

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Análise Molecular e Clínica das Ataxias Espinocerebelares

TESE DE DOUTORADO

Alexis Trott

Porto Alegre

2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**ANÁLISE MOLECULAR E CLÍNICA DAS ATAXIAS
ESPINOCEREBELARES**

Alexis Trott

Orientador

Prof. Dr. Roberto Giugliani

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, novembro de 2006

A todos que por mim têm consideração, carinho e amizade e, principalmente, aos meus orientadores, aos meus pais, à minha esposa e, especialmente, à minha filha Catharina!

*Muitas vezes vivemos a vida acorrentados
E nem sequer sabemos que temos a chave*

The Eagles

*Nada há de permanente,
Exceto a mudança*
Heráclito, 450 a.C.

Agradecimentos

Ao Dr. Roberto Giugliani pela orientação, apoio, paciência, amizade e confiança depositada.

À Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade, companheirismo e confiança depositada para realização deste importante trabalho.

À Dra. Laura Jardim pelo apoio e participação na publicação dos artigos e na tese. Sua orientação quanto aos aspectos clínicos e científicos foi de grande importância.

Aos pacientes e seus familiares pela colaboração.

Às fontes financiadoras de pesquisa; CAPES, FINEP/PRONEX, FAPESP, FAPESP/MCT.

Meus agradecimentos a todos os profissionais envolvidos com o serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente à amiga Marilda, por resolver os “espetáculos laboratoriais”.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular, com os quais dividi muitas experiências, dentro e fora do mesmo.

Aos professores e colegas de Doutorado e Mestrado da Bioquímica.

À secretária do Departamento de Bioquímica da UFRGS, Cléia Bueno, e a todos os funcionários deste departamento pela voluntariedade, apoio e amizade.

A todos os meus amigos e pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese de Doutorado.

À minha mãe Neusa S. Trott, meu pai Lauro Trott, meu irmão Giórgio Trott e toda minha família pelo apoio, amizade e incentivo.

À minha querida e amada esposa Inajara de Oliveira Trott por todo o apoio, ajuda, incentivo e amor dedicados. Homenagem a minha querida sogra Lucila Celita Dapper.

À minha linda e maravilhosa filha Catharina de Oliveira Trott por simplesmente existir, além de seu amor e doçura, constituindo-se no meu maior incentivo a lutar e vencer em todos os aspectos de minha vida.

Lista de abreviaturas

Ataxia FGF14 - Fator 14 de crescimento de fibroblastos.

Bp – Base pairs.

cM – Centimorgans.

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos.

DRPLA - Atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana.

EA – Ataxia Esporádica.

FHM - Enxaqueca hemiplégica familiar.

HD – Doença de Huntington.

HLA - Complexo de histocompatibilidade.

HPCA - Ataxia cerebelar paroxística hereditária.

HSA - Ataxia espástica hereditária.

KDa – Quilo Dalton.

KW – Teste de Kruskal-Wallis

MJD – Doença de Machado-Joseph (do inglês, Machado – Joseph Disease).

MJD1- Gene responsável pela MJD/SCA3.

NIs - Inclusões nucleares.

Pb – Pares de bases.

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

RNA – Ácido ribonucléico.

SBMA – Atrofia muscular bulbar espinhal.

SCA - ataxia espinocerebelar autossômica dominante (do inglês, *spinocerebellar ataxia*).

SCA1 – ataxia espinocerebelar tipo 1.

SCA2 – ataxia espinocerebelar tipo 2.

SCA3 – ataxia espinocerebelar tipo 3.

SCA6 – ataxia espinocerebelar tipo 6.

SCA7 – ataxia espinocerebelar tipo 7.

SCA10 – ataxia espinocerebelar tipo 10.

SCA17 – ataxia espinocerebelar tipo 17.

SMNA - Neuropatia sensorial e motora com ataxia.

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1 As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes (SCAs)	1
1.2 Ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1)	6
1.3 Ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2)	8
1.4 Ataxia espinocerebelar tipo 3 (MJD/SCA3)	10
1.5 Ataxia espinocerebelar tipo 6 (SCA6)	12
1.6 Ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7)	14
1.7 As Poliglutaminas	16
1.7.1 Fisiopatologia das expansões CAGs	16
1.7.2 Formação dos agregados de poliglutaminas	18
1.7.3 Agregados de poliglutaminas e a morte celular	19
1.7.4 Tratamento dos sintomas e prevenção	20
1.8 Fenômeno da antecipação e os fatores modificadores	21
1.9 Justificativa	22
2. Objetivos	24
3. Resultados e Discussão	25
3.1 Artigo 1	26
3.2 Artigo 2	31
3.3 Artigo 3	53
3.4 Artigo 4	64
4. Considerações Finais	70
4.1 Os diagnósticos moleculares	70
4.2 Fatores modificadores genéticos para MJD/SCA3	71
4.3 As frequências das SCAs no sul do Brasil	72
4.4 Perspectivas	73
5. Bibliografia	74
6. Anexos	88
Anexo I – Seqüência parcial do gene da SCA1	88
Anexo II - Seqüência parcial do gene da SCA2	89
Anexo III - Seqüência parcial do gene da SCA6	90

Anexo IV – Seqüência parcial do gene da SCA7	91
Anexo V - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA1	92
Anexo VI - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA2	93
Anexo VII - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA6	94
Anexo VIII - Determinação do tamanho dos alelos em casos SCA2 e SCA6	95

Resumo

As ataxias espinocerebelares dominantes (SCAs), do inglês *spinocerebellar ataxia*, são um complexo grupo de doenças neurodegenerativas que afetam o cerebelo e suas principais conexões. O início das SCAs ocorre geralmente na vida adulta apresentando grande heterogeneidade clínica. Os sintomas normalmente aparecem da terceira a quarta década de vida com progressão lenta. Ao longo das gerações, os sintomas podem iniciar mais cedo com uma progressão mais severa, fenômeno chamado de antecipação.

Este estudo teve como objetivos: (1) estabelecer protocolos não radioativos para detecção e caracterização de mutações dinâmicas nos genes da SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7; (2) analisar pacientes com suspeita clínica de uma SCA; (3) determinar o tamanho da expansão trinucleotídica presente nos pacientes com resultado alterado na avaliação qualitativa, bem como o tamanho das repetições CAG nos alelos normais; (4) identificar outros portadores da mutação em questão entre os familiares do caso índice; (5) estudar um grupo de pacientes com MJD (Doença de Machado – Joseph), do inglês Machado – Joseph Disease, para os genes da SCA1, SCA2 e SCA6, analisando-os como possíveis genes modificadores e (6) estudar a frequência e as características moleculares, clínicas e epidemiológicas das SCAs tipos 1, 2, 3, 6, 7, 10, 17 e DRPLA (atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana) em famílias do sul do Brasil.

Neste estudo, eficientes protocolos não radioativos foram estabelecidos para verificar alelos normais e alelos expandidos nos *loci* associados à SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7. Foram detectados casos positivos para as quatro SCAs estudadas. Nossos resultados confirmam a hipótese de que casos de outras SCAs, além de MJD, a ataxia mais freqüente em nossa região, ocorrem em nossa população. Em pacientes com SCA2, uma correlação inversa entre idade de início da doença e o tamanho da repetição CAG de cada paciente caracterizou o fenômeno da antecipação. Não houve correlação significativa entre o tamanho das repetições CAG nos genes SCA1, SCA2 and SCA6 e o fenótipo observado em pacientes com Machado-Joseph.

Entre as SCAs, a MJD é a mais freqüente entre os pacientes brasileiros, sendo que, após esse estudo, poucas famílias permaneceram sem diagnóstico de uma SCA específica. Algumas correlações clínicas foram observadas; associação de SCA7 com uma maior antecipação, achados piramidais e atrofia óptica, e a associação de SCA6 com ataxia mais severa de membros.

Abstract

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of neurodegenerative diseases that affect the cerebellum and main connections. Onset of SCAs is generally in the adult life and shows great clinical heterogeneity. Symptoms normally appear from third to fourth decade of life and progress slowly. In successive generations, symptoms can initiate earlier with a more severe progression, a phenomenon called anticipation.

The present study aimed: (1) the establishment of non-radioactive molecular protocols for detection and characterization of dynamic mutations in SCA1, SCA2, SCA6, and SCA7 genes; (2) to analyse patients who show sign and/or symptoms of a SCA; (3) to determine the trinucleotide expansion length in positive patients, and CAG repeats length in normal alleles; (4) the identification of other individuals carrying mutations within families of affected patients; (5) to establish a possible correlation between CAG expansions in SCA1, SCA2, and SCA6 genes and phenotype in MJD (Machado-Joseph disease) patients, and (6) to determine the frequency, clinical, epidemiological, and molecular features of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA10, SCA17, and DRPLA (dentato-rubro-pallido-luysiana atrophy) among SCA families of Southern Brazil.

In this study, efficient non-radioactive protocols were established to verify normal and expanded alleles in *loci* associated to SCA1, SCA2, SCA6, and SCA7. We detected positive cases for four SCAs. Our results confirm the hypothesis that other SCAs, in addition to MJD, the most frequent ataxia in our region, occur in our population. In SCA2 patients, an inverse correlation between age of onset and CAG repeat length of each patient characterized the phenomenon of anticipation. There was no significant correlation between CAG repeats length in SCA1, SCA2, and SCA6 genes and phenotype observed in Machado-Joseph patients.

MJD is the most frequent SCA among Brazilians. Relatively few SCA families remain undiagnosed in our population. Some clinical correlations were observed; association of SCA7 with more severe anticipation, pyramidal findings and optic atrophy, and the association of SCA6 with a more severe limb ataxia.

1. Introdução

O cerebelo faz parte do sistema nervoso central humano sendo o centro coordenador dos movimentos e participando no equilíbrio e na orientação do corpo. É formado por dois hemisférios e encontra-se logo abaixo do cérebro, na parte posterior do tronco encefálico. As vias cerebelares compreendem o córtex e a ponte.

A função básica do cerebelo é coordenar os movimentos quanto ao ritmo, a amplitude do movimento, a harmonia, a seqüência, o sinergismo e o antagonismo. As principais funções cerebelares são a manutenção do equilíbrio e da postura e o controle do tônus muscular e dos movimentos voluntários, além da aprendizagem motora e da memorização. A função de coordenação dos movimentos feita pelo cerebelo chama-se *taxia*, do grego, coordenação. As doenças causadas por lesões no cerebelo têm como sintoma fundamental a incoordenação motora, ou *ataxia*.

Muitas doenças genéticas do cerebelo e suas conexões manifestam-se como *ataxias* autossômicas dominantes ou recessivas, sendo que a denominação “*ataxia espinocerebelar*” tem sido utilizada na designação das mesmas. Porém, o uso de tal expressão é mais comum no caso das doenças autossômicas dominantes. As formas recessivas são muito particulares, possuem poucas características em comum e, portanto, não são reunidas por nomes ou acrônimos, como por exemplo, a *ataxia de Friedreich*, a *ataxia telangiectasia*, bem como as *ataxias* com nomes designados por defeitos metabólicos específicos, como a *ataxia por deficiência da vitamina E*.

Deste modo, as *ataxias* herdadas de forma dominante são reunidas sob a expressão “*ataxia espinocerebelar*” com a freqüente utilização do acrônimo SCA, do inglês *spinocerebellar ataxia*. Essas doenças são pouco distinguíveis clinicamente, sendo que várias delas compartilham um mesmo mecanismo mutacional, ou seja, apresentando semelhanças fenotípicas e etiológicas.

1.1 As *ataxias* espinocerebelares autossômicas dominantes (SCAs)

As *ataxias* espinocerebelares autossômicas dominantes, ou SCAs, constituem um grupo complexo de doenças neurodegenerativas, que atingem o cerebelo e suas principais conexões. Frequentemente fatais, as SCAs são herdadas de modo vertical, manifestam-se geralmente na vida adulta e apresentam grande heterogeneidade clínica (Zoghbi e Orr, 2001).

Os pacientes acometidos pelas SCAs apresentam vários achados neurológicos provenientes do comprometimento cerebelar e das vias aferentes e eferentes, tais como a disartria, a dismetria, o nistagmo, o tremor de intenção, a decomposição de movimentos, a disdiadococinesia, a ataxia axial, podendo haver ainda alterações nos gânglios da base, no tronco cerebral, na medula espinhal, nos nervos ópticos, na retina e nos nervos periféricos.

Em determinadas famílias, principalmente em famílias grandes onde várias pessoas manifestam os sintomas de uma determinada SCA, ocorre uma ampla gama de variação dos sintomas. A história familiar é consistente com a herança autossômica dominante de um único gene principal, mas os fenótipos resultantes são individualmente tão heterogêneos que não poderiam ser extrapolados para servirem de critério diagnóstico para casos de fora dessa família (Harding, 1984).

Anteriormente aos avanços da genética molecular, a classificação destas doenças baseava-se na patogênese das mesmas não havendo o conhecimento do defeito genético, da causa específica das doenças e dos *loci* envolvidos. Com o avanço da genética molecular, foi possível então a busca das mutações que levavam aos diferentes tipos de ataxias espinocerebelares. Desta forma, comprovou-se a ocorrência de defeitos genéticos distintos localizados em diferentes regiões do genoma sendo que vários *loci* das SCAs já foram mapeados.

Yakura e colaboradores, em 1974, obtiveram êxito pela primeira vez com estudos de ligação gênica das SCAs a um marcador genético. Neste trabalho, tais pesquisadores relataram a proximidade do complexo de histocompatibilidade (HLA) e a SCA do tipo I. Segundo os autores, o gene responsável pela ataxia estaria a 12 cM do complexo HLA no cromossomo 6 (6p22-p23). Este *locus* foi designado de SCA1 (Yakura *et al*, 1974; Jackson *et al*, 1977; Zoghbi *et al*, 1988). Os principais avanços no entendimento das SCAs ocorreram a partir dos anos 80 com o uso de marcadores genéticos (Stevanin *et al*, 2000). A partir de 1993, houve uma rápida sucessão de descobertas com relação à localização e à identificação de outros genes responsáveis por diferentes ataxias. Orr e colaboradores (1993) confirmaram a localização do gene para SCA1 no cromossomo 6p22-p23 demonstrando a presença da seqüência repetitiva altamente polimórfica CAG, a qual encontra-se expandida em indivíduos doentes. Ainda em 1993, Gispert e colaboradores mapearam o *locus* da SCA2 no cromossomo 12q23-q24.1 e Takiyama e colaboradores mapearam, no cromossomo 14q24.3-q32, o gene da doença de Machado-Joseph (MJD), denominando-o de *MJD1*. Atualmente, são conhecidos vários *loci* relacionados com algum tipo de SCA (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Localizações dos genes responsáveis pelas SCAs.

Ataxia	Localização	Referência
SCA1	6p22-p23	Orr <i>et al</i> , 1993; Zuhlke <i>et al</i> , 2002
SCA2	12q23-24.1	Gispert <i>et al</i> , 1993; Kakizuka, 1998
MJD/SCA3	14q24.3-q32	Takiyama <i>et al</i> , 1993; Kawaguchi <i>et al</i> , 1994
SCA4	16q24-ter	Gardner <i>et al</i> , 1994
SCA5	11q13	Zhu <i>et al</i> , 1998
SCA6	19p13	Tashiro <i>et al</i> , 1999
SCA7	3p12-p12.1	Benomar <i>et al</i> , 1995; Lebre and Brice, 2003
SCA8	13q21	Koob <i>et al</i> , 1999
SCA10	22q13.3	Potaman <i>et al</i> , 2003; Lin and Ashizawa, 2003
SCA11	15q14-21.3	Worth <i>et al</i> , 1999
SCA12	5q31-33	Holmes <i>et al</i> , 2001; Holmes <i>et al</i> , 2003
SCA13	19q13.3-q13.4	Herman-Bert <i>et al</i> , 2000
SCA14	19q13.4-qter	Yamashita <i>et al</i> , 2000; Brkanac <i>et al</i> , 2002 ^a
SCA15	3p24.2-3pter	Knight <i>et al</i> , 2003
SCA16	8q22.1-24.1	Miyoshi <i>et al</i> , 2001
SCA17	6q27	Nakamura <i>et al</i> , 2001; Oda <i>et al</i> , 2004
SCA19	1p21-q21	Verbeek <i>et al</i> , 2002
SCA20	Cromossomo 11	Knight <i>et al</i> , 2004
SCA21	7p21.3-p15.1	Vuillaume <i>et al</i> , 2002
SCA22	1p21-q23	Chung <i>et al</i> , 2003
SCA25	2p	Stevanin <i>et al</i> , 2004
DRPLA	12p12-ter	Koide <i>et al</i> , 1994
EA1	12p13	Browne <i>et al</i> , 1994; Rea <i>et al</i> , 2002
EA2	19p13	Subramony <i>et al</i> , 2003
EA3	-	Damji <i>et al</i> , 1996; Steckley <i>et al</i> , 2001
EA4	-	Steckley <i>et al</i> , 2001
EA5	2q22-q23	Escayg <i>et al</i> , 2000
HSA	12p13	Meijer <i>et al</i> , 2002
SMNA	7q22-q32	Brkanac <i>et al</i> , 2002b
Ataxia FGF14	13q34	Van Swieten <i>et al</i> , 2003

HSA = Ataxia espástica hereditária; SMNA = Neuropatia sensorial e motora com ataxia; FGF = Fator 14 de crescimento de fibroblastos.

Tabela 2. Defeito básico das SCAs e as faixas de normalidade e expansão.

Ataxia	Mutação	Faixa de Normalidade	Faixa Expandida
SCA1	(CAG) _n	(6-39)	(40-81)
SCA2	(CAG) _n	(14-31)	(35-59)
MJD/SCA3	(CAG) _n	(12-37)	(61-84)
SCA4	-	-	-
SCA5	-	-	-
SCA6	(CAG) _n	(4-15)	(21-27)
SCA7	(CAG) _n	(4-35)	(36-306)
SCA8	(CTG) _n	(16-37)	(107-127)
SCA10	(ATTCT) _n	(10-22)	(800-4500)
SCA11	-	-	-
SCA12	(CAG) _n	(9-28)	(55-78)
SCA13	-	-	-
SCA14	-	-	-
SCA15	-	-	-
SCA16	-	-	-
SCA17	(CAG) _n	(27-42)	(43-63)
SCA19	-	-	-
SCA20	-	-	-
SCA21	-	-	-
SCA22	-	-	-
SCA25	-	-	-
DRPLA	(CAG) _n	(7-35)	(49-88)
EA1	Mutações de Ponto	-	-
EA2	Mutações de Ponto	-	-
EA3	-	-	-
EA4	-	-	-
EA5	Mutações de Ponto	-	-
HSA	-	-	-
SMNA	-	-	-
Ataxia	-	-	-
FGF14			

De acordo com Stevanin e colaboradores (2000), as evidências apontam para os mesmos processos moleculares e fisiopatológicos nas diversas SCAs e outras doenças neurodegenerativas, as quais compartilhariam a mesma mutação, denominada mutação

dinâmica e caracterizada por uma expansão de nucleotídeos. No caso das SCAs, uma boa parte delas apresenta uma expansão CAG na região codificante dos respectivos genes, a qual codifica um segmento de poliglutamina. As exceções, até o momento, são a SCA8 e a SCA10, sendo que a SCA8 é causada pela expansão do trinucleotídeo CTG e a SCA10 pela expansão do pentanucleotídeo ATTCT.

As mutações dinâmicas são encontradas também em outras doenças neurológicas, como na doença de Huntington e na atrofia muscular espinhal ligada ao X. Outras alterações, localizadas em regiões não transcritas, também são responsáveis por várias síndromes de sítios frágeis formados por repetições (CGG)_n e (GCC)_n, ou ainda pela distrofia miotônica (CTG)_n e ataxia de Friedreich (GAA)_n (Willems, 1994; Campuzano *et al*, 1996; Strong e Brewster, 1997).

De acordo com a patogênese das SCAs, elas podem ser classificadas em três grupos: 1) doenças causadas por toxicidade de poliglutaminas, como por exemplo SCA1, SCA2, SCA3, SCA7, SCA17 e a atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana ou DRPLA; 2) patologias causadas por disfunção de canais de cálcio e potássio, como por exemplo a SCA6 e as ataxias episódicas (EA1 e EA2); e 3) ataxias causadas por repetições nucleotídicas não transcritas, as quais provocam alteração da expressão gênica, como por exemplo a SCA8, SCA10, e a SCA 12 (Margolis, 2002; Wullner, 2003).

Embora ainda não seja conhecida a função das proteínas produzidas pelos genes envolvidos na maioria das ataxias, a expressão de um segmento mais longo de glutaminas pelo alelo mutado é a causa da doença em muitos dos casos. Segundo um estudo realizado com ratos transgênicos produzindo cadeias de poliglutamina, os animais desenvolveram um quadro de degeneração cerebral muito semelhante à doença em humanos (Jones *et al*, 1997). Além disto, segmentos de poliglutaminas expressos em células COS-7 demonstraram que os mesmos se agregam no citoplasma perinuclear e também no núcleo, formando complexos de difícil degradação, produzindo um processo de degeneração e morte (Paulson 1999).

Portanto, muitas ataxias conhecidas apresentam uma causa comum, a toxicidade causada pelo segmento de poliglutamina nas proteínas mutantes. Está bem estabelecida uma correlação inversa entre o tamanho da expansão CAG encontrada no alelo mutado e a idade de início da doença, isto é, quanto maior a repetição CAG no alelo mutado mais cedo aparecem os primeiros sintomas e vice-versa. Além disso, a expansão CAG é instável tanto na meiose como na mitose, propiciando que filhos de afetados apresentem uma tendência a

manifestar a doença mais precocemente, principalmente se o genitor afetado for do sexo masculino (DeStefano *et al*, 1996).

Muitas questões permanecem a respeito das SCAs, mas a biologia molecular proporcionou uma classificação mais racional das ataxias herdadas de forma dominante. As alterações moleculares são, atualmente, o principal parâmetro para a classificação das ataxias.

No presente trabalho, foram estudadas mais detalhadamente cinco tipos de ataxias: a SCA1, a SCA2, a MJD/SCA3, a SCA6 e a SCA7. Os aspectos específicos destas SCAs serão abordados a seguir.

1.2 Ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1)

A ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1) é uma doença neurodegenerativa progressiva herdada de forma autossômica dominante e caracterizada por ataxia, disartria, oftalmoparese e um grau variável de amiotrofia e neuropatia, sendo que as manifestações clínicas normalmente aparecem a partir da terceira ou quarta década de vida. As neuropatologias incluem perda neuronal severa no cerebelo e bulbo, bem como degeneração das vias espinocerebelares (Zoghbi, 1995). A SCA1 se caracteriza por progressiva perda de coordenação, deterioração motora e degeneração das células de Purkinje do cerebelo, via espinocerebelar e bulbo (Cummings, 1999).

A SCA1 é causada pela expansão de trinucleotídeos CAG no *locus* 6p22-p23. O número de repetições varia de 6 a 39 em alelos normais e de 40 a 81 nos alelos mutados sendo que ambos os alelos, tanto os normais como os expandidos são transcritos (Zoghbi, 1995; Zuhlke *et al*, 2002). O gene normal pode apresentar interrupções de 1 a 3 CAT, já nos alelos expandidos estas interrupções não são encontradas (Zuhlke *et al*, 2002). O alelo com 39 CAGs pode levar ou não ao desenvolvimento de SCA1. Dois indivíduos com alelos de 39 repetições foram estudados e apresentaram resultados clínicos diferentes. Um deles, sem qualquer sintoma da doença, apresentou um alelo com 39 repetições interrompido por CAT, já o outro indivíduo, com sintomas de SCA1, possuía apenas CAGs na repetição trinucleotídica (Zuhlke *et al*, 2002).

A SCA1 foi descrita em famílias de diferentes origens geográficas e étnicas sendo mais comumente encontrada entre descendentes de italianos e de europeus orientais (Ranum *et al*, 1994; Silveira *et al*, 1996; Schöls *et al*, 1997). Além dessas populações, a SCA1 é a

forma predominante entre as SCAs em algumas regiões do Japão, principalmente na parte norte (Onodera *et al*, 2000; Sasaki *et al*, 2003).

A idade de início média é 33 anos em pacientes com SCA1. As manifestações clínicas podem surgir entre os 21 e 52 anos com uma correlação inversa entre o início da doença e o número de CAGs nos alelos mutados (Jardim, 2000). O fenômeno de antecipação entre as gerações ocorre independentemente do sexo do genitor afetado (Dubourg *et al*, 1995). Além disto, também foi estabelecida a instabilidade meiótica do *locus* SCA1 (Ranum *et al*, 1994). A repetição CAG expandida é instável durante sua transmissão e variação no comprimento da repetição CAG já foi encontrada em diferentes tecidos, incluindo amostras de esperma de homens afetados (Koefoed *et al*, 1998). Uma pronunciada variação no tamanho do alelo expandido foi encontrada em células de esperma e em leucócitos e uma baixa instabilidade foi observada em alelos normais; os alelos normais de indivíduos afetados mostraram-se significativamente mais instáveis dos que os alelos normais de indivíduos normais, indicando uma interação interalélica entre alelos normais e expandidos (Koefoed *et al*, 1998).

O produto do gene da SCA1 é conhecido como ataxina-1. Quando mutado, esse gene produz uma proteína que apresenta uma expansão de poliglutamina que leva à neurodegeneração através de interações anormais com outras moléculas nos neurônios envolvidos (Zoghbi, 1995). Um estudo recente demonstrou que a expansão de poliglutamina leva à formação de agregados de proteínas ataxina-1 (Kim *et al*, 2003).

Atualmente, vários trabalhos estão sendo realizados visando a melhor compreensão do mecanismo patogênico envolvido na SCA1. Até o momento, observou-se a associação da ataxina-1 com outras proteínas tais como superóxido dismutase, envolvida na patogênese de outras doenças neurodegenerativas, a proteína 14-3-3, USP-7 e A1Up (Davidson *et al*, 2000; Hong *et al*, 2002; Kim *et al*, 2003; Chen *et al*, 2003).

Em todos os trabalhos, o núcleo vem sendo identificado como o sítio subcelular onde a proteína mutante atua para causar a doença e as evidências indicam que a expansão de poliglutamina altera as propriedades estruturais da ataxina-1 (Orr e Zoghbi, 2001). Na SCA1, e em outras doenças causadas por expansões de poliglutaminas, a proteína expandida se agrega como inclusões nucleares (NIs) (Cummings *et al*, 2001). Esta característica ultra-estrutural inclui as proteínas expandidas e uma variedade de outras mais (Klockgether *et al*, 2000).

Há ainda evidências de que a ataxina-1 apresente uma atividade de ligação a RNA, inversamente afetada pelo tamanho do trato de poliglutamina, sugerindo que a proteína ataxina-1 tenha alguma função no metabolismo do RNA, e que a expansão do trato de poliglutamina possa alterar esta função (Yue *et al*, 2001).

1.3 Ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2)

A ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2), ou "ataxia de Holguín", foi descrita pela primeira vez em famílias provenientes da província de Holguín, em Cuba (Orozco Diaz *et al*, 1990). Esta doença caracteriza-se principalmente por lentidão dos movimentos sacádicos e hiporeflexia (Fernandez *et al*, 2000). Ataxia de marcha progressiva, déficit cognitivo, oftalmoplegia, disfagia, disartria, dismetria e tremores também são observados em pacientes com SCA2 (Moretti *et al*, 2004). Os achados clínicos tendem a ser mais homogêneos entre os membros da mesma família. Em determinadas famílias, o início é mais precoce, em torno dos 17 anos, por exemplo, sendo mais grave a evolução da doença. Em outras, o início pode ser bem mais tardio, 50 anos, por exemplo, com manifestações clínicas típicas de MJD (Geschwind *et al*, 1997).

A SCA2 é uma doença neurodegenerativa causada pela expansão de trinucleotídeos CAG no *locus* mapeado no cromossomo 12q23-24.1 (Gispert *et al*, 1993). Após a clonagem do gene, foi observada a presença de repetições CAGs na região codificante do mesmo, região expandida em alelos mutados (Imbert *et al*, 1996; Pulst *et al*, 1996).

Os alelos normais apresentam entre 14 e 31 repetições CAG, sendo que, na população geral, os alelos mais frequentes são aqueles com 22 e 23 repetições CAG, enquanto os alelos mutantes apresentam entre 35 e 59 repetições (Kakizuka, 1998). No entanto, 33 repetições do trinucleotídeo CAG podem ser suficientes para causar a doença (Fernandez *et al*, 2000). A faixa normal é frequentemente interrompida por um ou mais trinucleotídeos CAA, enquanto que os alelos expandidos não possuem estes trinucleotídeos (Choudhry *et al*, 2001). Por outro lado, pesquisadores encontraram dois pacientes com ataxia apresentando alelo interrompido com 34 repetições [(CAG)₂₄(CAA)(CAG)₉], cujo fenótipo era compatível com SCA2 (Costanzi-Porrini *et al*, 2000).

A SCA2 apresenta uma idade de início média de 30 anos (Jardim, 2000). Entretanto, já foram identificados casos de SCA2 no período neonatal, com alelos expandidos apresentando mais de 200 repetições CAG (Moretti *et al*, 2004). O início das manifestações

clínicas na idade juvenil e infantil está associado com expansões CAG na faixa de 130 a mais de 200 repetições (Mao *et al*, 2002).

O fenômeno da antecipação foi estabelecido em casos de SCA2. Uma correlação inversa entre idade de início e o tamanho das repetições CAG foi observada no gene da SCA2 (Geschwind *et al*, 1997). Além disso, uma forte instabilidade do segmento CAG expandido foi observada em quase todas as transmissões, onde o número de CAGs aumenta de modo importante (Imbert *et al*, 1996). Instabilidade mitótica também é observada na SCA2, onde o sistema nervoso central de pacientes afetados apresenta mosaicismo, ou seja, regiões com alelos expandidos de diferentes tamanhos (Matsuura *et al*, 1999).

O gene da SCA2 produz a proteína denominada ataxina-2. Quando mutado, este gene origina uma proteína que apresenta uma expansão de poliglutamina, causando neurodegeneração, sendo que nesta ataxia também foi observado o acúmulo de proteínas alteradas dentro do núcleo, induzindo a formação de inclusões intranucleares neuronais (NIIs) (Takahashi *et al*, 2003). Entretanto, inclusões intranucleares não são proeminentes na SCA2 (Huynh *et al*, 2003). Em modelos animais, com expressão de ataxina-2 mutada em células de Purkinje, disfunção neuronal e alterações morfológicas são observadas sem a formação de agregados intranucleares (Huynh *et al*, 2003). Neste estudo, os autores apontam para o fato de que a proteína ataxina-2 está, predominantemente, localizada no complexo de Golgi e que, quando mutada, altera a morfologia normal deste complexo mudando, inclusive, a sua localização no mesmo. Afirmam ainda, que as inclusões intranucleares seriam somente observadas em uma minoria de células. Nesses estudos foi sugerida uma ligação entre morte celular mediada pela ataxina-2 mutada e a estabilidade do complexo de golgi. A formação de agregados intranucleares não seria necessária para o desenvolvimento da patologia e a morte celular causada pela expressão da ataxina-2 mutante (Huynh *et al*, 2000; Huynh *et al*, 2003).

Apesar destas considerações, onde as inclusões não são consideradas uma característica de SCA2, outros achados demonstram o contrário. Em dois casos de SCA2, confirmados por análise molecular, foi realizado exame histológico com resultados que fortalecem a idéia de que inclusões intranucleares são parte integral da patologia desta doença (Pang *et al*, 2002).

Alguns estudos vêm demonstrando *splicing* alternativo no gene de SCA2, sendo que as diferentes proteínas produzidas por este gene devem apresentar diferentes funções (Affaitati *et al*, 2001).

Recentemente, uma nova família de proteínas, designada como proteínas relacionadas a ataxina-2 (A2RPs), foi identificada e localizada no cromossomo 16 (Figuerola e Pulst, 2003). Ataxina-2 e A2RP são proteínas altamente conservadas evolutivamente em humanos, camundongo e outras espécies.

A SCA2 é, provavelmente, a segunda mais freqüente ataxia dominante encontrada em populações mistas, correspondendo entre 13 e 24% dos diagnósticos moleculares (Geschwind *et al*, 1997; Schöls *et al*, 1997).

A SCA2 é encontrada em 31% das famílias italianas com algum tipo de ataxia espinocerebelar dominante, resultando na forma mais freqüente de ataxia encontrada na Itália (Cellini *et al*, 2001). Além da Itália, SCA2 é a ataxia espinocerebelar dominante mais comum no leste da Índia, com fortes evidências para um efeito fundador (Sinha *et al*, 2004).

1.4 Ataxia espinocerebelar tipo 3 ou Doença de Machado-Joseph

A MJD é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma pronunciada heterogeneidade clínica. As características clínicas mais comuns incluem ataxia cerebelar, oftalmoplegia e nistagmo, podendo-se encontrar ainda um quadro de demência, dor nas articulações e músculos (Lokkegaard *et al*, 1998).

Significante correlação inversa entre idade de início das manifestações clínicas e o tamanho da repetição expandida de CAG foi observada também em MJD, ou seja, a antecipação ocorre ao longo das gerações estudadas, com instabilidade da expansão CAG mais pronunciada na transmissão paterna (Lokkegaard *et al*, 1998).

O gene da MJD foi localizado no cromossomo 14q32.1, sendo identificado primeiramente em famílias japonesas (Takiyama *et al*, 1993). O mapeamento foi confirmado em estudos com pacientes portugueses, norte-americanos e brasileiros (Sequeiros *et al*, 1994; Twist *et al*, 1995). Outros dois estudos descreveram um tipo de ataxia denominada SCA3, também localizada no cromossomo 14, em famílias francesas, alemãs e americanas, as quais são portadoras de MJD, sendo essa a sua denominação mais apropriada (Stevanin *et al*, 1994; Schöls *et al*, 1995; Junck e Fink, 1996).

O gene da MJD foi clonado e a mutação patogênica identificada em 1994 (Kawaguchi *et al*, 1994). O gene para a MJD, denominado de *MJD1*, apresenta uma região com repetições do trinucleotídeo CAG. Esse gene engloba 48.240 pb, o qual é dividido em 11 exons (Ichikawa *et al*, 2001; Schmitt *et al*, 2003). O mRNA desse gene é expresso em muitos

tecidos humanos, apresentando pelo menos quatro tamanhos diferentes; 1,4, 1,8, 4,5 e 7,5 kb (Ichikawa *et al*, 2001). Estas diferentes espécies de mRNA provavelmente resultam de splicing alternativo e poliadenilação diferencial.

Os indivíduos normais apresentam de 12 a 37 repetições CAG, enquanto os indivíduos afetados apresentam alelos com 61 a 84 repetições. Alelos intermediários foram observados em quatro membros de uma família alemã afetada, os quais apresentaram repetições intermediárias com 53 e 54 CAGs, ou seja, alelos com repetições de um tamanho intermediário podem ser patogênicos (Van Alfen *et al*, 2001).

A ataxina-3, proteína produzida pelo gene *MJD1*, possui uma sequência de poliglutamina cuja expansão produz inclusão intranuclear neuronal e neurodegeneração. A ataxina-3 mutada causa agregação protéica e morte celular *in vitro* e *in vivo*. A agregação e a citotoxicidade induzidas por ataxina-3 mutada foram reduzidas em células expostas a chaperonas químicas em estudos *in vitro*, agentes estes que estabilizam as proteínas em suas conformações naturais. Estes resultados indicam uma estratégia terapêutica potencialmente útil através da utilização das chaperonas para prevenção de morte celular em MJD (Yoshida *et al*, 2002). Entretanto, existe uma correlação parcial entre a perda neuronal e a presença de inclusões intranucleares neuronais, sugerindo que outros fatores devem estar envolvidos na morte celular (Munoz *et al*, 2002).

A ataxina-3 pertence a um novo grupo de cisteína-proteases sendo potencialmente ativa contra cadeias ubiquitinadas ou substratos relacionados, onde alguns achados indicam que a mesma media a degradação de proteínas ubiquitinadas (Scheel *et al*, 2003; Doss-Pepe *et al*, 2003).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de SCA3, assim como nas outras ataxias espinocerebelares, é desconhecido; contudo, foi sugerido que várias das proteínas produzidas pelos genes das SCAs inibam a transcrição gerando uma repressão transcricional e a patologia em si. Para SCA3, foi proposto um novo mecanismo de regulação transcricional pela ataxina-3, envolvendo histonas, coativadores e um modo de repressão direta da transcrição, sugerindo que sua função fisiológica e, possivelmente seus efeitos patológicos, estejam ligados a suas interações com estas proteínas (Li *et al*, 2002). Foram identificados, pela primeira vez, genes alvo transcionalmente regulados por ataxina-3 normal, sugerindo a hipótese de que a perda da proteína normal e o ganho de função através das propriedades de interação proteína-proteína da ataxina-3 mutante contribuem para a patogênese de SCA3 (Evert *et al*, 2003).

Wen e colaboradores (2003) estudaram a expressão da proteína HSP27, conhecida como supressora de morte celular mediada por poliQ, em células com alelo MJD mutante. Os resultados demonstraram que as células, neuronais ou não, com ataxina-3 expandida, revelaram uma expressão protéica reduzida de HSP-27, sugerindo que a redução desta proteína tem um importante papel no processo de morte celular em MJD (Wen *et al*, 2003).

A MJD é, sem dúvida, a ataxia espinocerebelar mais freqüente na população do Brasil, com uma freqüência de 61% em uma amostra de indivíduos com sintomas de ataxia (Jardim *et al*, 2001). Este resultado se deve à nossa origem étnica preponderante portuguesa, onde a freqüência da MJD é muito maior do que a das outras SCAs. A migração açoriana ao sul do Brasil ocorreu em torno do ano de 1750 (Jardim *et al*, 2001).

1.5 Ataxia espinocerebelar tipo 6 (SCA6)

A SCA6 é caracterizada clinicamente por uma ataxia lenta e progressiva e disartria (Soong *et al*, 2001). Aproximadamente metade dos casos de ataxias cerebelares, na população do Japão, são diagnosticados como SCA6 (Yamashita *et al*, 2000).

A SCA6 é uma doença causada pela expansão de trinucleotídeos CAG no *locus* 19p13, tendo como característica a morte seletiva e progressiva das células de Purkinje, que conduz a uma ataxia progressiva (Restituito *et al*, 2000).

A mutação na SCA6 consiste de uma expansão de trinucleotídeos CAG na região 3' do gene CACNA1A, o qual codifica a subunidade alfa 1A do canal de cálcio neuronal presente em todo o encéfalo, mas expresso especialmente no cerebelo (Yue *et al*, 1997; Restituito *et al*, 2000). Essa mutação implica em uma expansão do número de resíduos de glutamina, provocando uma alteração no funcionamento do canal de cálcio das células de Purkinje levando à degeneração das mesmas, através da entrada excessiva de íons cálcio nessas células (Restituito *et al*, 2000).

Nos alelos normais, o número de repetições CAG varia de 4 a 15 vezes, enquanto que nos alelos expandidos esse número aumenta de 21 até 27 repetições. Entretanto, dados mais recentes indicam que 20 repetições de CAG podem causar a doença (Komeichi *et al*, 2001). Além disso, um paciente de uma família italiana com SCA6, na qual foi observado dois alelos expandidos, apresentava 19 repetições CAG. Por outro lado, outros três membros desta família, apresentando apenas um alelo intermediário, não apresentaram sinais clínicos,

demonstrando um efeito patogênico dose-dependente do alelo intermediário em SCA6 (Mariotti *et al*, 2001).

A ataxia tipo 6 apresenta o fenômeno de antecipação como pode ser verificado em um estudo com oito famílias identificadas com SCA6, nas quais a doença começava em torno dos 50 anos (em pacientes cuja expansão CAG apresentava 22 ou 23 repetições) mas iniciava bem mais cedo, dos 28 aos 31 anos (nas famílias com expansão de 27 repetições CAG) (Zuchenko *et al*, 1997). As expansões CAG, ao contrário de outras SCAs, pareciam estáveis através das gerações neste estudo. Estabilidade intergerações do número de repetições CAG tem sido considerada uma característica específica de SCA6, comparando-se com outras SCAs. Entretanto, instabilidade meiótica no gene de SCA6 foi observada em duas famílias japonesas, tanto na transmissão paterna como materna (Shimazaki *et al*, 2001).

O tamanho bem menor da expansão CAG pode sugerir um mecanismo patogênico distinto das outras ataxias, visto que as expansões ficam dentro da faixa normal de variação de outras SCAs (Kakizuka, 1998). A diferente localização das mutações encontradas até o momento no gene CACNA1A pode ser uma explicação. A expansão de glutaminas na terminação carboxila da proteína levaria a uma disfunção contínua do canal de cálcio, causando uma doença progressiva, enquanto outras mutações provocariam alterações transitórias da função do canal (Zuchenko *et al*, 1997; Yue *et al*, 1997).

O gene de SCA6 pode sofrer outros dois tipos de mutações levando a duas patologias diferentes. Trata-se da ataxia cerebelar paroxística hereditária (HPCA) e da enxaqueca hemiplégica familiar (FHM), sendo que os pacientes acometidos por tais patologias também apresentam ataxia, embora seja periódica e transitória (Ophoff *et al*, 1996). A subunidade alfa 1A do canal de cálcio apresenta quatro domínios homólogos que se encontram face a face dentro do canal propriamente dito. As mutações de ponto associadas às duas doenças, HPCA e FHM, foram identificadas nesses domínios ou alças internas ao canal, já a repetição CAG, que quando expandida leva à SCA6, localiza-se na região 3' do gene CACNA1A. Atualmente, entretanto, postula-se que uma única mutação no gene CACNA1A cause vários fenótipos, incluindo aqueles de SCA6 e FHM, sugerindo-se que tais doenças sejam o mesmo distúrbio com uma grande variabilidade fenotípica (Alonso *et al*, 2003). Enquanto SCA6 está associada com uma pequena expansão CAG no gene CACNA1A, mutações de ponto são responsáveis por outras duas patologias alélicas, a ataxia episódica tipo 2 e FHM, sendo que SCA6 parece compartilhar as características com ambos os tipos de doenças (Mantuano *et al*, 2003).

Um estudo mostrou que pequenos agregados de proteína do canal de cálcio alfa 1A podem ser encontrados no citoplasma e no núcleo das células de Purkinje de pacientes com a SCA6 (Ishikawa *et al*, 2001). Embora o tamanho das expansões seja pequeno em SCA6, os achados indicam que a SCA6 compartilha os mesmos mecanismos patogênicos de outras doenças causadas por uma expansão poliglutâmica (Ishikawa *et al*, 2001). Entretanto, a análise funcional do canal de cálcio em células que expressam a proteína alfa 1 mutada, mostrou uma atividade alterada do mesmo, sugerindo que esta doença possa ser uma patologia causada por disfunção do canal de cálcio, e não pelos mecanismos envolvidos nas outras desordens por poliglutaminas (Frontali, 2001).

Foi descoberto que a proteína alfa 1A, produzida em células humanas embrionárias de rim, produz um fragmento C-terminal de 75 KDa, mais tóxico para as células do que a proteína inteira, independentemente do tamanho da seqüência de poliglutamina. Este fragmento, com uma seqüência de poliglutamina expandida, seria mais resistente à proteólise do que com uma seqüência de poliglutamina normal, levando a especulação de que o fragmento expandido de poliglutamina, teria um papel chave no mecanismo patológico de SCA6 (Kubodera *et al*, 2003).

1.6 Ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7)

A ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7) já foi conhecida como atrofia olivo-ponto-cerebelar tipo III (Konigsmark and Weiner, 1970). Esta doença caracteriza-se fundamentalmente pela associação de uma ataxia cerebelar e uma distrofia macular, ambas progressivas (Stevanin *et al*, 1998; Lebre e Brice, 2003). A doença afeta primeiramente o cerebelo e a retina, mas também acomete muitas outras estruturas do sistema nervoso central com o progresso da doença (Lebre e Brice, 2003).

A SCA7 foi diagnosticada em populações de origens geográficas diferentes como países europeus, africanos, além dos Estados Unidos, Brasil, Israel e Coréia do Sul (Stevanin *et al*, 1998). Esta característica corrobora a hipótese de que a SCA7 apresenta um grande potencial de aparecimento *de novo*. Entretanto, a freqüência de expansões no gene da SCA7 na África do Sul representa uma das mais altas freqüências para estas expansões estudadas em qualquer país (Bryer *et al*, 2003).

O gene da SCA7 está localizado no *locus* 3p12-p12.1 apresentando uma repetição CAG expandida em indivíduos afetados (Gouw *et al*, 1995; Benomar *et al*, 1995; David *et al*,

1997). A expansão é traduzida em uma seqüência de poliglutamina na proteína ataxina-7, produto do gene da SCA7. Esse produto gênico é provavelmente uma acetiltransferase (Scheel *et al*, 2003). A expressão deste gene foi detectada em várias regiões do cérebro humano e em alguns outros tecidos, com evidência para um acúmulo protéico nos neurônios (Lindenberg *et al*, 2000).

A idade de início média para SCA7 é de aproximadamente 30 anos, embora o início das manifestações clínicas varie dos 3 meses de vida aos 65 anos (Jardim, 2000). O sintoma inicial é a ataxia cerebelar no caso da doença surgir após os 30 anos. Em casos onde a doença é mais precoce, a amaurose normalmente é o primeiro sintoma. Outros achados para SCA7 são a disartria, a oftalmoparesia, a hiperreflexia, o sinal de Babinski, a espasticidade e a redução da sensibilidade vibratória. Outros sintomas como movimentos distônicos, miocimias faciais e demência, são infreqüentes. Já a hipoacusia, ausente em outras SCAs, apresenta-se em 25% dos casos (David *et al*, 1998; Stevanin *et al*, 1998). O fenômeno da antecipação é bastante importante nesta ataxia apresentando, em média, 22 anos quando a transmissão é paterna e 17 anos quando a transmissão é materna (Jardim, 2000). A instabilidade da seqüência repetida, aproximadamente 12 CAG por transmissão, leva a uma antecipação de aproximadamente 20 anos por geração (Lebre e Brice, 2003).

Os alelos expandidos apresentam de 36 a 306 repetições CAG, enquanto os alelos normais variam de 4 a 35 repetições (Lebre e Brice, 2003). O alelo expandido é bastante instável na meiose, existindo forte correlação negativa entre o tamanho da repetição CAG e a idade de início da doença. Há também uma correlação entre o tamanho da expansão e a taxa de progressão da doença, quanto maior a expansão, maior a progressão (Lebre e Brice, 2003).

Alelos intermediários, entre a faixa normal e a patogênica, são raros nas populações estudadas e nunca foram associados ao fenótipo de SCA7. Por exemplo, num caso específico, um alelo intermediário com 35 repetições originou um alelo expandido com 57 repetições (Stevanin *et al*, 1998). A presença de um alelo intermediário foi reconhecida em uma determinada família de cinco a oito gerações antes do surgimento da doença nas gerações mais recentes (Johansson *et al*, 1998). O aparecimento de mutações *de novo* a partir de alelos intermediários explicaria o motivo da doença não desaparecer, visto que o fenômeno da antecipação é muito grave nesta ataxia (Stevanin *et al*, 1998; Giunti *et al*, 1999). A seqüência repetida CAG é particularmente instável na SCA7, e mutações *de novo* podem ocorrer na transmissão paterna de alelos intermediários (28-35 repetições CAG), o que explica a

persistência de SCA7, apesar da antecipação que poderia levar à extinção da doença (Lebre e Brice, 2003).

Na SCA7 também se observou o acúmulo de proteínas alteradas no núcleo celular, induzindo a formação de inclusões intranucleares neuronais (NIIs) (Takahashi *et al*, 2003). Recentes evidências indicam que uma desregulação transcricional pode contribuir para a patogênese de SCA7, assim como em outras SCAs (Helmlinger *et al*, 2004).

Visando à determinação da base molecular da neurotoxicidade na SCA7, pesquisadores produziram camundongos transgênicos expressando ataxina-7 com 24 ou 92 glutaminas no sistema nervoso central, exceto nas células de Purkinje. O animal com 92 glutaminas desenvolveu um quadro de ataxia culminando em uma morte prematura.

Degeneração das células de Purkinje foi detectada assim como a presença de um fragmento N-terminal da proteína ataxina-7, tanto nos camundongos como em pacientes com SCA7. O aparecimento do fragmento da ataxina-7 em agregados nucleares correlaciona-se com o início do fenótipo de SCA7 no camundongo estudado, sugerindo que a localização nuclear e a clivagem proteolítica podem ser importantes características da patogênese de SCA7 (Garden *et al*, 2002). A degeneração das células de Purkinje no camundongo transgênico indica que a disfunção induzida por poliglutamina em células adjacentes, ou de algum modo conectadas, contribui para a neurodegeneração (Garden *et al*, 2002).

1.7 As Poliglutaminas

As repetições patológicas da seqüência CAG localizam-se dentro de exons dos genes envolvidos com a maioria das ataxias, sendo traduzidas em segmentos de poliglutaminas nas proteínas mutadas. O agente patogênico comum a essas doenças parece ser a mudança estrutural das proteínas.

As doenças provocadas por expansões poliglutamínicas compartilham características importantes que podem ajudar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento das mesmas.

1.7.1 Fisiopatologia das expansões CAGs

As ataxias espinocerebelares causadas por expansões CAGs e subsequente produção de proteínas com segmentos de poliglutaminas apresentam herança autossômica dominante,

sendo que os achados patológicos compreendem degeneração e perda de células neuronais, ainda que cada doença possa ter suas regiões mais suscetíveis.

Outra característica importante e comum as ataxias espinocerebelares é o fato do início da doença ocorrer preponderantemente na vida adulta, uma vez que os efeitos das poliglutaminas sobre as células neuronais são tardios. Em todas as doenças descritas, quanto maior for a expansão CAG, mais grave se torna o quadro clínico. Isto indica que os neurônios não suportam os efeitos causados por proteínas apresentando grandes segmentos de poliglutaminas, onde o efeito tóxico ocorre de forma mais intensa.

Já está bem estabelecido que as seqüências CAG expandidas apresentam instabilidade nas divisões celulares, principalmente na meiose, nas quais comumente aumentam seu tamanho. Este processo deve ocorrer durante a recombinação, sendo o responsável pelo fenômeno da antecipação.

Em 1996, foi observado que as poliglutaminas da MJD precipitavam-se através de auto-agregação em células COS cultivadas induzindo a morte celular, sendo que a precipitação só ocorria pelas poliglutaminas oriundas de uma porção da proteína MJD1, mas não da proteína completa (Ikeda *et al*, 1996). Outros trabalhos encontraram os mesmos resultados, inclusões ou agregados intracelulares de poliglutaminas em neurônios de pacientes com SCA1, MJD e DRPLA (Hackam *et al*, 1998). Todos os agregados continham fragmentos de proteínas com um segmento de poliglutaminas expandida. O acúmulo de proteínas alteradas no núcleo induz a formação das inclusões intranucleares neuronais (NIIs), sendo que o núcleo está compartimentalizado em domínios funcionais e estruturais, os quais estão envolvidos na formação das mesmas (Takahashi *et al*, 2003).

As seqüências de aminoácidos adjacentes ao segmento de poliglutamina podem aumentar ou reduzir seu potencial de formação de agregados, ou seja, qualquer modificação das seqüências flaqueadoras pode influenciar seu potencial de agregação de forma significativa, especificando os constituintes das inclusões nucleares (NI) e contribuindo para a seletiva neurotoxicidade nas doenças causadas por poliglutaminas (Nozaki *et al*, 2001; Chai *et al*, 2001).

Estudos *in vivo* demonstram a formação de agregados intranucleares ou citosólicos nos neurônios, restringindo-se, de uma forma geral, às regiões encefálicas afetadas pela doença. Os agregados encontram-se ubiquitinizados, demonstrando o início do processo de proteólise (Davies *et al*, 1997; DiFiglia *et al*, 1997; Skinner *et al*, 1997; Paulson *et al*, 1997).

Em um modelo murino, inseriu-se uma longa seqüência CAG no gene da proteína hipoxantina fosforribosiltransferase (HPRT) e foi observado o início de um quadro patológico (Ordway et al, 1997). O segmento de poliglutamina na nova proteína produzida, expressa no cérebro do rato, provocou um processo neurodegenerativo, com inclusões intranucleares neuronais muito semelhantes às encontradas nas doenças humanas (Hackam *et al*, 1998).

Tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, a presença dos agregados de poliglutaminas, independentemente dos genes envolvidos, está associada a um estado patológico, sendo que as seqüências poliglutamínicas são intraneurais e encontradas predominantemente nas regiões associadas à doença. Cabe salientar também, a necessidade prévia de um evento proteolítico para desencadear a formação dos agregados.

1.7.2 Formação dos agregados de poliglutaminas

Uma das hipóteses levantadas para a formação dos agregados seria a de que as poliglutaminas possam agir como zíperes polares, devido à formação de ligações de hidrogênio entre a cadeia principal e as cadeias de amidas laterais (Perutz, 1995). A interação entre as próprias poliglutaminas seria a força central de sua agregação.

Outra hipótese sugere que domínios protéicos externos à poliglutamina seriam responsáveis por sua agregação (Burrigh *et al*, 1997). Porém, as proteínas que apresentam poliglutaminas não têm qualquer outra homologia estrutural, e esta hipótese só se sustentaria se elas tivessem homologia funcional, o que também é improvável.

Uma terceira hipótese para a formação de agregados sugere a necessidade de ligações covalentes, catalisadas por transglutaminases, entre glutaminas e lisinas. Tais enzimas também participam da seqüência de eventos da apoptose. Entretanto, tais ligações nunca foram demonstradas nos agregados intraneurais (Hackam *et al*, 1998).

A expressão de proteínas com uma expansão da seqüência poliglutamínica é generalizada no sistema nervoso central, mas os agregados são produzidos somente nas regiões afetadas pela doença específica (Hackam *et al*, 1998). Parece claro, portanto, a correlação entre o agregado e o processo patogênico.

Entretanto, os agregados poderiam ser a causa da lesão ou da morte celular, ou, quem sabe, apresentarem um papel protetor como uma resposta defensiva da célula frente a um processo tóxico.

De qualquer modo, uma característica importantíssima das doenças neurodegenerativas causadas por segmentos de poliglutamina é a formação de agregados de proteínas ubiquitinados em neurônios de pacientes afetados. O seqüestro mediado por ubiquitina de proteínas nos agregados deve ser um mecanismo comum para a patogênese das doenças neurodegenerativas (Donaldson *et al*, 2003).

Como os agregados intraneurais são constituídos de fragmentos das proteínas originais contendo segmento de poliglutamina, supõe-se que um dos eventos iniciais que originam os agregados seja a proteólise. Evidências mostram que algumas proteínas de genes com repetição CAG, por exemplo MJD1, são substratos naturais das caspases, um grupo de cisteíno-proteases que é ativado quando a célula inicia a apoptose (Hackam *et al*, 1998). As caspases criam fragmentos protéicos contendo poliglutamina.

Outro indicador de proteólise é a ligação dos agregados à ubiquitina (Davies *et al*, 1997; DiFiglia *et al*, 1997; Skinner *et al*, 1997; Paulson *et al*, 1997; Ordway *et al*, 1997). A ubiquitina marca as proteínas para sua destruição, por estas apresentarem má conformação ou por necessidade de remoção no ciclo celular. As poliglutaminas poderiam ser marcadas por ubiquitinas por um destes motivos, por serem aberrantes ou por tratar-se de um processo celular usual.

Os eventos proteolíticos apresentam especificidade tecidual em cada grupo de doenças. No caso das SCAs, a especificidade tecidual poderia explicar o fenótipo clínico comum que compartilham. Não seriam atingidos tantos neurônios, porém, quase sempre os mesmos, não importando tanto o gene com alelo expandido. Ainda não está claro se os agregados são patogênicos ou meramente marcadores das doenças, no entanto, a clivagem promove a agregação (Tarlac e Storey, 2003).

1.7.3 Agregados de poliglutaminas e a morte celular

O acúmulo de fragmentos protéicos apresentando um segmento de poliglutamina expandido seria tóxico para a célula neuronal. A toxicidade poderia ser anterior ou subsequente à formação dos agregados. O processo patológico seria desencadeado pela proteólise da proteína original em um dado momento. As regiões atingidas sempre acumulariam fragmentos da proteína contendo segmento de poliglutamina expandida, ou seja, resistentes à degradação (Hackam *et al*, 1998). Tal modelo pressupõe que o processo de quebra das proteínas seja diferente em cada região do sistema nervoso central, explicando o

acúmulo dos agregados em regiões tão específicas (Kakizuka, 1998). Um motivo para esta especificidade seria a expressão diferencial das proteases responsáveis pela degradação das poliglutaminas nas diversas regiões nervosas. Ou ainda, os efeitos tóxicos iniciais, anteriores à degradação, deveriam envolver apenas determinadas populações de neurônios (Hackam *et al*, 1998). Esse modelo poderia explicar a existência de um período pré-sintomático tão longo em todas as SCAs, e a variação do início dos sintomas e da dos mesmos (Kakizuka, 1998).

É importante ressaltar que muito deve ser esclarecido a respeito dos processos envolvidos nestas patologias para que se alcance modelos terapêuticos correspondentes. Deve ser bem estabelecido e compreendido se os agregados intraneuronais são a causa, uma resposta protetora ou apenas um marcador de disfunção neuronal iminente. Fármacos que inibem a agregação das poliglutaminas apresentariam efeitos totalmente diferentes em cada caso. Portanto, o tratamento destas doenças necessita de uma maior compreensão da fisiopatologia envolvida.

1.7.4 Tratamento dos sintomas e prevenção

Não há ainda tratamento efetivo disponível para a maioria das síndromes atáxicas, exceto para a ataxia com deficiência em vitamina E, uma ataxia cerebelar recessiva, e as ataxias episódicas (Evidente *et al*, 2000). Pouco progresso se obteve com tratamentos sintomáticos farmacológicos voltados para as manifestações motoras. Ensaio clínico, usando um único fármaco, produziram resultados controversos ou negativos. Alguns autores aconselham experimentos utilizando-se de uma mistura farmacológica combinando substâncias que tentariam corrigir as deficiências neuroquímicas encontradas nas SCAs e que modificariam os sistemas neurotransmissores cerebelares (Botez *et al*, 1998). De qualquer maneira, o futuro do tratamento sintomático das SCAs ainda deve ser visto com muito cuidado (Shoulson, 1998). O tratamento curativo ainda está distante. No entanto, com a elucidação da gênese dos sintomas das SCAs, será possível o desenvolvimento de agentes farmacológicos que influenciem a agregação das poliglutaminas.

Várias estratégias terapêuticas aplicam-se igualmente a todas as SCAs, sendo que terapias mais específicas para as ataxias em particular é um grande objetivo para o futuro (Margolis, 2002). Clivagem de agregados protéicos, ao menos no caso da ataxina-3, e a inibição de proteases específicas, constituem uma potencial terapia para estas doenças (Tarlac e Storey, 2003).

Algumas ataxias esporádicas respondem ao tratamento com acetazolamida, onde os ataques são diminuídos pela utilização da mesma (Steckley *et al*, 2001; Koh *et al*, 2001).

A manutenção de uma boa qualidade de vida e bem-estar dos doentes, dentro do possível, é o objetivo do atendimento clínico, proporcionando-se um tratamento enfocando o suporte físico e emocional, incluindo atendimentos fisioterápicos, psicológicos e fonoaudiológicos.

O aconselhamento genético tornou-se uma questão muito importante no manejo das SCAs, pois trata-se da única alternativa para preveni-las. Esta, por sua vez, fornece a informação genética auxiliando os indivíduos a tomar as decisões que melhor lhes sirvam. Com esta finalidade, é muito importante o diagnóstico preciso e bem estabelecido para os pacientes além de uma avaliação correta dos riscos de recorrência, e ainda, um processo bastante claro de comunicação entre as partes envolvidas. Portanto, a informação genética fornecida aos pacientes e seus familiares só será correta e adequada através de um diagnóstico preciso. O diagnóstico definitivo, normalmente, é obtido através de estudos moleculares, onde o aconselhamento genético é necessário para os testes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Evidente *et al*, 2000).

Os testes moleculares tornaram possível o diagnóstico pré-sintomático das pessoas em risco, sendo chamados de testes preditivos, dando uma opção aos portadores do gene para evitar a recorrência da doença. Recentemente, foi realizado um diagnóstico pré-natal de MJD em Taiwan, em uma mulher cujo marido portava um alelo expandido no gene MJD1. Após avaliação psicológica, amniocentese foi realizada no feto de 13 semanas, sendo detectada a presença de um alelo MJD expandido. (Tsai *et al*, 2003).

1.8 Fenômeno da antecipação e os fatores modificadores

A instabilidade durante as divisões mitóticas e meióticas é uma característica extremamente importante das mutações devidas à expansão de seqüências repetitivas. A instabilidade meiótica foi observada em inúmeras transmissões, genitores aos filhos, o que explica, parcialmente, a antecipação e a expressividade variável (Harper *et al*, 1997). Há uma correlação negativa entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início da doença. Em um estudo com indivíduos SCA2 positivos, observou-se mosaicismos no sistema nervoso central, onde a instabilidade mitótica levou a regiões nervosas com alelos expandidos de diferentes tamanhos (Matsuura *et al*, 1999).

Está bem estabelecido, também, o fato de que quando o cromossomo com o alelo mutado atravessa uma meiose paterna, tende a ser um pouco mais instável. Em um determinado estudo, o tamanho da repetição CAG, em cromossomos específicos, foi acompanhado durante a sua transmissão de pai para filho, e se viu que o segmento CAG teve seu tamanho alterado em 55% de 58 transmissões observadas (Maciel *et al*, 1995).

De um modo geral, as ataxias espinocerebelares dominantes apresentam o fenômeno da antecipação. Porém, a correlação entre o tamanho da expansão e as características clínicas, idade de início e manifestações neurológicas, não é completa, perfeita. Outros fatores genéticos e ambientais devem influenciar o histórico da doença, seu início e desenvolvimento, e são conhecidos como fatores modificadores. A própria expansão repetitiva CAG apresenta característica variável, o tamanho, podendo modificar o grau de expressão do fenótipo. O mosaicismismo somático, pela instabilidade mitótica, também poderia ser um fator modificador, não necessariamente em todos os tipos de ataxias conhecidas. No caso da MJD, as evidências sobre o papel do mosaicismismo somático na determinação do fenótipo não são promissoras (Maciel *et al*, 1997). Outro fator modificador poderia ser o sexo do genitor afetado, já que a instabilidade meiótica é mais pronunciada em homens afetados, e seus filhos receberiam alelos com o tamanho da repetição expandida aumentada, até por que, o mais comum é a expansão e não a retração, levando a um fenótipo mais grave.

1.9 Justificativa

A introdução de protocolos moleculares não radioativos visando a detecção e a quantificação dos alelos normais e expandidos para SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7, e a análise de possíveis genes modificadores do fenótipo de MJD/SCA3, além de se estudar a frequência e as características moleculares, clínicas e epidemiológicas das SCAs tipos 1, 2, 3, 6, 7, 10, 17 e DRPLA em famílias do sul do Brasil se justificam pelas razões descritas abaixo:

1) Estudos prévios indicam a ocorrência das ataxias espinocerebelares em nossa população, apesar de não se conhecer bem a frequência e as características moleculares, clínicas e epidemiológicas das mesmas;

2) O diagnóstico clínico é pouco preciso para as ataxias espinocerebelares dominantes, o que gera um elevado número de resultados equivocados, pacientes sem diagnóstico e aconselhamento genético pouco informativo. A eficiência dos testes moleculares proporciona diagnósticos precisos para os pacientes doentes e é fundamental no processo de

aconselhamento. O diagnóstico precoce e preciso de uma determinada ataxia pode melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Portanto, a investigação molecular não radioativa de possíveis portadores de alelos expandidos é o exame capaz de definir o seu diagnóstico e contribuir para um melhor conhecimento dos aspectos relacionados a este tipo de doença, utilizando-se de uma técnica que não apresenta qualquer risco de exposição a produtos químicos radioativos;

3) A MJD/SCA3 é a ataxia espinocerebelar mais freqüente em nossa população. O seu elevado número de casos, em comparação às outras ataxias, justifica a busca por genes modificadores que possam influenciar o fenótipo destes doentes;

4) Finalmente, alguns casos de SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7 foram detectados em nossa população através de diagnóstico molecular realizado na Universidade do Porto, Portugal, através de método radioativo, e novos casos suspeitos surgem pelas observações clínicas, o que torna recomendável e necessário que um estudo como este seja conduzido em nossa população, bem como futuramente também estudos com relação às demais SCAs existentes.

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram os seguintes:

- Estabelecer protocolos não radioativos para detecção de mutações dinâmicas associadas à SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7 (expansão do trinucleotídeo CAG);
- Analisar, com esses protocolos, os pacientes com suspeita clínica de uma SCA.
- Determinar o tamanho da expansão trinucleotídica presente nos pacientes com resultado alterado na avaliação qualitativa, bem como o tamanho das repetições CAG nos alelos normais;
- Identificar outros portadores da mutação em questão entre os familiares do caso índice, visando o oferecimento do aconselhamento genético e acompanhamento clínico;
- Estudar um grupo de pacientes com MJD para os genes da SCA1, SCA2 e SCA6, analisando-os como possíveis genes modificadores.
- Estudar a frequência e as características moleculares, clínicas e epidemiológicas das SCAs tipos 1, 2, 3, 6, 7, 10, 17 e DRPLA em famílias do sul do Brasil.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

OS RESULTADOS E A DISCUSSÃO DESTE TRABALHO SERÃO APRESENTADOS NA FORMA DE QUATRO ARTIGOS CIENTÍFICOS.

3.1 ARTIGO 1

SPINOCEREBELLAR ATAXIAS IN 114 BRAZILIAN FAMILIES: CLINICAL AND MOLECULAR FINDINGS

Artigo publicado na *Clinical Genetics*, 70: 173-176, 2006.

3.2 ARTIGO 2

SPECTRUM OF SCA1, SCA2, AND SCA6 IN SOUTH BRAZIL: A NON-RADIOACTIVE METHODOLOGY FOR DETECTING AND QUANTIFICATION OF CAG REPEATS AND CLINICAL FINDINGS OF NEW BRAZILIAN PATIENTS.

Artigo submetido à publicação na revista *European Journal of Neurology*.

SPECTRUM OF SCA1, SCA2, AND SCA6 IN SOUTH BRAZIL: A NON-RADIOACTIVE METHODOLOGY FOR DETECTING AND QUANTIFICATION OF CAG REPEATS AND CLINICAL FINDINGS OF NEW BRAZILIAN PATIENTS.

Alexis Trott,^{a,b} Tiago Santos Carvalho,^{a,b} Laura Jardim,^{a,c} Roberto Giugliani,^{a,d} and Maria Luiza Saraiva-Pereira^{a,b}.

^aMedical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bDepartment of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cDepartment of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dDepartment of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address Correspondence to:
Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD
Medical Genetics Service
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil
Tel: + 55 51 21018011
Fax: + 55 51 21018010
E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of neurodegenerative diseases that share a similar molecular mechanism: expansion of CAG repeats. Main aims of this study were (1) to introduce a non-isotopic methodology to detect CAG repeats in SCA1, SCA2, and SCA6 genes, (2) to determine size of CAG repeats in normal and mutant alleles of affected patients, and (3) to verify clinical features of SCA1, SCA2, and SCA6 new Brazilian patients. We have studied 59 unrelated patients and five relatives which were referred to the Medical Genetics Service of Hospital de Clinicas de Porto Alegre – South part of Brazil, showing signs and/or symptoms of a type of SCA. Regions of interest were amplified by PCR using specific primers. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel, for detecting normal and mutant allele, and 12.5% (w/v) polyacrylamide gel, for allele size determination. We were able to establish a reliable methodology and detected 12 affected patients in our sample population (one SCA1 case; seven SCA2 patients; and four SCA6 patients). This work allowed the introduction of a novel methodology for detection and quantification of normal and mutant alleles in SCA1, SCA2, and SCA6 genes in our laboratory, which can be also employed to detect other dynamic mutations, the diagnosis of new SCA cases, and still to establish a clinical and neurological picture of the South Brazilian patients to the studied SCAs.

Keywords: Non-isotopic methodology; Spinocerebellar Ataxia; Trinucleotide Repeats; CAG repeats; Molecular analysis; SCA1 gene; SCA2 gene; SCA6 gene; SCA clinical features.

Introduction

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of debilitating and often fatal neurodegenerative diseases that affect the cerebellum and main connections characterized by a generalized incoordination of gait, speech, and limb movements. In general, onset of SCAs is in the adult life and shows great clinical heterogeneity [1]. Symptoms normally appear from third to fourth decade of live and progress slowly [1]. In successive generations, symptoms can initiate earlier with a more severe progression, phenomenon called anticipation [2]. Currently, mutations responsible for different types of SCAs are known in different regions of the genome, and most of them were already mapped and cloned. Several evidences lead to the fact that these diseases share the same molecular mechanism and similar physiopathological processes, as well as in other neurodegenerative diseases. Mutational basis of most of them is an expansion of the trinucleotide CAG, which codifies for a polyglutamine tract [3]. Exceptions are SCA8, which is caused by an expansion of CTG repeat, and SCA10 that is caused by an expansion of the pentanucleotide ATTCT [4, 5]. An expanded polyglutamine tract can become a toxic product when located within the coding region of the gene, but the effect of a CTG expansion (SCA8), which is located outside the coding region, remains unknown [3, 4].

The spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is caused by a CAG expansion in chromosome 6, *locus* 6p22-p23 [8]. Number of repeats varies from 6 to 39 in normal alleles, and from 40 to 81 in mutant alleles [6, 9]. This disease was already described in families from different geographic and ethnic origins, although most cases are found in Italians and Eastern Europeans [10, 11, 12].

Locus of spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2), or "Holguín ataxia", has been mapped to chromosome 12 (region q23-24.1), and a CAG expansion within the gene is the mutational basis of this disease [14, 16]. Normal alleles show between 14 and 31 CAG repeats, while mutant

alleles show between 35 and 59 repeats [17]. However, 33 CAG repeats can be sufficient to cause the disease [14]. Therefore, a precise determination of expansion size is essential in this case [18].

The spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is caused by a CAG expansion at *locus* 19p13 [19]. This mutation occurs in the 3' region of CACNA1A gene, which codifies for the alpha 1 subunit of the neuronal calcium channel [19]. In normal alleles, CAG repeat varies from 4 to 15, while in mutant alleles 21 to 27 repeats can be found, although 20 repeats can already cause the disease [20]. SCA6 is caused by an alteration in the function of the neuronal calcium channel in Purkinje cells, which lead to cells degeneration due to a high concentration of ion calcium [19]. The expanded CAG tract is smaller than those found in other SCAs; this can suggest a distinct pathogenic mechanism associated to SCA6 [17].

Before the assignment and identification of genes associated to SCAs, classification of these diseases was very poor, and diagnosis of patients was based only on clinical signs and/or symptoms. Nowadays, molecular diagnostic tests were already introduced in several places. Few reports have been described of studies performed with Brazilian patients with MJD/SCA3, the most common type of SCA found in Brazil up to date, SCA1, SCA2, SCA7, and SCA8 [21, 22, 23]. However, all these studies were supported by molecular analyses performed outside Brazil. Recently, our group established an efficient methodology for detecting cases of MJD/SCA3, the most frequent type of SCA found in Brazil [24]. Although great part of cases with a clinical suspicion of a SCA was defined by the molecular diagnosis of MJD/SCA3, it remained the need of molecular test for identification of other SCAs.

We present here a novel non-isotopic methodology for detecting CAG repeats in SCA1, SCA2, and SCA6 genes. The methodology aimed the identification of normal and/or expanded alleles. In addition, number of repeats in normal and expanded alleles of affected patients was also

determined through a similar technique. We verify still the clinical and neurological features of SCA1, SCA2, and SCA6 new South Brazilian patients.

Materials and Methods

Sample characterization

We have analyzed 59 unrelated individuals, and five relatives (64 patients in total) who were referred to the Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil. These patients were sent for a clinical evaluation due to show sign and/or symptoms of a type of SCA. All patients included in this work were previously tested for Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) in our lab, which showed negative results.

Methodology and molecular analysis

DNA extraction

Blood samples (5-10mL) from each individual were collected in EDTA. Genomic DNA was isolated using the salting out technique, as previously described [25]. When necessary, genomic DNA was further purified using isopropanol precipitation. Informed consent was obtained from each patient.

PCR

PCR assay for detecting repeats in SCA1 gene was performed using primers Rep-1 (5'-AACTGGAAATGTGGACGTAC-3') and Rep-2 (5'-CAACATGGGCAGTCTGAG-3') [8]. Genomic DNA (200ng) was added to 10 pmol of each primer in a total volume of 25 μ l containing 1U of Platinum Pfx DNA Polymerase, 1mM MgSO₄, 4% (v/v) DMSO, 200 μ M of dNTPs, 1X PCR Enhancer Solution, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA. The reaction mixture was incubated at 94°C for 5 min, then 5 cycles of 94°C for 1 min,

followed by 1 min at 58°C -0.5 °C/cycle and 90s at 68°C, then 35 cycles of 94°C for 1 min, followed by 1 min at 56°C and 90s at 68°C, and a final extension step of 68°C for 5 min.

PCR reaction for detecting CAG repeats in SCA2 gene was performed using primers SCA2-A (5'-GGGCCCCTCACCATGTTCG-3') and SCA2-B (5'-CGGGCTTGCGGACATTGG-3') [26]. PCR reagents were as described for SCA1. The reaction mixture was incubated at 95°C for 5 min, then 9 cycles of 96°C for 1 min, followed by 1 min at 63°C -0.5 °C/cycle and 40s at 68°C, then 21 cycles of 96°C for 1 min, followed by 1 min at 59°C and 40s at 68°C, and a final extension step of 68°C for 5 min.

PCR protocol for detecting CAG repeats in the SCA6 gene was performed using primers S-5-F1 (5'-CACGTGTCCTATTCCCCTGTGATCC-3') and S-5-R1 (5'-TGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG-3') [27]. PCR reagents were as described for SCA1. The reaction mixture was incubated at 95°C for 5 min, then 13 cycles of 96°C for 1 min, followed by 1 min at 62°C -0.5 °C/cycle and 40s at 68°C, then 22 cycles of 96°C for 1 min, followed by 1 min at 56°C and 40s at 68°C, and a final extension step of 68°C for 5 min.

All amplification reactions were carried out in a MJ Research PTC 100 thermocycler. Positive controls were employed to established amplification condition of each reaction.

Allele size analysis

PCR products were first analyzed by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Fragments were compared to 100bp DNA ladder.

In order to determine allele size, SCA1 amplicons were analyzed on a 10% (w/v) polyacrylamide gels (29:1 acrylamide:bis-acrylamide), and SCA2 and SCA6 amplicons were resolved on a 12.5% (w/v) polyacrylamide gel (29:1 acrylamide:bis-acrylamide). Sizes of alleles were determined by comparing relative migration to commercial DNA ladders (10, 50, and 100bp DNA ladder). An 8µl aliquot of each amplicon was mixed to 0.25% (w/v) bromophenol

and 0.25% (w/v) xylene cyanol. Electrophoresis was performed at 4W for 18 to 24h at room temperature, according to the specific length of amplified fragment. Amplicons were visualized using silver staining protocol, as previously described [28].

Results

Protocols described here were applied to detect normal and expanded alleles associated to SCA1, SCA2, and SCA6. In addition, size of alleles was also determined using a modified approach based on electrophoresis, and silver staining for amplicon identification.

We have detected 12 new cases of SCA1, SCA2, and SCA6 patients out of 64 individuals analyzed. Considering only unrelated individuals, this study was able to identify seven new SCA patients out of 59 individuals, giving a frequency of 11.86% (7/59).

Although the remaining 45 unrelated individuals tested for SCA1, SCA2, and SCA6 demonstrated to carry two normal alleles, CAG length was also determined in these samples. In this assessed population, normal alleles for SCA1 showed between 25 and 32 CAG repeats; while range of variation in normal alleles for SCA2 was 19 to 26 CAG repeats, and normal alleles for SCA6 showed from 5 to 14 CAG repeats. The most common repeat size found in SCA2 gene was alleles with 22 CAG repeats.

The SCA1 case

One individual was identified as a SCA1 patient. This patient showed a mutant allele with 47 CAG repeats and a normal allele of 26 CAG repeats (Figure 1A – lane 3, and Table 1). This case, denominated case 1, was a 41 year-old woman who had been ataxic since the age of 35. Considering this new case, we can estimate a frequency of 1.7% (1/59) for SCA1 in our sample population.

His neurological examination revealed marked gait and postural ataxia, with independence still preserved, although present difficulties to walk, get down and go up stairs. Our patient related also frequent cramps and tremor.

SCA2 cases

Detection of SCA2 gene was able to identify four positive cases among unrelated individuals, and three additional patients in two different families (seven SCA2 patients in total) (Table 1). Four SCA2 patients showed a mutant allele of 38 CAG repeats and a normal allele with 22 CAG repeats being denominated by cases 3-6 (Figure 2 – lane 1). Another SCA2 patient carry a mutant allele of 41 CAG repeats and a normal allele of 22 CAG repeats (case 7). His brother, case number 8, carries a mutant allele of 42 CAG repeats, and a normal allele of 22 CAG repeats (Figure 1B – lane 3, and Figure 2 – lane 3). In addition to these six confirmed patients, a further individual, case 2, carry two alleles with CAG repeats within an intermediate interval (32 and 33 CAG repeats) (Table 1). Therefore, frequency of SCA2 patients in our sample population was estimated to be 6.78% (4/59).

The SCA2 positive patients have of 30 at 71 year-old, and the age of onset varies of 25 at 46 years. An inverse correlation is apparent between the age of onset and CAG repeat length of each patient, showing the phenomenon of anticipation (Table 2).

Neurological features in SCA2 patients here studies involve gait, postural and limb ataxia, involuntary movements, cramps, tremor, dystonia, dysarthria, dysmetria, hyporeflexia, dysphagia, dysdiadochokinesia, fasciculations, parkinsonism, nystagmus and slow saccades. Cognitive and memory deficit were verified in one specific case, number 3, a man of 71 year-old. Cerebellar, bulbar and mesencephalic atrophy also were observed only in the SCA2 patient number 3. However, the SCA2 patient number 7, a man of 35 year-old, also shows cerebellar atrophy.

The SCA6 cases

Two individuals were identified as new SCA6 patients (Figure 1C, and Table 1). One case, number 9, showed an expanded allele of 24 CAG repeats and a normal allele of 12 CAG repeats (Figure 1C and Figure 2 – lane 6). The other new SCA6 patient, index case number 10, showed 11 CAG repeats in the normal allele and 24 CAG repeats in the mutant allele (Figure 2 – lane 5). This patient has two brothers that were also diagnosed as SCA6 patients. These other two individuals, patients 11 and 12, showed alleles of same size that those presented in the index case (a normal allele of 11 CAG repeats and a mutant allele of 24 CAG repeats). Hence, frequency of SCA6 in our sample population was estimated to be 3.39% (2/59).

The SCA6 positive patients have of 44 at 58 year-old, and the age of onset varies of 30 at 37 years. The age of onset and CAG repeat length of SCA6 patients was not compared because the expanded alleles this individuals show the same size.

Neurological features in SCA6 positive patients evaluated involve gait, postural and limb ataxia, dysarthria, dysphagia, diplopia and hypermetria. Cognitive or memory deficit were not observed in any SCA6 patient. Until the moment, cerebellar and bulbar atrophy were not detected too.

Discussion

The establishment of a molecular protocol for detecting normal and mutant alleles in genes responsible for SCAs was essential for a better diagnosis of families at risk, considering that there are several individuals with clinical signs and/or symptoms of those diseases. In general, previously established protocols by other groups were based on hybridization using an isotopic labeled probe. Thus, a non-radioactive technique was thought to be developed and minimize risks of exposure to nasty chemicals as well as reduce contamination and radioactive spills.

We present here a report of molecular studies carried out in Brazil in individuals with typical signs and/or symptoms of ataxia. These individuals were previously tested for a mutation in *MJD1*, the gene responsible for MJD/SCA3. A recent study carried out in our laboratory showed that MJD/SCA3 is by far the most frequent type of SCA in our region, with a frequency of 61% in a sample of individuals with typical signs and/or symptoms of ataxia [22]. This finding is similar to other studies performed worldwide, and can also be explained by our ethnic origin (Portuguese occupation of Brazilian territory). However, searching for other SCAs is also essential to define the remaining cases.

In this study, we have established efficient protocols to verify normal and expanded alleles in *loci* associated to SCA1, SCA2, and SCA6. Protocols were based on non-isotopic techniques and proved to be effective and reproducible for detecting formerly diagnosed samples, which were employed as positive controls, as well as seven novel index cases in the studied population and five positive relative individuals. These patients have clinical characteristics and neurological findings, all comparable with those found in the literature as gait, postural and limb ataxia, involuntary movements, cramps, tremor, dystonia, dysarthria,

dysmetria, hyporeflexia, dysphagia, dysdiadochokinesia, fasciculations, nystagmus, slow saccades, diplopia, hypermetria, cognitive and memory deficit, and cerebellar, bulbar and mesencephalic atrophy [1]. Cognitive and memory deficit were observed in a man of 71 year-old with SCA2, due to his advanced age but also by the effect of the disease. In some patients, cerebellar, bulbar and mesencephalic atrophy had been observed; other individuals can present such features with the development of the disease in future evaluations.

We have detected only one case of SCA1 in our population. This indicates a low incidence of this type of SCA in our region, although we are aware that number of individuals may not be sufficient to draw final remarks. However, prevalence of SCA1 in our population will hardly get close to the rates reported in Europe (21%) [1]; this can be caused by ethnic heterogeneity that is characteristic of the Brazilian population, due to different waves of immigration.

Analysis of SCA2 gene revealed three patients with alleles above 35 CAG repeats, which is typical of an affected individual. A patient's brother and two patient's sons of other family were also proved to carry an expanded allele. In addition, intermediate alleles, of 32 and 33 CAG repeats, were detected in another subject. This patient was considered as affected based on previous report that 33 CAG repeats can be enough to cause the disease [14]. Besides, several symptomatic individuals with mutant alleles of 34 or 35 CAG repeat, or even 32 CAG repeats, have been previously described [29, 30]. Clearly sequencing of this patient's DNA is crucial to confirm CAG length in these SCA alleles; this experiment is currently being performed.

Although our limited number of confirmed SCA2 cases, we compared age of onset and CAG repeat length of each patient (Table 2). As expected, an inverse correlation is shown between these two parameters, confirming the phenomenon of anticipation [26, 31, 32]. We cannot compare age of onset and CAG repeat length of SCA6 patients because the expanded alleles of these individuals are of same length.

SCA6 gene screening revealed two new unrelated patients. Additionally, two brothers of a patient were also identified as SCA6 patients. When analyzing CAG repeat length, every patient showed both normal and mutant alleles of similar length, as expected due to a very narrow range of CAG repeats in this gene. Therefore, data generated in this study was not sufficient to evaluate anticipation in these cases, as reported previously [33].

Despite the limited number of samples analyzed, 59 unrelated patients and five relative patients, our results confirm the hypothesis of those cases of some SCA, not only MJD, occur in our population. Frequencies of new SCAs cases were low (SCA1 – 1.7%, SCA2 – 6.78%, and SCA6 – 3.39%) when considering only unrelated patients, as expected. However, a slightly higher frequency of SCA2 was evident. This disease is the most frequent type of dominant ataxia found in some mixed populations following MJD according to literature. Prevalence established in our population can be again due to ethnic heterogeneity in our region. In order to confirm this hypothesis, further studies should be performed, not only with this type of SCA, but also with a larger population of patients with signs and/or symptoms of ataxia.

We can also observe that range of CAG repeats length found in this studied sample was very similar to previous reported data [1, 9, 17]. The most common allele found in the SCA2 gene found in this study (22 CAG repeats) confirmed the data previously described [26].

In summary, data presented here emphasizes the importance of protocols for molecular analysis of genes associated to SCA. These diseases are frequently found in neurological clinics in reference centers, such as the hospital where our laboratory is based. Hence, a precise diagnosis is essential for a proper management of the index case as well as to provide identification of new cases in the same family, which is quite frequent when considering autosomal dominant inherited diseases. Moreover, pre-symptomatic diagnosis can also be an option to be offered to families at risk. Finally, our data corroborate the assumption that other SCAs, other than SCA3/MJD, can be detected in our region in a much lower frequency.

Acknowledgements

The authors would like to thank all patients and their relatives for collaboration. This work was supported by several Brazilian Funding Agencies (CAPES, FINEP/HCPA, CNPq, PRONEX/MCT).

References

- [1] H.Y. Zoghbi, H.T. Orr, Spinocerebellar Ataxias, In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York, McGraw-Hill, (2001) pp. 5741-5758.
- [2] R.N. Rosenberg, Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue, *Neurology* 45 (1995) 1-5.
- [3] G. Stevanin, A. Durr, A. Brice, Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology, *Eur. J. Hum. Genet.* 8 (2000) 4-18.
- [4] M.D. Koob, M.L. Moseley, L.J. Schut, K.A. Benzow, T.D. Bird, J.W. Day, L.P. Ranum, An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8), *Nat. Genet.* 21 (1999) 379-384.
- [5] T. Matsuura, T. Yamagata, D.L. Burgess, A. Rasmussen, R.P. Grewal, K. Watase, M. Khajavi, A.E. McCall, C.F. Davis, L. Zu, M. Achari, S.M. Pulst, E. Alonso, J.L. Noebels, D.L. Nelson, H.Y. Zoghbi, T. Ashizawa, Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10, *Nature Genetics* 26 (2000) 191-194.
- [6] H.Y. Zoghbi, Spinocerebellar ataxia type 1, *Clin. Neurosci.* 3 (1995) 5-11.
- [7] C.J. Cummings, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, Progress in pathogenesis studies of spinocerebellar ataxia type 1, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354 (1999) 1079-1081.
- [8] H.T. Orr, M.Y. Chung, S. Banfi, T.J. Jr. Kwiatkowski, A. Servadio, A.L. Beaudet, A.E. McCall, L.A. Duvick, L.P. Ranum, H.Y. Zoghbi, Expansion of an unstable trinucleotide CGA repeat in spinocerebellar ataxia type 1, *Nat. Genet.* 4 (1993) 221-226.

- [9] C. Zühlke, A. Dalski, Y. Hellenbroich, S. Bubel, E. Schwinger, K. Burk, Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): Phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles, *Eur. J. Human. Genet.* 10 (2002) 204-209.
- [10] L.P. Ranum, M.Y. Chung, S. Banfi, A. Bryer, L.J. Schut, R. Ramesar, L.A. Duvick, A. MacCall, S.H. Subramony, L. Goldfarb, Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset, *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994) 244-252.
- [11] I. Silveira, I. Lopes-Cendes, S. Kish, P. Maciel, C. Gaspar, P. Coutinho, M.I. Botez, H. Teive, W. Arruda, C.E. Steiner, W. Pinto-Junior, J.A. Maciel, S. Jerin, G. Sack, E. Andermann, L. Sudarsky, R. Rosenberg, P. MacLeod, D. Chitayat, R. Babul, J. Sequeiros, G.A. Rouleau, Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients, *Neurology* 46 (1996) 214-218.
- [12] L. Schöls, G. Amoiridis, T. Buttner, H. Przuntek, J.T. Epplen, O. Riess, Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 924-932.
- [13] G. Orozco Diaz, A. Nodarse Fleites, R. Cordoves Sagaz, G. Auburger, Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba, *Neurology* 40 (1990) 1369-1375.
- [14] M. Fernandez, M.E. McClain, R.A. Martinez, K. Snow, H. Lipe, J. Ravits, T.D. Bird, A.R. La Spada, Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease, *Neurology* 55 (2000) 569-572.
- [15] D.H. Geschwind, S. Perlman, C.P. Figueroa, L.J. Treiman, S.M. Pulst, The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia, *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997) 842-850.

- [16] S. Gispert, R. Twells, G. Orozco, A. Brice, J. Weber, L. Heredero, K. Scheufler, B. Riley, R. Allotey, C. Nothers, Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to human chromosome 12q23-24.1, *Nature Genet.* 4 (1993) 295-299.
- [17] A. Kakizuka, Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders?, *Trends in Genetics* 14 (1998) 396-402.
- [18] J. Hussey, P.J. Lockhart, W. Seltzer, Z.K. Wszolek, H. Payami, M. Hanson, K. Gwinn-Hardy, M. Farrer, Accurate determination of ataxin-2 polyglutamine expansion in patients with intermediate-range repeats, *Genet. Test* 6 (2002) 217-220.
- [19] S. Restituito, R.M. Thompson, J. Eliet, R.S. Raike, M. Riedl, P. Charnet, C.M. Gomez, The polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia type 6 causes a beta subunit-specific enhanced activation of P/Q-type calcium channels in *Xenopus* oocytes, *J. Neurosci.* 20 (2000) 6394-6403.
- [20] K. Komeichi, H. Sasaki, I. Yabe, I. Yamashita, S. Kikuchi, K. Tashiro, Twenty CAG repeats are sufficient to cause the SCA6 phenotype, *J. Med. Genet.* 38 (2001) E38.
- [21] I. Lopes-Cendes, H. G. Teive, M. E. Calcagnotto, J. C. Da Costa, F. Cardoso, E. Viana, J. A. Maciel, J. Radvany, W. O. Arruda, P. C. Trevisol-Bittencourt, P. Rosa Neto, I. Silveira, C. E. Steiner, W. Pinto Junior, A. S. Santos, Y. Correa Neto, L. C. Werneck, A. Q. Araujo, G. Carakushansky, L. R. Mello, L. B. Jardim, G. A. Rouleau, Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients, *Arq Neuropsiquiatr.* 55 (1997) 519-529.
- [22] L.B. Jardim, I. Silveira, M.L. Pereira, A. Ferro, I. Alonso, M. do Ceu Moreira, P. Mendonça, F. Ferreirinha, J. Sequeiros, R. Giugliani, 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 (2001) 870-876.

- [23] L.B. Jardim, M.L. Pereira, I. Silveira, A. Ferro, J. Sequeiros, R. Giugliani, Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds, *Acta Neurol.Scand.*, 104 (2001) 224-231.
- [24] T.S. Carvalho, L.B. Jardim, R. Giugliani, M.L.S. Pereira, Machado-Joseph Disease: molecular analysis of patients from South Brazil, submitted to publication (2004).
- [25] A.S. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells, *Nucleic Acid Res.* 16 (1998) 1215.
- [26] S.M. Pulst, A. Nechiporuk, T. Nechiporuk, S. Gispert, X.N. Chen, I. Lopes-Cendes, S. Pearlman, S. Starkman, G. Orozco-Diaz, A. Lunkes, P. DeJong, G.A. Rouleau, G. Auburger, J.R. Korenberg, C. Figueroa, S. Sahba, Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2, *Nat. Genet.* 14 (1996) 269-276.
- [27] O. Zhuchenko, J. Bailey, P. Bonnen, T. Ashizawa, D.W. Stockton, C. Amos, W.B. Dobyns, S.H. Subrahony, H.Y. Zoghbi, C.C. Lee, Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel, *Nature Genetics* 15 (1997) 62-69.
- [28] B. Budowle, R. Chakaborty, A.M. Giusti, A.J. Eisenberg, R.C. Allen, Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE, *Am. J. Hum. Genet.* 48 (1991) 137-144.
- [29] A. Malandrini, L. Galli, M. Villanova, S. Palmeri, E. Parrotta, D. DeFalco, M. Cappelli, G.S. Grieco, A. Renieri, G. Guazzi, CAG repeat expansion in an Italian family with spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a clinical and genetic study, *Eur. Neurol.* 40 (1998) 164-168.
- [30] N. Santos, J. Aguiar, J. Fernandez, Molecular diagnosis of a sample of the Cuban population with spinocerebellar ataxia type 2, *Biotechnologia Aplicada* 16 (1999) 219-221.

[31] S. M. Pulst, A. Nechiporuk, S. Starkman, Anticipation in spinocerebellar ataxia type 2, *Nature Genet.* 5 (1993) 8-10.

[32] A. Durr, A. Brice, A. Lepage-Lezin, G. Cancel, D. Smadja, J.C. Vernant, Y. Agid, Dominant cerebellar ataxia type 1 linked to chromosome 12q (SCA2: spinocerebellar ataxia type 2), *Clin. Neurosci.* 3 (1995) 12-16.

[33] B.W. Soong, Y.C. Lu, K.B. Choo, H.Y. Lee, Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Taiwanese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6, *Arch. Neurol.* 58 (2001) 1105-1109.

Table 1 – Cases diagnosed as a SCA in this study.

Case Number	SCA1		SCA2		SCA6	
	CAG repeats length in normal allele (PCR product)	CAG repeats length in expanded allele (PCR product)	CAG repeats length in normal allele (PCR product)	CAG repeats length in expanded allele (PCR product)	CAG repeats length in normal allele (PCR product)	CAG repeats length in expanded allele (PCR product)
1	26 (204bp)	47 (265bp)				
2			-	32 (156bp)/33 (159pb)		
3*			22 (126bp)	38 (174bp)		
4*			22 (126bp)	38 (174bp)		
5*			22 (126bp)	38 (174bp)		
6			22 (126bp)	38 (174bp)		
7**			22 (126bp)	41 (185bp)		
8**			22 (126bp)	42 (188bp)		
9					12 (137bp)	24 (173bp)
10***					11 (134bp)	24 (173bp)
11***					11 (134bp)	24 (173bp)
12***					11 (134bp)	24 (173bp)

* These patients are from same family.

** These patients are from same family.

*** These patients are from same family.

Table 2 – Relationship between CAG repeats length and age of onset in SCA2 patients diagnosed by this study.

Case Number	Number of CAG repeats in the expanded allele	Age of onset (years)
2	32/33	46
3*	38	40
4*	38	35
5*	38	30
6	38	37
7**	41	27
8**	42	25

* These patients are from same family.

** These patients are from same family.

3.3 ARTIGO 3

SCA1, SCA2, AND SCA6 GENES CAG REPEATS DO NOT CORRELATE WITH THE MJD PHENOTYPE.

Artigo submetido à publicação na revista *Neurogenetics*.

SCA1, SCA2, and SCA6 genes CAG repeats do not correlate with the MJD phenotype.

Alexis Trott^{1,2}, Laura B. Jardim^{1,3}, Isabel Silveira⁵, Jorge Sequeiros⁵, Roberto Giugliani^{1,4} and Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2}

⁽¹⁾ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Brazil.

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁽³⁾ Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁽⁴⁾ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁽⁵⁾ UnIGENE, Institute for Molecular and Cell Biology, Universidade do Porto, Portugal.

Communicating author:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Medical Genetics Service

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: + 55 51 21018011

Fax: + 55 51 21018010

E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Machado-Joseph disease (MJD), or SCA3, is one spinocerebellar ataxias caused by an expansion of a CAG repeat. The variability in age of onset and in the complexity of neurological findings indicates that MJD is modulated by modifier factors. We have recently observed that the severity of fasciculations of MJD patients were associated with CAG repeat length of the higher SCA2 allele. To confirm such correlations, we studied SCA1, SCA2 and SCA6 genes of new MJD patients. The results showed that CAG repeats of ataxia genes studied here did not influence any clinical variable on MJD phenotype.

Key Words: Machado-Joseph disease, CAG expansions, SCA1 gene, SCA2 gene, SCA6 gene.

Introduction

Machado-Joseph disease (MJD), or SCA3, is one of several spinocerebellar ataxias whose genetic etiology – a protein with toxic stretches of polyglutamine – has been discovered in the past decade. First described in Azorean families, MJD shows a heterogeneous clinical picture (1, 2, 3, 4). This group of disorders, generally referred to as the SCAs, comprises five or six disorders caused by an expansion of a CAG trinucleotide repeat (SCA1, SCA2, SCA3, SCA7, SCA17 and SCA6). The mutation associated with MJD is an expansion of a CAG repeat in the coding region of the MJD1 gene (5). Normal alleles contain 12-41 CAG repeats, whereas mutant alleles show 61-86 repeats (6, 7). Since CAG (and CAA) encode the amino acid glutamine, the result is a protein that has a long stretch of polyglutamine residues. Same type of mutation also causes Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), and dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA).

Each polyglutamine disease is a dominant disorder characterized by selective neuronal degeneration, clinical variability within and between families, and anticipation. Since the genes involved in each disease have little in common except for the presence of the polyglutamine expansion, it is presumed that polyglutamine toxicity is the root of the pathogenesis of each disorder. Several evidences pointed to the fact that expanded stretches of polyglutamine appear to take on an abnormal configuration, which results in the formation of polyglutamine aggregates. Besides sharing a similar pathogenetic mechanism, SCAs also have in common a wide clinical, even intrafamilial variability, due to several possible combinations of neurological signs. This variability turns difficult or impossible to distinguish one SCA from another on clinical grounds – phenotypes are very similar or even the same. The variability in

age of onset and in the complexity of neurological findings, indicate that SCAs are modulated by modifier factors.

We recently hypothesized that CAG tracts of the several SCA associated genes would interact with each other, probably through their polyglutamine products, thus contributing to the high clinical heterogeneity observed within each of these closely related disorders (8). In that report, we tried to verify whether polymorphic CAG repeats in SCA2, SCA6 and DRPLA *loci* would influence MJD phenotype – age of onset as well as several neurological characteristics –thus acting as modifier factors of this disease. For this purpose, we have previously examined 39 unrelated Brazilian patients with a formerly detected CAG expansion in the MJD1 gene. It was observed that the severity of fasciculations of MJD patients were associated with CAG repeat length of the long SCA2 allele (Mann-Whitney U test, $p < 0.03$, after Bonferroni procedure). All the other clinical measures of MJD patients (age of onset, anticipation, clinical types and other neurological signs) were not associated with CAG repeat length of SCA2, SCA6 and DRPLA genes. That positive finding had some clinical reasoning, since fasciculations are one of the most frequent neurological signs of the SCA2 phenotype. Even so, these previous results could be reviewed based on sample size (39 patients) or on the biological significance of CAG variation in the SCA2 alleles (too small). Therefore, these results must be confirmed by further studies, with new MJD patients of diverse ethnic origins, and with typing of other (CAG) n *loci*.

Methods

Forty four new MJD patients have been tested. After consent, neurological examination was performed and a blood sample was collected for DNA isolation. Firstly, CAG repeats of MJD1 gene were measured. When an expansion was detected, establishing a molecular diagnosis of MJD, other CAG tracts were also measured – in this study CAG repeats of SCA1, SCA2 and SCA6 genes. We have then added these new observations to the previous sample of MJD patients, obtaining a total sample of 83 MJD cases observed. Clinical variables under study were: age of onset, presence and severity of axial ataxia, limb ataxia, pyramidal syndrome, ophthalmoparesis, nystagmus, eyelid retraction, optic atrophy, dysphagia, dysarthria, rigidity, dystonia, fasciculations and sensitive losses.

Statistical analyses of data were performed using SPSS for Windows. The effect of length of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 *loci* on age of onset was studied by the Spearman correlation coefficient. Their effect on neurological signs was analyzed by Mann-Whitney *U*-test, when the evaluated sign was absent or present, or by Kruskal-Wallis test, when the evaluated sign showed more than two ordinal categories. All statistical results were corrected, using Bonferroni procedure based on Finner's modification.

Results

Average (sd) age of onset was of 32.5 (10.4) years, as previously published (9). The mean (sd) disease duration was 8.1 (6.1) years, with a range between 0 and 25 years.

The SCA1 studied alleles were estimated to have between 18 and 31 CAG repeats. The SCA2 normal alleles showed between 20 and 31 CAG repeats with the alleles 21 and 22 being the most frequent. Already the SCA6 alleles presents of 4 at 15 CAG repeats.

The results showed that SCA1, SCA2 and SCA6 gene CAG repeats did not influence any of these clinical variables studies on the MJD phenotype as age at onset, presence and severity of axial ataxia, limb ataxia, pyramidal syndrome, ophthalmoparesis, nystagmus, eyelid retraction, optic atrophy, dysphagia, dysarthria, rigidity, dystonia, fasciculations and sensitive losses, specially after applying Bonferroni procedure based on Finner's modification.

Discussion

When we increased the number of MJD patients from 39 to 83, the previous positive finding disappeared. This means that we undertook a Type I error, assuming that fasciculations in MJD patients and the CAG length of larger SCA2 allele were associated, when in fact, in a larger population of MJD patients, they were not. This error was probably due to that fact that, by chance alone, the first sampling of patients was not representative of MJD patients. A statistical significance, as we obtained in the first paper, even after such a severe correction like Bonferroni, not always reflects the reality.

However, the hypothesis that SCA gene products would interact one with others, thus producing some modulation in phenotypes, still persists. Recently, it was reported that SCA8 large CTA/CTG repeats are more common in ataxic patients, especially those with SCA6 (10). We understood that the question these authors addressed had some similarity with ours. Their sample size was quite large: 298 SCA6 patients, from a total sample of 1,388 SCA patients. In fact, only 12 (3.9%) SCA6 patients carried SCA8 large alleles. Even with this large sample of patients, the association found was probably weak.

The speculation that one SCA gene product could modulate another sounds rational. However, if our results reflect the truth, this hypothesis should be rejected. The alternative explanation would be that the epidemiological methodology of searching pathogenic associations occurring in the protein level of cellular biology, through CAG measurements and distant (in the causal link of events) clinical variables, is not able to detect such events. Gene expression studies will probably reveal the real nature of such interactions, if they exist.

Acknowledgements

The authors would like to thank all patients and their relatives for collaboration. This work was supported by: CAPES, FINE-HCPA, CNPq, PRONEX/MCT.

References

- (1) Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado Disease (1972) A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22:49.
- (2) Woods BT, Schaumburg HH (1972) Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 17:149-166.
- (3) Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976) Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26:703-714.
- (4) Coutinho P, Andrade C (1978) Autosomal Dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 28:703-709.
- (5) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S (1994) CAG expansions in a novel gene from Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-228.
- (6) Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57:54-61.

(7) Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4:807-812.

(8) Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Moreira MC, Mendonça P, Sequeiros J, Giugliani R (2003) Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurologica Scandinavica* 107:211-214.

(9) Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001) Neurologic findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58:899-904.

(10) Izumi Y, Maruyama H, Oda M, Morino H, Okada T, Ito H (2003) SCA8 repeat expansion: large CTA/CTG repeat alleles are more common in ataxic patients, including those with SCA6. *Am J Hum Genet* 72:704-709.

3.4 ARTIGO 4

DETECTION OF SCA7 ASSOCIATED DYNAMIC MUTATION AND IDENTIFICATION OF PATIENTS IN SOUTH BRAZIL.

Artigo a ser submetido à publicação na revista Journal of Neurology.

Detection of SCA7 associated dynamic mutation and identification of patients in South Brazil

A. Trott^{1,2}, T. S. Carvalho^{1,2}, L. Jardim^{1,3}, R. Giugliani^{1,4} and M. L. Saraiva-Pereira^{1,2}.

⁽¹⁾ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁽³⁾ Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁽⁴⁾ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Running Title: SCA7 patients in South Brazil.

Keywords: Spinocerebellar Ataxia; Trinucleotide Repeats; CAG repeats; Molecular analysis; SCA7 gene.

Communicating author:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Medical Genetics Service

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: + 55 51 21018011

Fax: + 55 51 21018010

E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

To the editor:

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a complex group of neurodegenerative diseases that affect the cerebellum and main connections. Onset of SCAs is in general in the adult life and shows great clinical heterogeneity (1). In successive generations, symptoms can initiate earlier with a more severe progression, phenomenon called anticipation (2). This study draws attention to spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7), characterized clinically by cerebellar ataxia associated with progressive macular dystrophy (3). SCA7 is caused by a CAG expansion in chromosome 3, region p12-p12.1, and number of repeats varies from 4 to 35 in normal alleles and from 36 to 306 in mutant alleles (3, 4).

The SCA7 mutations have been found in families of the Europe, Africa, United States, Brazil, Israel and South Korea (5). The frequency of the SCA7 expansion in South Africa represents one of the highest frequencies for this expansion reported in any country, and the SCA7 mutations have only been found in families of Black ethnic origin (6).

The aims of this work were to detect dynamic mutation associated to SCA7 (CAG expansion) and to identify new SCA7 families in South Brazil.

We have studied 57 unrelated individuals and three relatives (60 individuals in total) who were referred to the Medical Genetics Service of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

PCR assay for detecting repeats in SCA7 gene was performed using primers SCA7-F (5'-GAGCGGAAAGAATGTCGGAG-3') and SCA7-R (5'-TTCAGGACTGGGCAGAGG-3'). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel, visualized by ethidium bromide staining, and on a 12.5% (w/v) polyacrylamide gel (29:1 acrylamide:bis-acrylamide), followed by silver staining protocol as previously described (7).

References

- (1) Zoghbi HY, Orr HT (2001) Spinocerebellar Ataxias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York, McGraw-Hill, pp. 5741-5758.
- (2) Rosenberg RN (1995) Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology* 45:1-5.
- (3) Lebre AS, Brice A (2003) Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res* 100:154-63.
- (4) Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Dürr A, Zaim A, Ravise N, Burque C, Penet C, Van Regemorter N, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Van Broeckhoven C, Brice A (1995) The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p12.1. *Nature Genet* 10:84-88.
- (5) Stevanin G, David G, Abbas N, Dürr A, Holmberg M, Duyckaerts C, Giunti P, Cancel G, Ruberg M, Mandel J-L, Brice A (1998) Spinocerebellar ataxia Type 7 (SCA7). In: Rubinsztein DC and Hayden MR, Editores. *Analysis on triplet repeat disorders*. First Edition. Oxford: BIOS scientific publishers.
- (6) Bryer A, Krause A, Bill P, Davids V, Bryant D, Butler J, Heckmann J, Ramesar R, Greenberg J (2003) The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216:47-54.

(7) Budowle B, Chakaborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet 48:137-144.

4. Considerações Finais

4.1 Os diagnósticos moleculares

Devido ao alto número de casos com sinais clínicos e/ou sintomas de algum tipo de ataxia espinocerebelar, o estabelecimento de protocolos moleculares para detecção de alelos normais e alelos mutantes nos genes responsáveis por estas doenças foi essencial para um diagnóstico mais preciso de casos de ataxia. Protocolos radioativos têm sido utilizados por outros grupos de pesquisa visando tal objetivo. Resolvemos desenvolver uma técnica não-radioativa, minimizando os riscos de exposição a compostos químicos perigosos e evitando contaminação.

Os pacientes estudados foram previamente testados para a mutação no gene *MJD1*, responsável por MJD/SCA3, apresentando resultado negativo. Portanto, pesquisas para as demais SCAs foram essenciais no sentido de se definir o diagnóstico dos casos de ataxia que não apresentam MJD.

Neste estudo, nós estabelecemos protocolos eficientes para verificar alelos normais e expandidos nos *loci* associados à SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7. Os protocolos foram baseados em técnicas não radioativas, com resultados efetivos e reprodutíveis.

Um único caso de SCA1 foi observado em nossa população, indicando uma baixa incidência deste tipo de SCA em nossa região.

A análise do gene da SCA2 revelou três pacientes de famílias diferentes com alelos mutantes, ou seja, positivos para esta doença. Um irmão de um destes pacientes e dois filhos de um segundo paciente também revelaram serem portadores de alelos expandidos no gene de SCA2. Além destes casos positivos, um outro paciente apresentou alelos intermediários com 32 e 33 repetições CAG sendo considerado positivo, pois 33 repetições podem ser suficientes para causar SCA2 (Fernandez *et al*, 2000). Além disto, vários casos sintomáticos com alelos mutantes apresentando 34 ou 35 repetições, ou ainda 32 CAGs, já foram descritos (Malandrini *et al*, 1998; Santos *et al*, 1999).

O número de casos de SCA2 positivos detectados, sete casos no total, apesar de ser limitado, proporcionou uma comparação entre a idade de início da doença e o tamanho da repetição CAG expandida de cada paciente. Como esperado, uma correlação inversa foi

observada entre estes dois parâmetros, confirmando o fenômeno de antecipação descrito na literatura para SCA2 (Pulst *et al*, 1993; Pulst *et al*, 1996; Durr *et al*, 1995). O paciente positivo para SCA2 com expansão de tamanho menor (33 CAGs), apresentou a idade de início mais elevada dos casos desse estudo (46 anos), enquanto que no caso positivo com maior expansão (42 CAGs), os sintomas começaram a se manifestar aos 25 anos.

Os resultados para SCA6 revelaram dois pacientes positivos de famílias diferentes, além de dois irmãos dos casos índices. Os pacientes afetados apresentaram os tamanhos dos alelos normais e mutados muito similares, como esperado, pois as faixas de repetições são estreitas. Portanto, nossos dados não foram suficientes para fazer uma avaliação da antecipação nestes casos.

Dois pacientes isolados, além de três familiares, foram diagnosticados com a SCA7. As duas famílias são de origem étnica negra, como vem sendo descrito na literatura (Bryer *et al*, 2003).

Apesar do número de pacientes testados ser limitado, nossos resultados confirmam a hipótese de que casos de outras SCAs, não apenas MJD, ocorrem na nossa população. As freqüências para essas doenças foram: SCA1 (1,7%), SCA2 (6,78%), SCA6 (3,39%) e SCA7 (3,51%). Como pode ser observado, SCA2 teve uma freqüência levemente superior às demais. Esta ataxia é a mais freqüente em algumas populações mistas, depois de MJD. A prevalência estabelecida em nossa população pode ser consequência da heterogeneidade étnica observada em nossa região.

As faixas de tamanho dos alelos normais para as ataxias aqui estudadas são similares às descritas na literatura. Inclusive, o alelo normal com 22 CAGs no gene para SCA2 foi o mais comum, também de acordo com outros estudos (Pulst *et al*, 1996).

Os dados obtidos neste trabalho enfatizam a importância dos protocolos moleculares para análise dos genes associados às ataxias. Estas doenças são freqüentemente encontradas nas clínicas neurológicas de importantes centros de referência, como o Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Portanto, um diagnóstico preciso é essencial para a identificação de novos casos de ataxia, além de oferecer diagnóstico pré-sintomático às famílias em risco.

4.2 Fatores genéticos modificadores para MJD/SCA3

Foram estudados 44 novos casos da doença de Machado-Joseph quanto ao tamanho das repetições CAG nos genes de SCA1, SCA2 e SCA6, sendo associados aos 39 pacientes

previamente estudados, obtendo-se um total de 83 MJD positivos. Foram correlacionadas as repetições encontradas nos genes SCA1, SCA2 e SCA6 com diferentes variáveis clínicas. Os resultados mostraram que os segmentos CAG nos genes estudados não influenciam qualquer variável clínica estudada.

Resultados prévios, avaliando-se 39 pacientes, demonstraram uma correlação positiva entre as fasciculações em pacientes MJD e os alelos normais de maior tamanho encontrados no gene de SCA2. Entretanto, a correlação desapareceu com um aumento amostral de 39 para 83. Observamos um erro do tipo I, já que se observou em um primeiro momento uma correlação inexistente. Portanto, a primeira amostra de 39 pacientes não era realmente representativa dos pacientes MJD.

Contudo, a hipótese de que os produtos dos genes das ataxias interagem entre si, produzindo alguma modulação no fenótipo, ainda persiste. No entanto, se nossos resultados refletirem a verdade, esta hipótese deve ser rejeitada. Outros estudos envolvendo as proteínas produzidas pelos genes das SCAs, além da expressão gênica, podem revelar, caso existam, as interações entre os produtos de tais genes e, se de fato, tais relações podem modular a expressão fenotípica e o quadro clínico observado em pacientes com algum tipo de ataxia espinocerebelar dominante.

4.3 As freqüências das SCAS no sul do Brasil

As análises moleculares permitiram o diagnóstico de pacientes brasileiros positivos para todas as SCAs 1, 2, 3, 6, 7 e 10, sendo que MJD permanece como a SCA mais freqüente entre os pacientes do sul do Brasil. Isso se explica por um efeito fundador (imigração açoriana no séc. XVIII). Poucas famílias ficaram sem diagnóstico: 6 % versus 20 a 50% da literatura.

O grupo de pacientes com SCA7 tinha origem afro-brasileira. Na África do Sul, a frequência de SCA7 é uma das mais altas no mundo, sendo que as mutações para SCA7 foram apenas encontradas em famílias de origem étnica negra (Bryer *et al*, 2003). Embora nunca relatada em famílias de origem européia ou asiática, SCA10 estava presente neste grupo estudado.

Algumas correlações clínicas foram observadas; associação de SCA7 com uma maior antecipação, achados piramidais e atrofia óptica, a associação de SCA6 com ataxia mais severa de membros.

4.4 Perspectivas

As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes tem sido objeto de importantes estudos recentemente, visando a melhor compreensão da fisiopatologia, dos aspectos clínicos e epidemiológicos das mesmas. Com o avanço das pesquisas, muito foi descoberto sobre as SCAs, com um aumento substancial no número de *loci* envolvidos nas diferentes ataxias. No entanto, muitos estudos devem ser realizados para o alcance de tratamentos mais eficazes para os pacientes acometidos por estas patologias, buscando-se uma melhor qualidade de vida e, se possível, a cura para estas doenças.

Este trabalho trouxe uma importante contribuição por estabelecer diagnósticos precisos, além de proporcionar testes pré-sintomáticos para os membros das famílias dos pacientes. Entretanto, novos estudos como este devem ser realizados para que outras ataxias tenham também um protocolo estabelecido, atendendo aos pacientes com sintomas de algum tipo de ataxia e não têm um diagnóstico exato. Atualmente, não se sabe o tipo de ataxia que acomete algumas famílias doentes, portanto, outros testes para diferentes tipos de SCAs deverão ser estabelecidos no futuro para que se possa diagnosticar um maior número de tipos de ataxia no Brasil.

Acreditamos que num futuro próximo, através dos novos conhecimentos gerados pelas pesquisas, nós tenhamos mais perspectivas em termos de diagnósticos para as diferentes ataxias, além de tratamentos mais eficazes, já que há uma maior identificação de casos positivos para estas doenças, além de descobertas de novos *loci* envolvidos com quadros clínicos de ataxia.

Portanto, sugerimos estudos na busca de novos *loci* envolvidos com as ataxias, além do estabelecimento de protocolos para as ataxias já descritas e não estudadas aqui. Pesquisas que possam gerar a total compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das diversas SCAs buscando tratamentos mais eficazes são fundamentais. Há a necessidade ainda de mais pesquisas epidemiológicas e clínicas na população brasileira.

5. Referências Bibliográficas

- Affaitati A, de Cristofaro T, Feliciello A and Varrone S. Identification of alternative splicing of spinocerebellar ataxia type 2 gene. *Gene* 2001; 67:89-93.
- Alonso I, Barros J, Tuna A, Coelho J, Sequeiros J, Silveira I, Coutinho P. Phenotypes of spinocerebellar ataxia type 6 and familial hemiplegic migraine caused by a unique CACNA1A missense mutation in patients from a large family. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 610-4.
- Benomar A, Krols L, Stevanin G, Cancel G, LeGuern E, David G, Ouhabi H, Martin JJ, Dürr A, Zaim A, Ravise N, Burke C, Penet C, Van Regemorter N, Weissenbach J, Yahyaoui M, Chkili T, Agid Y, Van Broeckhoven C and Brice A. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p12.1. *Nature Genet* 1995; 10:84-88.
- Bird M. Hereditary ataxia overview. In Gene Reviews, www.genetests.org. 2004.
- Botez MI, Botez-Marquard T, Mayer P, Marchand L, Lalonde R and Reader TA. The treatment of spinocerebellar ataxias: facts and hypotheses. *Med Hypotheses* 1998; 51:381-4.
- Bryer A, Krause A, Bill P, Davids V, Bryant D, Butler J, Heckmann J, Ramesar R and Greenberg J. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa, *J Neurol Sci* 2003; 216:47-54.
- Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH and Bird TD. A new dominant spinocerebellar ataxia linked to chromosome 19q13.4-qter. *Arch Neurol* 2002a; 59:1291-5.
- Brkanac Z, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Bird TD and Raskind WH. Autosomal dominant sensory/motor neuropathy with Ataxia (SMNA): Linkage to chromosome 7q22-q32. *Am J Med Genet* 2002b; 114:450-7.
- Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P and Litt M. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet* 1994; 8:136-40.
- Bryer A, Krause A, Bill P, Davids V, Bryant D, Butler J, Heckmann J, Ramesar R and Greenberg J. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 2003; 216:47-54.
- Burright EN, Davidson JD, Duvick LA, Koshy B, Zoghbi HY and Orr HT. Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-1. *Hum Mol Genet* 1997; 6:513-8.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A. Friedreich ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-27.

- Cellini E, Forleo P, Nacmias B, Tedde A, Latorraca S, Piacentini S, Parnetti L, Gallai V and Sorbi S. Clinical and genetic analysis of hereditary and sporadic ataxia in central Italy. *Brain Res Bull* 2001; 56:363-6.
- Chai Y, Wu L, Griffin JD and Paulson HL. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem* 2001; 276:44889-97.
- Chen HK, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandez MH, Aitken A, Skoulakis EM, Orr HT, Botas J and Zoghbi HY. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 2003; 113:457-68.
- Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, Jain S and Brahmachari SK. CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2437-46.
- Chung MY, Lu YC, Cheng NC and Soong BW. A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain* 2003; 126(6): 1293-1299.
- Costanzi-Porrini S, Tessarolo D, Abbruzzese C, Liguori M, Ashizawa T and Giacanelli M. An interrupted 34-CAG repeat SCA-2 allele in patients with sporadic spinocerebellar ataxia. *Neurology* 2000; 54:491-3.
- Cummings CJ, Orr HT and Zoghbi HY. Progress in pathogenesis studies of spinocerebellar ataxia type 1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354(1386): 1079-81.
- Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestril R, Orr HT, Dillmann WH and Zoghbi HY. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 2001;10: 1511-8.
- David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunt P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel J and Brice A. Cloning the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 1997; 17: 65-70.
- David G, Durr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Benomar A, Belal S, Lebre AS, Abada-Bendib M, Grid D, Holmberg M, Yahyaoui M, Hentati F, Chkili T, Agid Y, Brice A. Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Mol Genet* 1998; 7:165-70.
- Davidson JD, Riley B, Burrig EN, Duvick LA, Zoghbi HY and Orr HT. Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2305-12.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997; 90: 537-48.

- DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod PM, Sequeiros J, Rouleau GA and Farrer LA. Familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 119-127.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP and Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997; 277: 1990-3.
- Donaldson KM, Li W, Ching KA, Batalov S, Tsai CC and Joazeiro CA. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8892-7.
- Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG and Madura K. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 6469-83.
- Duarte SF, Gustinari RS, Campos-Jr M, Pimentel MM and Lima MA. Genetic polymorphism at spinocerebellar ataxia 1 and 2 loci in Brazil. *Genet Mol Res* 2003; 2: 360-5.
- Dubourg O, Dürr A, Cancel G, Stevanin G, Chneiweiss H, Penet C, Agid Y and Brice A. Analysis of the SCA1 CAG repeat in a large number of families with dominant ataxia: clinical and molecular correlations. *Ann Neurol* 1995; 37: 176-180.
- Durr A, Brice A, Lepage-Lezin A, Cancel G, Smadja D, Vernant JC, Agid Y. Dominant cerebellar ataxia type 1 linked to chromosome 12q (SCA2: spinocerebellar ataxia type 2). *Clin Neurosci* 1995; 3: 12-16.
- Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T and Meisler MH. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1531-9.
- Evert BO, Vogt IR, Vieira-Saecker AM, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, Klockgether T and Wullner U. Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 1006-18.
- Evidente VG, Gwinn-Hardy KA, Caviness JN and Gilman S. Hereditary ataxias. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 475-90.
- Fernandez M, McClain ME, Martinez RA, Snow K, Lipe H, Ravits J, Bird TD, La Spada AR. Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease. *Neurology* 2000; 55: 569-72.
- Figuroa KP and Pulst SM. Identification and expression of the gene for human ataxin-2-related protein on chromosome 16. *Exp Neurol* 2003; 184: 669-78.

- Flanigan K, Gardner K, Alderson K, Galster B, Otterud B, Leppert MF, Kaplan C and Ptacek LJ. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 392-9.
- Frontali M. Spinocerebellar ataxia type 6: channelopathy or glutamine repeat disorder? *Brain Res Bull* 2001; 56: 227-31.
- Garden GA, Libby RT, Fu YH, Kinoshita Y, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Fine GC, Grote SK, Ware CB, Einum DD, Morrison RS, Ptacek LJ, Sopher BL, La Spada AR. Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *J Neurosci*. 2002; 22: 4897-905.
- Gardner K, Alderson K, Galster B, Kaplan C, Leppert M and Ptacek L. Autosomal dominant spinocerebellar ataxia: clinical description of a distinct hereditary ataxia and genetic localization to chromosome 16 (SCA4) in a Utah kindred. *Neurology* 1994; 44: 361.
- Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ and Pulst S. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 842-850.
- Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillerman R, Lunke 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 and Chamberlain S. Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to human chromosome 12q23-24.1. *Nature Genet* 1993; 4: 295-299.
- Giunti P, Stevanin G, Worth PF, David G, Brice A and Wood NW. Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1594-603.
- Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY and Ptacek LJ. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat Genet* 1995; 10: 89-93.
- Hackam AS, Wellington CL and Hayden MR. The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. *Clin Genet* 1998; 53: 233-42.
- Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. First edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.
- Helmlinger D, Abou-Sleymane G, Yvert G, Rousseau S, Weber C, Trottier Y, Mandel JL, Devys D. Disease progression despite early loss of polyglutamine protein expression in SCA7 mouse model. *J Neurosci* 2004; 24: 1881-7.
- Herman-Bert A, Stevanin G, Netter JC, Rascol O, Brassat D, Calvas P, Camuzat A, Yuan Q, Schalling M, Durr A and Brice A. 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* 2000; 67: 229-35.
- Holmes SE, Hearn EO, Ross CA and Margolis RL. SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia. *Brain Res Bull* 2001; 56: 397-403.
- Holmes SE, O'Hearn E and Margolis RL. Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 189-97.
- Hong S, Kim SJ, Ka S, Choi I and Kang S. USP7, a ubiquitin-specific protease, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20: 298-306.
- Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM. Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* 2000; 26: 44-50.
- Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D and Pulst SM. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1485-96.
- Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Rouleau GA, Sakaki Y and Kanazawa I. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 2001; 46: 413-22.
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S and Kakizuka A. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 1996; 13: 196-202.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier J-M, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dür A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y and Brice A. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 1996; 14:285-291.
- Ishikawa K, Owada K, Ishida K, Fujigasaki H, Shun Li M, Tsunemi T, Ohkoshi N, Toru S, Mizutani T, Hayashi M, Arai N, Hasegawa K, Kawanami T, Kato T, Makifuchi T, Shoji S, Tanabe T and Mizusawa H. Cytoplasmic and nuclear polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells. *Neurology* 2001; 56: 1753-6.
- Izumi Y, Maruyama H, Oda M, Morino H, Okada T, Ito H, Sasaki I, Tanaka H, Komure O, Udaka F, Nakamura S and Kawakami H. SCA8 repeat expansion: large CTA/CTG repeat alleles are more common in ataxic patients, including those with SCA6. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 704-9.
- Jackson JF, Currier RD, Terasaki PI and Morton NE. Spinocerebellar ataxia and HLA linkage: risk prediction by HLA typing. *N Engl J Med* 1977; 296: 1138-41.
- Jardim LB. Aspecto clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Ceu Moreira M, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 2001; 248: 870-876.
- Johansson J, Forsgren L, Sandgren O, Brice A, Holmgren G, Holmberg M. Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 171-6.
- Jones AL, Wood JD and Harper PS. Huntington disease: advances in molecular and cell biology. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 125-38.
- Junck L and Fink JF. Machado-Joseph disease and SCA3: the genotype meets the phenotypes. *Neurology* 1996; 46: 4-8.
- Kakizuka A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends in Genetics* 1998; 14: 396-402.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S and Kakizuka A. CAG expansions in a novel gene from Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994; 8: 221-8.
- Kim SJ, Kim TS, Kim IY, Hong S, Rhim H and Kang S. Polyglutamine-expanded ataxin-1 recruits Cu/Zn-superoxide dismutase into the nucleus of HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 660-5.
- Klockgether T. Recent advances in degenerative ataxias. *Curr Opin Neurol* 2000; 13: 451-5.
- Klockgether T, Wullner U, Spauschus A and Evert B. The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Mov Disord* 2000; 15: 604-12.
- Knight MA, Kennerson ML, Anney RJ, Matsuura T, Nicholson GA, Salimi-Tari P, Gardner RJ, Storey E and Forrest SM. 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* 2003;13: 147-57.
- Knight MA, Gardner RJ, Bahlo M, Matsuura T, Dixon JA, Forrest SM and Storey E. Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification: spinocerebellar ataxia type 20. *Brain* 2004; 127: 1172-81.
- Koefoed P, Hasholt L, Fenger K, Nielsen JE, Eiberg H, Buschard K and Sorensen SA. Mitotic and meiotic instability of the CAG trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Hum Genet* 1998; 103: 564-9.
- Koh SH, Kim HT, Kim SH, Lee GY, Kim J and Kim MH. Spinocerebellar ataxia type 6 and episodic ataxia type 2 in a Korean family. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 809-13.

- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji S. Unstable expression of CAG repeat in hereditary dentatorubralpallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 1994; 6: 9-13.
- Komeichi K, Sasaki H, Yabe I, Yamashita I, Kikuchi S and Tashiro K. Twenty CAG repeats are sufficient to cause the SCA6 phenotype. *J Med Genet* 2001; E38.
- Konigsmark BW and Weiner LP. The olivopontocerebellar atrophies: a review. *Medicine* 1970; 49: 227-41.
- Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow K, Bird TD, Day JW and Ranum L. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Natura Genet* 1999; 21: 379-84.
- Kubodera T, Yokota T, Ohwada K, Ishikawa K, Miura H, Matsuoka T and Mizusawa H. Proteolytic cleavage and cellular toxicity of the human alpha1A calcium channel in spinocerebellar ataxia type 6. *Neurosci Lett* 2003; 341: 74-8.
- Lebre AS and Brice A. Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res* 2003; 100:154-63.
- Li F, Macfarlan T, Pittman RN, Chakravarti D. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 2002; 277: 45004-12.
- Lin X and Ashizawa T. SCA10 and ATTCT repeat expansion: clinical features and molecular aspects. *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 184-8.
- Lindenberg KS, Yvert G, Muller K and Landwehrmeyer GB. Expression analysis of ataxin-7 mRNA and protein in human brain: evidence for a widespread distribution and focal protein accumulation. *Brain Pathol* 2000; 10: 385-94.
- Lokkegaard T, Nielsen JE, Hasholt L, Fenger K, Werdelin L, Tranebjaerg L, Lauritzen M, Colding-Jorgensen E, Gronbech-Jensen M, Henriksen OA and Sorensen SA. Machado-Joseph disease in three Scandinavian families. *J Neurol Sci* 1998; 156: 152-7.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J and Loureiro JE. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 54-61.
- Malandrini A, Galli L, Villanova M, Palmeri S, Parrotta E, DeFalco D, Cappelli M, Grieco GS, Renieri A, Guazzi G. CAG repeat expansion in an italian family with spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a clinical and genetic study. *Eur Neurol* 1998; 40: 164-8.
- Mantuano E, Veneziano L, Jodice C and Frontali M. Spinocerebellar ataxia type 6 and episodic ataxia type 2: differences and similarities between two allelic disorders. *Cytogenet Genome Res* 2003;100: 147-53.

- Mao R, Aylsworth AS, Potter N, Wilson WG, Brenningstall G, Wick MJ, Babovic-Vuksanovic D, Nance M, Patterson MC, Gomez CM and Snow K. Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *Am J Med Genet* 2002;110: 338-45.
- Margolis RL. The spinocerebellar ataxias: order emerges from chaos. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002; 2: 447-56.
- Mariotti C, Gellera C, Grisoli M, Mineri R, Castucci A and Di Donato S. Pathogenic effect of an intermediate-size SCA-6 allele (CAG)(19) in a homozygous patient. *Neurology* 2001; 57: 1502-4.
- Matsuura T, Sasaki H, Yabe I, Hamada K, Hamada T, Shitara M and Tashiro K. Mosaicism of unstable CAG repeats in the brain of spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol* 1999; 246: 835-9.
- Meijer IA, Hand CK, Grewal KK, Stefanelli MG, Ives EJ and Rouleau GA. A locus for autosomal dominant hereditary spastic ataxia, SAX1, maps to chromosome 12p13. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 763-9.
- Miyoshi Y, Yamada T, Tanimura M, Taniwaki T, Arakawa K, Ohyagi Y, Furuya H, Yamamoto K, Sakai K, Sasazuki T and Kira J. A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1. *Neurology* 2001; 57: 96-100.
- Moretti P, Blazo M, Garcia L, Armstrong D, Lewis RA, Roa B, Scaglia F. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) presenting with ophthalmoplegia and developmental delay in infancy. *Am J Med Genet* 2004; 124: 392-6.
- Munoz E, Rey MJ, Mila M, Cardozo A, Ribalta T, Tolosa E and Ferrer I. Intranuclear inclusions, neuronal loss and CAG mosaicism in two patients with Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 2002; 200: 19-25.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S and Kanazawa I. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1441-8.
- Nozaki K, Onodera O, Takano H and Tsuji S. Amino acid sequences flanking polyglutamine stretches influence their potential for aggregate formation. *Neuroreport*. 2001; 12: 3357-64.
- Onodera Y, Aoki M, Tsuda T, Kato H, Nagata T, Kameya T, Abe K and Itoyama Y. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *J Neurol Sci* 2000; 178: 153-8.
- Ophoff RA, Terwin DT, Vergouwe MN, Vaneijk R, Oefner PJ, Hoffmans MG and Lamerdin JE. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNA1A. *Cell* 1996; 87: 543-552.
- Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS 4th, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL and Detloff PJ. Ectopically

- expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997; 91: 753-63.
- Orozco Diaz G, Nodarse Fleites A, Cordovés Sagaz R and Augurger G. Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology* 1990; 40: 1369-75.
- Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AL, MacCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY. Expansion of na unstable trinucleotide CGA repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 1993; 4: 221-6.
- Orr HT and Zoghbi HY. SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2307-11.
- Pang JT, Giunti P, Chamberlain S, An SF, Vitaliani R, Scaravilli T, Martinian L, Wood NW, Scaravilli F and Ansorge O. Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain* 2002;125: 656-63.
- Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH and Pittman RN. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 1997; 19: 333-44.
- Paulson HL. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 339-345.
- Perutz MF. Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Mol Med* 1995; 1: 718-21.
- Potaman VN, Bissler JJ, Hashem VI, Oussatcheva EA, Lu L, Shlyakhtenko LS, Lyubchenko YL, Matsuura T, Ashizawa T, Leffak M, Benham CJ and Sinden RR. Unpaired structures in SCA10 (ATTCT)_n(AGAAT)_n repeats. *J Mol Biol* 2003; 326: 1095-111.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Starkman S. Anticipation in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet* 1993; 5: 8-10.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X-N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau G, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C and Sahba S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 1996; 14: 269-76.
- Ranum LP, Chung MY, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Ramesar R, Duvick LA, McCall A, Subramony SH and Goldfarb L. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 244-52.
- Ranum LP, Schut LJ, Lundgren JK, Orr HT and Livingston DM. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nat Genet* 1994; 8: 280-4.

- Rea R, Spauschus A, Eunson LH, Hanna MG and Kullmann DM. Variable K(+) channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1. *J Physiol* 2002; 538: 5-23.
- Restituio S, Thompson RM, Eliet J, Raike RS, Riedl M, Charnet P and Gomez CM. The polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia type 6 causes a beta subunit-specific enhanced activation of P/Q-type calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 2000; 20: 6394-403.
- Santos N, Aguiar J, Fernandez J. Molecular diagnosis of a sample of the Cuban population with spinocerebellar ataxia type 2. *Biotechnologia Aplicada* 1999; 16: 219-21.
- Sasaki H, Yabe I and Tashiro K. The hereditary spinocerebellar ataxias in Japan. *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 198-205.
- Scheel H, Tomiuk S and Hofmann K. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2845-52.
- Schmitt I, Evert BO, Khazneh H, Klockgether T and Wuellner U. The human MJD gene: genomic structure and functional characterization of the promoter region. *Gene* 2003; 314: 81-8.
- Schols L, Vieira-Saecker AM, Schols S, Przuntek H, Epplen JT and Riess O. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet*. 1995; 4: 1001-5.
- Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen J and Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 1997; 42: 924-32.
- Sequeiros J and Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds): "Hereditary Ataxias". *Adv Neurol*. 1993; 61: 139-53.
- Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimaraes J and Tanaka H. Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics* 1994; 21: 645-8.
- Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, Nagaki H, Namekawa M, Sasaki H, Nakano I and Nishizawa M. Meiotic instability of the CAG repeats in the SCA6/CACNA1A gene in two Japanese SCA6 families. *J Neurol Sci* 2001; 185: 101-7.
- Shoulson I. Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs. *Science* 1998; 282: 1072-4.
- Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, Botez MI, Teive H, Arruda W, Steiner CE, Pinto-Júnior W, Maciel JA, Jain S, Sack G, Andermann E, Sudarsky L, Rosenberg RN, MacLeod PM, Sequeiros J and Rouleau GA. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidolusian atrophy and Machado-Joseph

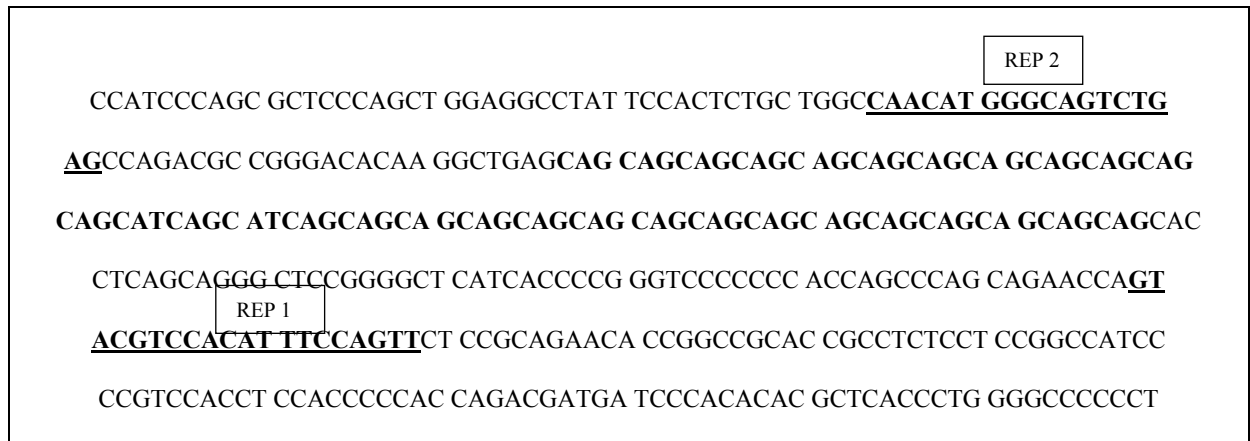
- disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology* 1996; 46: 214-18.
- Sinha KK, Worth PF, Jha DK, Sinha S, Stinton VJ, Davis MB, Wood NW, Sweeney MG, Bhatia KP. Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 448-52.
- Skinner PJ, Koshy BT, Cummings CJ, Klement IA, Helin K, Servadio A, Zoghbi HY and Orr HT. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 1997; 389: 971-4.
- Soong B, Liu R, Wu L, Lu Y, Lee H. Metabolic characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Arch Neurol* 2001; 58: 300-4.
- Steckley JL, Ebers GC, Cader MZ and McLachlan RS. An autosomal dominant disorder with episodic ataxia, vertigo, and tinnitus. *Neurology* 2001; 57: 1499-502.
- Stevanin G, Le Guern E, Ravise N, Chneiweiss H, Durr A, Cancel G, Vignal A, Boch AL, Ruberg M, Penet C, Pothin Y, Lagroua I, Hagenau M, Rancurel M, Weissenbach J, Agid Y and Brice A. A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type I maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 11-20.
- Stevanin G, David G, Abbas N, Dürr A, Holmberg M, Duyckaerts C, Giunti P, Cancel G, Ruberg M, Mandel J-L and Brice A. Spinocerebellar ataxia Type 7 (SCA7). In: Rubinsztein DC and Hayden MR, Editores. *Analysis on triplet repeat disorders*. First Edition. Oxford: BIOS scientific publishers; 1998.
- Stevanin G, Durr A and Brice A. Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 4-18.
- Stevanin G, Bouslam N, Thobois S, Azzedine H, Ravaux L, Boland A, Schalling M, Broussolle E, Durr A and Brice A. Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25) maps to chromosome 2p. *Ann Neurol* 2004; 55: 97-104.
- Strong PN and Brewster BS. Myotonic dystrophy: molecular and cellular consequences of expanded DNA repeats are elusive. *J Inher Met Dis* 1997; 20: 158-70.
- Subramony SH, Schott K, Raike RS, Callahan J, Langford LR, Christova PS, Anderson JH and Gomez CM. Novel CACNA1A mutation causes febrile episodic ataxia with interictal cerebellar deficits. *Ann Neurol* 2003; 54: 725-31.
- Tsai HF, Liu CS, Chen GD, Lin ML, Li C, Chen YY, Wang BT and Hsieh M. Prenatal diagnosis of Machado-Joseph disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3 in Taiwan: early detection of expanded ataxin-3. *J Clin Lab Anal* 2003; 17: 195-200.
- Takahashi J, Fujigasaki H, Iwabuchi K, Bruni AC, Uchihara T, El Hachimi KH, Stevanin G, Durr A, Lebre AS, Trottier Y, de The H, Tanaka J, Hauw JJ, Duyckaerts C and Brice A.

- PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis* 2003; 13: 230-7.
- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimizaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O and Tsuji S. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993; 4: 300-3.
- Tarlac V and Storey E. Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res* 2003; 74: 406-16.
- Tashiro H, Suzuki SO, Hitotsumatsu T and Iwaki T. An autopsy case of spinocerebellar ataxia type 6 with mental symptoms of schizophrenia and dementia. *Clin Neuropathol* 1999; 18: 198-204.
- Twist EC, Casaubon LK, Ruttledge MH, Rao VS, Macleod PM, Radvany J, Zhao Z, Rosenberg RN, Farrer LA and Rouleau GA. Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J Med Genet* 1995; 32: 25-31.
- Van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, Gabreels-Festen A, Praamstra P, Kremer BP, Horstink MW. Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol* 2001; 49: 805-7.
- Van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA and Heutink P. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 191-9.
- Verbeek DS, Schelhaas JH, Ippel EF, Beemer FA, Pearson PL and Sinke RJ. Identification of a novel SCA locus (SCA19) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Hum Genet* 2002; 111: 388-93.
- Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, Dina C, Lemainque A, Vasseur F, Bocquillon G, Devos P, Kocinski C, Marzys C, Destee A and Sablonniere B. A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 2002; 52: 666-70.
- Zoghbi HY, Orr HT, Spinocerebellar Ataxias, In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York, McGraw-Hill, (2001) pp. 5741-5758.
- Zhu S and Gerhard DS. A transcript map of an 800-kb region on human chromosome 11q13, part of the candidate region for SCA5 and BBS1. *Hum Genet* 1998; 103: 674-80.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton D, Amos C, Dobyns W, Subramony SH, Zoghbi H and Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genetics* 1997; 15: 62-8.

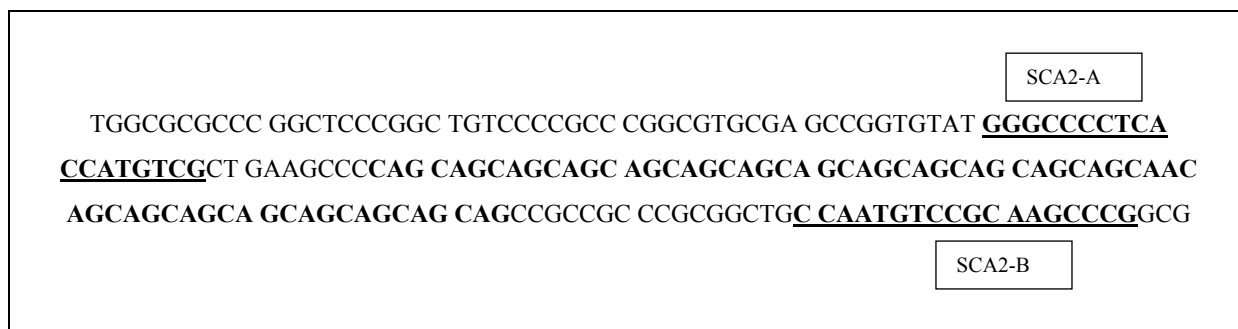
- Zoghbi HY, Pollack MS, Lyons LA, Ferrell RE, Daiger SP and Beaudet AL. Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. *Ann Neurol* 1988; 23: 530-4.
- Zoghbi HY. Spinocerebellar ataxia type 1. *Clin Neurosci* 1995; 3: 5-11.
- Zuhlke C, Dalski A, Hellenbroich Y, Bubel S, Schwinger E and Burk K. Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 204-9.
- Wen FC, Li YH, Tsai HF, Lin CH, Li C, Liu CS, Lii CK, Nukina N and Hsieh M. Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett* 2003; 546: 307-14.
- Willems PJ. Dynamic mutations hit double figures. *Nature Genet* 1994; 8: 213-5.
- Worth PF, Giunti P, Gardner-Thórpe C, Dixon PH, Davis MB and Wood NW. Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 420-26.
- Wullner U. Genes implicated in the pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Drugs Today (Barc)* 2003; 39: 927-37.
- Yakura H, Wakisaka A, Fujimoto S and Itakura K. Hereditary ataxia and HLA genotypes. *N Engl J Med* 1974; 291: 154-5.
- Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S and Tashiro K. A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q13.4-qter. *Ann Neurol* 2000; 48: 156-63.
- Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S and Kanazawa I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis* 2002; 10: 88-99.
- Yue Q, Jen JC, Nelson SF and Baloh RW. Progressive ataxia due to a missense mutation in a Calcium-channel gene. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1078-87.
- Yue S, Serra HG, Zoghbi HY and Orr HT. The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 25-30.

6. Anexos

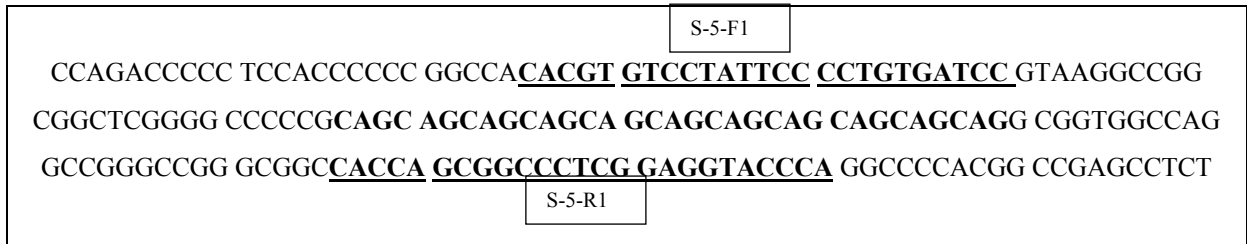
Anexo I - Sequência parcial do gene da SCA1 (*locus* 6p22-p23). (5' → 3')



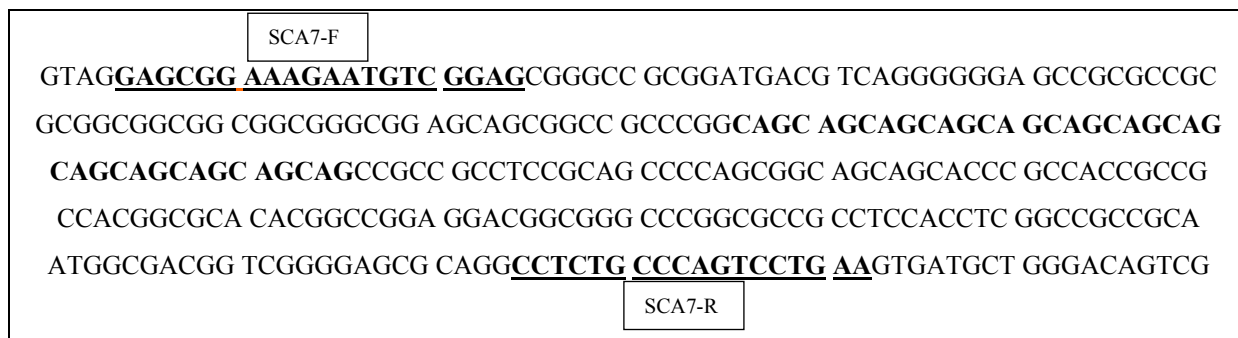
As regiões de anelamento dos primers Rep1 e Rep2 para amplificação gênica do exon que inclui as repetições CAGs encontram-se em negrito e sublinhadas. A repetição CAG (30 repetições, alelo normal) está em negrito. Dentro da sequência repetitiva, neste caso, temos o trinucleotídeo CAT intercalado duas vezes.

Anexo II - Sequência parcial do gene da SCA2 (*locus* 12q23-24.1). (5' → 3')

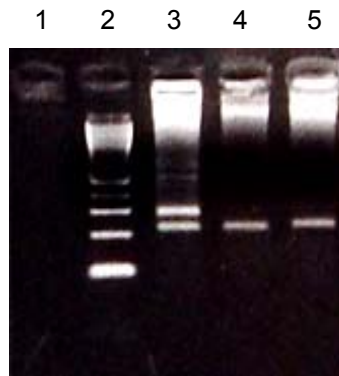
As regiões de anelamento dos primers SCA2-A e SCA2-B para amplificação gênica do exon que inclui as repetições CAGs encontram-se em negrito e sublinhadas. A repetição CAG (22 repetições, alelo normal) está em negrito. Dentro da sequência repetitiva, neste caso, temos o trinucleotídeo CAA intercalado uma vez.

Anexo III - Seqüência parcial do gene da SCA6 (*locus* 19p13). (5' → 3')

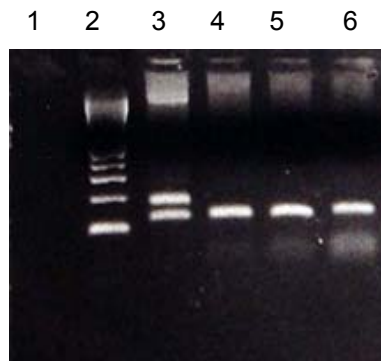
As regiões de anelamento dos primers S-5-F1 e S-5-R1 para amplificação gênica do exon que inclui as repetições CAGs encontram-se em negrito e sublinhadas. A repetição CAG (11 repetições, alelo normal) está em negrito.

Anexo IV - Sequência parcial do gene da SCA7 (*locus* 3p12-p12.1). (5' → 3')

As regiões de anelamento dos primers SCA7-F e SCA7-R para amplificação gênica do exon que inclui as repetições CAGs encontram-se em negrito e sublinhadas. A repetição CAG (13 repetições, alelo normal) está em negrito.

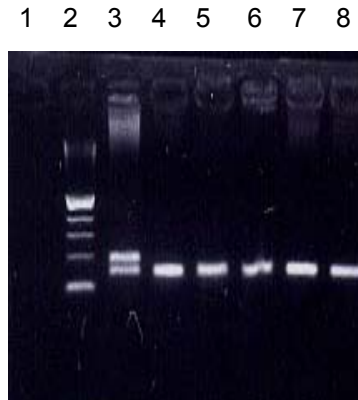
Anexo V - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA1.

Amplificação por PCR da região de interesse do gene SCA1 analisada em gel de agarose 2% (p/v). Coluna 1: controle negativo; coluna 2: marcador de 100pb; coluna 3: amostra de DNA de um paciente apresentando um alelo expandido (paciente SCA1 positivo); colunas 4 e 5: amostras de DNA de pacientes com alelos apresentando repetições CAG dentro da faixa normal.

Anexo VI - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA2.

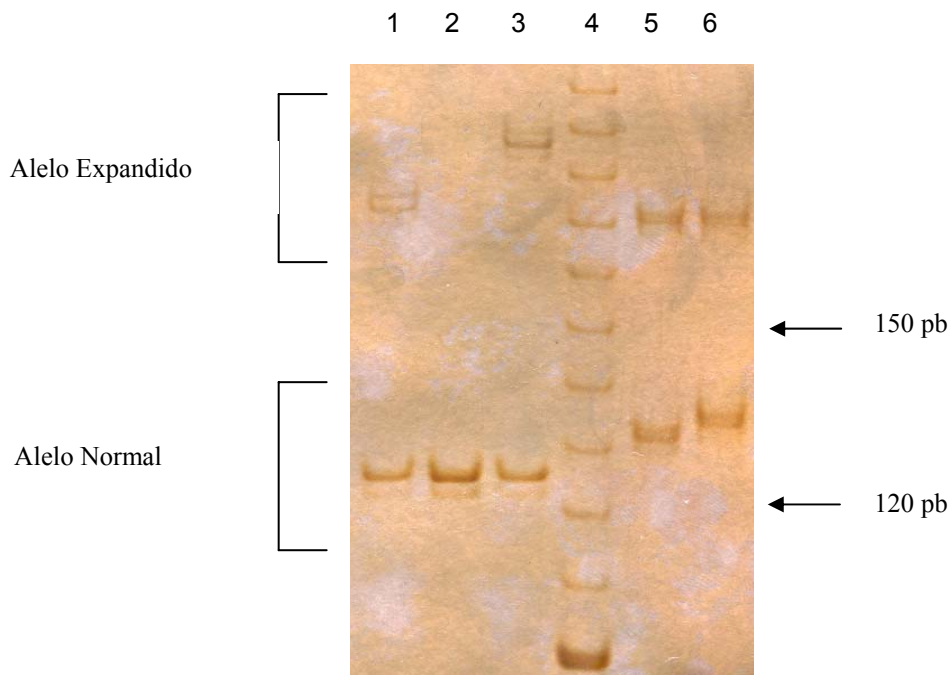
Amplificação por PCR da região de interesse do gene SCA2 analisada em gel de agarose 2% (p/v). Coluna 1: controle negativo; coluna 2: marcador de 100pb; coluna 3: amostra de DNA de um paciente apresentando um alelo expandido (paciente SCA2 positivo); colunas 4, 5, e 6: amostras de DNA de pacientes com alelos apresentando repetições CAG dentro da faixa normal.

Anexo VII - Detecção de alelos normais e expandidos na SCA6.



Amplificação por PCR da região de interesse do gene SCA6 analisada em gel de agarose 2% (p/v). Coluna 1: controle negativo; coluna 2: marcador de 100pb; coluna 3: amostra de DNA de um paciente apresentando um alelo expandido (paciente SCA6 positivo); colunas 4, 5, 6, 7, e 8: amostras de DNA de pacientes com alelos apresentando repetições CAG dentro da faixa normal.

Anexo VIII – Determinação do tamanho dos alelos em casos SCA2 e SCA6.



Determinação do tamanho dos alelos em casos de SCA2 e SCA6 analisados em gel de poliacrilamida 12.5% (p/v). Coluna 1: paciente SCA2 apresentando um fragmento de 126pb (22 repetições CAG – alelo normal) e um fragmento de 174pb (38 repetições CAG – alelo expandido); coluna 2: indivíduo apresentando um fragmento de 126pb (22 repetições CAG – dois alelos normais); coluna 3: paciente SCA2 apresentando um fragmento de 126pb (22 repetições CAG – alelo normal) e um fragmento de 188pb (42 repetições CAG – alelo expandido); coluna 4: marcador de 10pb; coluna 5: paciente SCA6 apresentando um fragmento de 134pb (11 repetições CAG – alelo normal) e um fragmento de 173pb (24 repetições CAG – alelo expandido); coluna 6: paciente SCA6 apresentando um fragmento de 137pb (12 repetições CAG – alelo normal) e um fragmento de 173pb (24 repetições CAG – alelo expandido).