese families in China. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Machado-Joseph disease (Azores).
- HARDING AE (1984): *The hereditary ataxias and related disorders*. Churchill Livingstone, New York.
- HERMAN-BERT A, STEVANIN G, NETTER J, RASCOL O, BRASSAT D, CALVAS P, CAMUZAT A, YUAN QP, SCHALLING M, DURR A, BRICE A (2000): Mapping of spinocerebellar ataxia 13 to chromosome 19q13.3-q13.4 in a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and mental retardation. *Am J Hum Genet* 67(1): 229-235.
- HOLMES SE, O'HEARN EE, MCINNIS MG, GORELICK-FELDAMN DA, KLEIDERLEIN JJ, CALLAHAN C, KWAK NG, INGERSOLL-ASHWORTH R, SHERR M, SUMNER A, SHARP AH, ANANTH U, SELTZER WK, BOSS MA, VIEIRA-SAECKER AM, EPPLEN JT, RIESS O, ROSS CA, MARGOLIS R (1999): Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23:229-235.
- IGARASHI S, TAKIYAMA Y, CANCEL G, ROGAEVA EA, SASAKI H, WAKISAKA A, ZHOU Y, TAKANO H, ENDO K, SANPEI K, OYAKE M, TANAKA H, STEVANIN G, ABBAS N, DÜRR A, ROGAEV EI, SHERRINGTON R, TSUDA T, IKEDA M, CASSA E, NISHIZAWA M, BENOMAR A, JULIEN J, WEISSENBAACH J, WANG G-X, AGID Y, GEORGE-HYSLOP P, BRICE A, TSUJU S (1996): Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Molec Genet* 5: 923-932.
- JARDIM LB (2000): Aspectos clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul: sua relação com as outras ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes e uma hipótese sobre seus fatores modificadores. "Porto Alegre": Tese de Doutorado
- JARDIM LB, PEREIRA ML, SILVEIRA I, FERRO A, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): Neurologic findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58:899-904.



- JARDIM LB, PEREIRA ML, SILVEIRA I, FERRO A, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): 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, MOREIRA MC, MENDONÇA P, FERREIRINHA F, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R (2001): 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.
- JACKSON JF, CURRIER RD, TERESAKI PI, MORTON NE (1977): Spinocerebellar ataxia and HLA linkage: risk prediction by HLA typing. *N Engl J Med* 296: 1138-1141.
- JAIN S, MAHESHWARI M (1990): Eight families with Joseph's disease in India. *Neurology* 48: 128-131.
- KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M, AIZAWA M, INOUE M, KATAYAMA S, KAWAKAMI H, NAKAMURA S, NISHIMURA M, AKIGUCHI I, KIMURA J, NARUMIYA S, KAKIZUKA A (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics* 8: 221-227.
- KLOCKGETHER T, LÜDTKE R, KRAMER B, ABELE M, BÜRK K, SCHÖLS L, RIESS O, LACCONE F, BOESCH S, LOPES-CENDES I, BRICE A, INZELBERG R, ZILBER N, DICHGANS (1998): The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* 121: 589-600.
- KNIGHT MA, KENNERSON ML, ANNEY RJ, MATSUURA T, NICHOLSON GA, SALIMI-TARI P, GARDNER RJ, STOREY E, FORREST SM (2003): Spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15) maps to 3p24.2-3pter: exclusion of the ITPR1 gene, the human orthologue of an ataxic mouse mutant. *Neurobiol Dis.* 13:147-57.
- KOIDE R, IKEUCHI T, ONODERA O, TANAKA H, IGARASHI S, ENDO K, TAKAHASHI H, KONDO R, ISHIKAWA A, HAYASHI T, SAITO M, TOMODA A, MIIKE T, NAITO H, IKUTA F, TSUJI S (1994): Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentato-rubral pallidum atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13.
- KOIDE R, KOBAYASHI S, SHIMOHATA T, IKEUCHI T, MARUYAMA M, SAITO M, YAMADA M, TAKAHASHI H, TSUJI S (1999): A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet.* 8:2047-2053.
- KOOB M, MOSELEY ML, SCHUT LJ, BENZOW K, BIRD TD, DAY JW, RANUM L (1999): An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA 8). *Nat Genet* 21:379-384.

- LISBOA MFS, MARIOTTO GSS (1984): Síndrome de Joseph: observação de uma família. *Arq Neuropsiquiatr (supl)*: 45.
- MACIEL P, GASPAR C, DESTEFANO AL, SILVEIRA I, COUTINHO P, RADVANY J, DAWSON DM, SUDARSKY L, GUIMARAES J, LOUREIRO JEL, NEZARATI MN, CORWIN LI, LOPES-CENDES I, ROOKE K, ROSENBERG R, MACLEOD P, FARRER LA, SEQUEIROS J, ROULEAU GA (1995): Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-joseph disease. *Am J Hum Genet* 57: 54-61.
- MACIEL P, GASPAR C, GUIMARÃES L, GOTO J, LOPES-CENDES I, HAYES S, ARVIDSSON K, DIAS A, SEQUEIROS J, SOUZA A, ROULEAU GA (1999): Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Eur J Hum Genet* 7: 147-156.
- MARUYAMA H, NAKAMURA S, MATSUYAMA Z, SAKAI T, DOYU M, SOBUE G, SETO M, TSUJIHATA M, OH-I T, NISHIO T, SUNOHARA N, TAKAHASHI R, HAYASHI M, NISHINO I, OHTAKE T, ODA T, NISHIMURA T, SAIDA MATSUMOTO H, BABA M, KAWAGUCHI Y, KAKIZUKA A, KAWAKAMI H (1995): Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4: 807-812.
- MIYOSHI Y, YAMADA T, TANIMURA M, TANIWAKI T, ARAKAWA K, OHYAGI Y, FURUYA H, YAMAMOTO K, SAKAI K, SASAZUKI T, KIRA J (2001): A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1. *Neurology*. 57:96-100.
- NAKANO KK, DAWSON DM, SPENCE A (1972): Machado disease. A hereditary ataxia Portuguese emigrations to Massachusetts. *Neurology* 22:49.
- ORR HT, CHUNG M, BANFI S (1993): Expansion of an unstable CAG repeat in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet* 4: 221-226.
- RADVANY J, AVILA JO, GABBAI AA, BACHESCHI LA (1988): Doença de Machado-Joseph no Brasil: o relato das primeiras duas famílias. *Arq Neuropsiquiatr (supl)*: 46b.
- RANUM LP, SHUT LJ, LUNDGREN JK, ORR HT, LIVINGTON DM (1994): Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet* 8:280-284.
- ROMANUL F, FOWLER H, RADVANY J, FELDMAN R, FEINGOLD M (1977): Azoren disease of the nervous system. *N Engl J Med* 296: 1505-1508.

- ROSENBERG RN, NYHAN WL, BAY C, SHORE P (1976): Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26:703-714.
- ROSENBERG RN (1990): Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology* 45:1-5.
- SEQUEIROS J, COUTINHO P (1993): Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds) *Advances in neurology*. Raven Press, New York, pp 139 - 153.
- SEQUEIROS J (1996): Genética clássica e genética molecular da doença de Machado Joseph. In: Sequeiros J, editor. *O teste preditivo da doença de Machado-Joseph*. Primeira edição. Porto: UnIGENE, IBMC, pp 33 - 48.
- SILVEIRA I, LOPES-CENDES I, KISH S, MACIEL P, GASPAR C, COUTINHO P, BOETZ MI, TEIVE H, ARRUDA W, STEINER CE, PINTO-JÚNIOR W, MACIEL JA, JAIN S, SACK G, ANDERMANN E, SUDARSKY L, ROSENBERG RN, MACLEOD PM, SEQUEIROS J, ROULEAU G (1996): Frequency of spinocerebellar ataxia type I, dentarubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 46: 214-218.
- SILVEIRA I (1997): Mapeamento Cromossômico da Doença de Machado-Joseph e Heterogeneidade Genética das Ataxias Dominantes. "Porto ": Dissertação de Doutorado.
- SUBRAMONY S, CURRIER R (1991): The classification of familial ataxias. In: Vinken P, Bruyn G, Klawans H (eds) *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier Science Publishers, New York: 271-284.
- SUITE N, SEQUEIROS J, McKHANN G (1986): Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family. *J Neurolgenet* 3: 177-182.
- TAKIYAMA Y, NISHIZAWA M, TANAKA H, KAWASHIMA S, SAKAMOTO H, KARUBE Y, SHIMAZAKI H, SOUTOME M, ENDO K, OHTA S, KAGAWA I, MIZUNO Y, YOSHIDA M, YUASA T, HORIKAWA Y, OYANAGI K, NAGAI H, KONDO T, INUZUKA T, ONODERA O, TSUJI S (1993): The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Natu Genet* 4:300-303.
- TEIVE HAG, ARRUDA W, TREVISOL-BITTENCOURT PC (1991): Descrição de cinco membros de uma família catarinense de origem açoriana. *Arq Neuropsiquiat*. 49:172-179.
- TEIVE HAG, ARRUDA W, TREVISOL-BITTENCOURT PC (1994): Machado-Joseph disease in South of Brazil. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Machado-Joseph disease (Azores).

- VERBEEK DS, SCHELHAAS JH, IPPEL EF, BEEMER FA, PEARSON PL, SINKE RJ (2002): Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Hum Genet.* 111:388-393.
- VUILLAUME I, DEVOS D, SCHRAEN-MASCHKE S, DINA C, LEMAINQUE A, VASSEUR F, BOCQUILLON G, DEVOS P, KOCINSKI C, MARZYS C, DESTEE A, SABLONNIERE B (2002): A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol.* 52:666-670.
- WOODS BT AND SCHAUMBURG HH (1972): Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear opthalmoplegia. A unique and partially treatable clinic-pathological entity. *J Neurol Sci* 17:149-166
- WORTH PF, GIUNTI P, GARDNER-THÓRPE C, DIXON PH, DAVIS MB, WOOD NW (1999): Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3 *Am J Hum Genet* 65:420-426.
- YAKURA H, WAKISAKA A, FUJIMOTO S, ITAKURA K (1974): Hereditary ataxia and HLA genotypes. *N Engl J Med* 291:154-155.
- YUASA T, OHAMA E, HARAYAMA H, YAMADA M, MIYTAKE T (1986): Joseph's disease: clinical and pathological studies in a Japanese family. *Ann Neurol* 19: 152-157.
- YAMASHITA I, SASAKI H, YABE I, FUKAZHWA T, NOGOSHI S, KOMEICHI K, TAKADA A, SHIRAISHI K, TAKIYAMA Y, NISHIZAWA M, KANEKO J, TANAKA H, TSUIJI S, TASHIRO K (2000): A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA 14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q13.4-qter. *Ann Neurol* 48:156-163.
- ZHUCHENCO O, BAILEY J, BONNEN P, AHIZAWA T, STOCKTON D, AMOS C, DOBYNS W, SUBRAMONY SH, ZOGHBI H, LEE CC (1997): Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA 6) associated with small polyglutamine expansions in the  $\alpha 1$  A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-68.
- ZU L, FIGUEROA KP, GREWAL R, ET AL. (1999): Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22. *Am J Hum Genet* 64:594-599.

## ANEXOS

### *PROTÓCOLOS DE ANÁLISE MOLECULAR*

*Extração de DNA genômico a partir de sangue total:* o DNA genômico foi extraído a partir de 5 ou 10 mL de sangue coletado em EDTA. Foi utilizado o método de precipitação com sais (*salting-out*), descrito a seguir:

1. Transferir o sangue para um tubo plástico cônico estéril de 50 mL.
2. Adicionar água destilada estéril gelada até completar 50 mL e agitar a amostra em agitador de tubos.
3. Centrifugar a amostra por 20 minutos a 4.000 rpm em TA e desprezar o sobrenadante.
4. Adicionar 25 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) ao precipitado e homogeneizar o precipitado por alguns segundos até que este fique completamente ressuspenso.
5. Centrifugar a solução por 20 minutos a 4.000 rpm em TA e desprezar o sobrenadante.
6. Adicionar ao precipitado 3 mL de tampão de lise nuclear (Tris-HCl 100 mM pH 8,3; NaCl 4 M; EDTA 20 mM pH 8,2) e agitar a solução no agitador de tubos durante aproximadamente 20 segundos.
7. Adicionar 120 µL da solução de proteinase K 10 mg/mL, seguida de 200 µL de SDS 10% (p/v) e agitar rapidamente a solução no agitador de tubos.
8. Incubar a amostra a 37°C durante um período de 12 a 16 horas.
9. Adicionar 1 mL de acetato de amônio 9,6 M e homogeneizar no agitador de tubos por 15 segundos.

10. Deixar a amostra em TA por 10 a 15 minutos.
11. Centrifugar a solução durante 20 minutos a 4.000 rpm em TA e transferir o sobrenadante para um frasco de vidro de 20 mL estéril.
12. Adicionar ao sobrenadante 10 mL de etanol absoluto gelado e misturar levemente por inversão.
13. Retirar o DNA precipitado com auxílio de um capilar de vidro e transferi-lo para um tubo de plástico cônico de 1,5 mL.
14. Ressuspender o DNA em 150 a 200  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) ou mais, dependendo da quantidade de DNA obtida.
15. A solução deve ser mantida em TA durante alguns minutos e posteriormente armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

Uma alíquota de 10  $\mu$ L da solução de DNA foi colocada em um tubo de plástico cônico de 1,5 mL e diluída até 500  $\mu$ L com água estéril. A amostra foi homogeneizada para uma posterior leitura da concentração do DNA em espectrofotômetro ( $\lambda=260\text{nm}$ ).

Com base na concentração obtida da solução de DNA foi calculada uma nova diluição para uma concentração final de aproximadamente 100 ng/ $\mu$ L.

*Marcação da sonda e detecção dos alelos utilizando ECL<sup>TM</sup> 3'-oligolabelling and detection system (Amersham):* o protocolo empregado baseou-se nas informações fornecidas pelo fabricante, como segue a seguir:

1. Hibridizar a membrana com 6,25  $\rho$ moles de uma sonda composta de 15 repetições CAG, previamente marcada com fluoresceína-11-dUTP na posição 3' terminal. A hibridização deve

ocorrer a 56°C durante 12 a 16 horas, sob agitação constante, e, após decorrido este tempo, lava-se a membrana inicialmente com solução de SSC 5X - SDS 0,1% (p/v) durante 10 minutos em temperatura ambiente, seguido por lavagem com solução de SSC 1X - SDS 0,1% (p/v) durante 30 min. na mesma temperatura de hibridização.

2. Preparar a membrana para a reação com o anticorpo pela manutenção da mesma por 30 minutos em solução contendo NaCl 0,15 M - Tris-HCl 0,1 M – *liquid block*<sup>TM</sup> diluído 1:20. A reação com a anti-fluoresceína deve ser realizada em solução contendo NaCl 0,4 M - Tris-HCl 0,1 M – albumina bovina 0,5% (p/v) e o anticorpo conjugado diluído 1:1000 durante 30 minutos em temperatura ambiente.

3. A detecção dos fragmentos de DNA hibridizados à sonda deve ser realizada pela utilização de um reagente contendo peróxido de hidrogênio, o qual libera O<sub>2</sub> livre por ação da peroxidase. O O<sub>2</sub> liberado irá oxidar o luminol, presente em um segundo reagente de detecção, produzindo luz azul ( $\lambda$  max 428 nm), a qual é detectada em um filme de autoradiografia hipersensível.

*Detecção do tamanho das expansões CAG:* Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 5% (v/v) conforme descrição abaixo:

1. Um volume de 5,0  $\mu$ L do produto amplificado por PCR foi adicionado a 2,0  $\mu$ L de *loading buffer*. Paralelamente às amostras, foi aplicado no gel 6  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 50 pb.

2. Realizou-se a separação eletroforética, aplicando-se, primeiramente, uma força de 7 W por 2 horas, seguida por mais 7 horas a 8 W.

3. Transcorrido o tempo necessário revelou-se o gel utilizando solução de nitrato de prata, através da técnica abaixo:

3.1. Cobrir o gel com solução de etanol a 10% (v/v) durante 5 minutos para fixação das amostras.

3.2. Transferir o gel para solução de ácido nítrico 1% (v/v) durante 3 minutos para oxidar o gel.

3.3. Usar água destilada e deionizada durante poucos segundos para lavar o gel.

3.4. Cobrir o gel com solução de nitrato de prata 0,012 M durante 20 minutos para impregnação com prata.

3.5. Lavar o gel com água destilada e deionizada durante poucos segundos.

3.6. Cobrir o gel com solução de carbonato de sódio anidro 0,28 M e formaldeído 37% (v/v), até que as bandas apareçam por completo (aproximadamente 15 minutos) para revelar o gel.

3.7. Usar solução de ácido acético a 10% (v/v) durante 2 minutos para parar o processo.

3.8. Lavar o gel com água destilada e deionizada durante poucos segundos.

3.9. Cobrir o gel com solução de etanol 50% (v/v) durante 30 minutos para encolher o mesmo.

O gel foi transferido para papel Whatman e colocado em um secador de gel a vácuo. O mesmo foi mantido durante 25 minutos a uma temperatura de 65°C até a secagem completa.