

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

Fecundidade e Valor adaptativo na Doença de Machado Joseph

PRISCILLA RIBEIRO PRESTES

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

Orientadora: Laura Bannach Jardim

Porto Alegre, Março de 2007.

Financiamento

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – através de bolsa de estudos fornecida a Priscilla Ribeiro Prestes.

O financiamento para a aquisição de fotocópias dos questionários e demais documentos que se fizeram necessários ao longo do desenvolvimento da pesquisa foi fornecido pelo FIPE – HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Houve, ainda, a liberação de uma linha telefônica do HCPA para a investigação também fornecida pelo FIPE – HCPA. Essa linha era dotada de uma senha para garantir que o pagamento de sua conta estava restrito ao projeto.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço à Professora Dra. Laura Bannach Jardim por estar sempre presente durante o andamento de toda a pesquisa, por sua disposição em ensinar e sua prestatividade ao ajudar. Muito obrigada por ter confiado em mim e acreditado na minha capacidade, quando aceitou ser minha orientadora mesmo sem me conhecer. Creio que sou uma pessoa com muita sorte por termos nos escolhido para o desenvolvimento deste projeto.

À Professora Lavínia Schüller-Faccini, por ter me apresentado à Professora Laura. Sou muito grata também pelos conselhos dados em diversas conversas informais.

Aos professores do Departamento de Genética, Dr. Aldo Mendeller de Araújo, Dr. Claiton H. D. Bau, Dr. Francisco M. Salzano, Dra. Mara Helena Hutz e Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, que igualmente fizeram sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Professor Alberto Abeche pela ajuda na busca das referências bibliográficas sobre menarca e menopausa.

Agradeço com muito apreço aos pacientes e seus familiares que concordaram em participar deste estudo. Sempre muito solícitos nunca se cansavam de fornecer informações e quando necessário, buscavam outros familiares para que seus dados fossem corretamente avaliados.

Ao secretário deste Programa de Pós-Graduação, Elmo J. A. Cardoso por sanar todas as dúvidas que surgiram ao longo desses dois anos de mestrado e nunca se cansar na busca de soluções para eventuais problemas.

Às amigas e colegas de mestrado, Deise C. Friedrich, Carolina R. Franco, Francine Z. C. Marques, Fernanda S. Spies e Vanessa E. Emmel que fizeram com que estes dois anos fossem inigualáveis. Por todas as discussões e argumentações que tornaram as aulas mais agradáveis e o nosso trabalho mais rico e satisfatório; pelas confraternizações e outros eventos, que deixaram os dias e as noites mais alegres.

Aos demais colegas de mestrado e do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que compartilharam diversos momentos ao longo destes dois anos

de muito estudo e dedicação.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional. Obrigada pelas revisões, sugestões, ajudas e incondicional companheirismo.

Finalmente agradeço às pessoas mais importantes na minha vida, meus pais Agnelo e Jane e minha irmã Roberta. Por sempre acreditarem que o melhor a fazer é estudar e incentivarem as minhas escolhas e por nunca duvidarem da importância do caminho que eu escolhi seguir. Obrigado pelas inúmeras tentativas em entender o meu trabalho, mesmo após incessantes explicações, sem nunca deixar que o cansaço interferisse.

Aos que direta ou indiretamente auxiliaram para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
1. Resumo	6
2. Abstract	8
3. Introdução	
3.1. Sobre a Doença de Machado-Joseph	10
3.2. O que é o valor adaptativo de um fenótipo (ou genótipo)	15
4. Objetivos	17
5. Artigo	18
6. Resultados e Discussão	43
7. Algumas especulações	52
8. Conclusões	55
9. Referências Bibliográficas	57
10. Fontes on-line	61
11. Anexos	62

1. Resumo

A Doença de Machado-Joseph (DMJ) ou Ataxia Espinocerebelar 3 (SCA3) é uma doença neurodegenerativa, herdada de modo autossômico dominante. Está associada a uma expansão (CAG)_n na região codificadora do gene *MJD1*, localizado na região cromossômica 14q32.1. A idade de início dos sintomas, entre pacientes brasileiros, ocorre em média aos 32 (± 12) anos, geralmente após o início da vida reprodutiva; deste modo, a maioria dos portadores tem sua prole antes de manifestarem os sintomas da doença.

Para avaliar a capacidade de um determinado genótipo em produzir descendência, criou-se o conceito de valor adaptativo genético, que é uma medida simples de sucesso reprodutivo. Quanto maior a prole de um genótipo, mais fácil seria a sua manutenção no *pool* gênico da população.

O objetivo deste trabalho foi analisar o valor adaptativo genético das famílias com DMJ e compará-lo com dados obtidos a partir do Censo de 2000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

A amostra estudada compreendeu 828 indivíduos (415 afetados) de 82 famílias com diagnóstico molecular de DMJ, originárias do Rio Grande do Sul (RS), com história reprodutiva conhecida e nascidos a partir de 1903. A prevalência estimada da doença foi de 3,5:100.000 habitantes na nossa região.

O número médio de filhos das mulheres da população do RS e das mulheres com DMJ, em 2000, foi 1,90 e $2,93 \pm 2,3$, respectivamente, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Se o valor adaptativo da população for considerado 1,0, o da DMJ seria de 1,54. Entretanto, a melhor alternativa para analisar o valor adaptativo é a que avalia o número médio de filhos das mulheres eméritas – com mais de 45 anos ou já falecidas – pois essas já completaram seu período reprodutivo. Embora o número médio de filhos das eméritas com DMJ fosse de $3,89 \pm 2,52$ e o das mulheres eméritas da população geral fosse de 3,52 filhos, essa diferença não foi significativa.

Ao contrário, quando se comparou o número médio de filhos das mulheres afetadas com o de suas parentes assintomáticas, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$): tanto na comparação independentemente da idade – $2,93 \pm 2,3$ e $1,66 \pm 1,6$, respectivamente – quanto entre as mulheres eméritas – $3,89 \pm 2,5$ e $2,68 \pm 2,0$,

respectivamente. Se o valor adaptativo das consangüíneas assintomáticas, aos 45 anos, for considerado 1,0, o das portadoras de DMJ, aos 45 anos, seria de 1,45. Esses resultados demonstram um aumento no valor adaptativo genético dos pacientes com DMJ, tanto quando comparados com a população do estado do RS, como com seus parentes assintomáticos.

A ausência de significância estatística na comparação entre as mulheres eméritas com DMJ e as da população pode ter decorrido do pequeno tamanho amostral no grupo de doentes (n=112); ou pode indicar um aumento da fecundidade no início da vida reprodutiva das DMJ, característica que desapareceria posteriormente.

O aumento da fecundidade encontrado em pacientes com DMJ foi semelhante ao já descrito anteriormente nas portadoras de Doença de Huntington (DH) e na Ataxia Espinocerebelar 1 (SCA1), também doenças neurodegenerativas, quando foram comparadas às suas parentes não portadoras. Especulamos a possibilidade de haver pleiotropismo antagonístico nos genes envolvidos por essas mutações. Esse conceito sugere que um gene pode conferir efeitos benéficos no início da vida (desenvolvimento e maturação sexual rápidos, com aumento da fecundidade e do valor adaptativo do indivíduo que o porta), trazendo efeitos deletérios em fases mais tardias (como os sintomas de uma doença neurodegenerativa e a apoptose neuronal).

Em conclusão, a presença da mutação DMJ conferiu um valor adaptativo aumentado às suas portadoras eméritas, quando comparadas às suas parentes não portadoras eméritas, a mesma tendência aparecendo nas comparações feitas com a população geral.

2. Abstract

Machado-Joseph Disease (MJD), also known as Spinocerebellar Ataxia 3 (SCA3) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder. MJD is associated to a (CAG)_n expansion at the *MJD1* gene coding region, located at chromosome region 14q32.1. The average age of onset is 32 (± 12) years among Brazilian patients, usually after the start of their reproductive period, so that most carriers have their offspring before the disease starts.

In order to evaluate the capacity of a determined genotype in producing descendants, the genetic fitness concept was created, which is a simple measure of reproductive success. The larger the offspring of a genotype, the easier it would be to maintain itself in the genic pool of a certain population.

The aim of the present work was to analyze the genetic fitness of MJD families and to compare it to data obtained from the 2000 Brazilian Census, provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE).

824 individuals (415 affected) were studied, belonging to 82 families with a molecular diagnosis of MJD, and proceeding from the state of Rio Grande do Sul (RS). Only individuals with known reproductive history, and born after 1903 were included.

From the obtained data, the disease prevalence was estimated at 3.5:100,000 inhabitants in our region.

The average number of children (NC) from the women's population in RS and MJD families, in 2000, were of 1.90 and 2.93 ± 2.3 , respectively, with a statistically significant difference ($p < 0.001$). If the population fitness is considered as 1,0, MJD fitness would be 1.54. However, the best alternative to analyze fitness is by evaluating the average NC from emeritus women, with more than 45 years or deceased: in other words, from individuals who have already completed their reproductive period. Although the average NC of emeritus women with MJD was 3.89 ± 2.52 and of emeritus women from the population was 3.52 children, this difference was not significant.

In contrast, when the mean NC from affected women was compared with the one of their asymptomatic relatives, a statistically significant difference was found ($p < 0.001$), such as in the comparison independent of age: 2.93 ± 2.3 and 1.66 ± 1.6 , respectively. Among

the emeritus women, the average NC were of 3.89 ± 2.5 and 2.68 ± 2.0 , in affected and asymptomatic groups, respectively ($p < 0.001$). If the fitness of the asymptomatic relatives, at 45 years, is considered as 1.0, that of MJD carriers, at the same age, would be 1.45. These results showed an increase in genetic fitness of MJD patients, when compared with their asymptomatic relatives.

The absence of statistical significance in a comparison between emeritus, MJD and population women, could have occurred due to the smallness of the sample size from the affected group ($n=112$), or it could indicate an increased fecundity at the beginning of MJD reproductive life, a characteristic that would disappear later.

The increased fitness found in MJD patients was similar to that described before in Huntington Disease (HD) and Spinocerebellar Ataxia 1 (SCA1) carrier women, also neurodegenerative disorders, when compared to their non-carrier relatives. We speculate the possibility of antagonistic pleiotropism acting in genes with these mutations. This concept suggests that a gene can, at the beginning of life, confer benefits (fast development and sexual maturation, with a heightened fecundity and fitness of the affected individual), and still bring deleterious effects in more delayed phases (as the symptoms of a neurodegenerative disease and neuronal apoptosis).

In conclusion, the presence of the MJD mutation conferred an increased fitness to the emeritus carriers, when compared to their non-carrier relatives, and the same trend appeared in the comparisons made with the population of our State.

3. Introdução

3.1. Sobre a Doença de Machado-Joseph

3.1.1. Aspectos gerais

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma moléstia degenerativa do sistema nervoso central, herdada de modo autossômico dominante (Nakano *et al*, 1972; Woods & Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al*, 1976). O gene associado à DMJ localiza-se na região cromossômica 14q32.1 (Takiyama *et al*, 1993) e contém um motivo repetitivo CAG na região 5' da seqüência codificadora: essa seqüência está expandida nos pacientes com DMJ (Kawaguchi *et al*, 1994). Os alelos normais contêm de 12 a 40 repetições, enquanto os alelos expandidos contêm de 54 a 86 repetições (Bauer *et al*, 2005).

Trata-se de uma doença muito incapacitante: em geral, com o passar do tempo, os pacientes tornam-se confinados a uma cadeira de rodas ou mesmo ao leito. Essas pessoas perdem a capacidade de se comunicar verbalmente e necessitam de ajuda para todas suas atividades diárias. Apesar disso, os doentes conservam sempre as suas faculdades intelectuais. A apresentação da doença dá-se na vida adulta, com grande variação na idade de início: a média (\pm desvio padrão) é de 37 (± 14) anos, entre pacientes de ascendência portuguesa e açoriana (Sequeiros & Coutinho, 1993), e de 32 (± 12) anos, entre pacientes brasileiros (Jardim *et al*, 2001a). O início da doença, porém, já foi descrito desde os 5 até os 73 anos. A penetrância é alta, mas incompleta, pois existem raros portadores da mutação ainda assintomáticos aos 90 anos. O tempo médio de sobrevivência depois da doença se iniciar é de 14 a 17 anos (Sequeiros & Coutinho, 1993; Jardim *et al*, 2001a).

Além de ser fatal e incapacitante, a forma da herança da DMJ - autossômica dominante – faz com que, comumente, muitos doentes coexistam dentro de uma mesma família, e em diversas gerações. Isso faz com que esse destino trágico faça parte da crônica familiar, e que o mesmo possível destino pare como uma permanente ameaça sobre os mais jovens, ainda assintomáticos. Além disso, o grande número de doentes por família ocasiona um empobrecimento financeiro indireto destes indivíduos, o que resulta em ainda maior morbidade e aflição dos envolvidos (Paúl, 1997).

A DMJ tem uma incidência particularmente alta nas populações de origem portuguesa e açoriana (Figura 1). A população do Rio Grande do Sul, que é a de nosso

interesse, recebeu um significativo aporte de açorianos em meados do século XVIII, sendo esse o primeiro grupo étnico europeu a efetivamente se assentar. Entre 1748 e 1752, ao redor de 5.000 açorianos foram trazidos ao sul do Brasil – em especial, para a Ilha de Santa Catarina – para ocupar o território disputado pelas coroas Portuguesa e Espanhola. Um grupo deles foi trazido e deixado onde hoje está a atual Porto Alegre: o seu povoamento deu origem à atual capital do Estado. De Porto Alegre, muitos foram para o interior. Calcula-se que a sua chegada, no século XVIII, triplicou a então população do território que hoje corresponde ao Rio Grande do Sul (Jardim *et al*, 2001b).

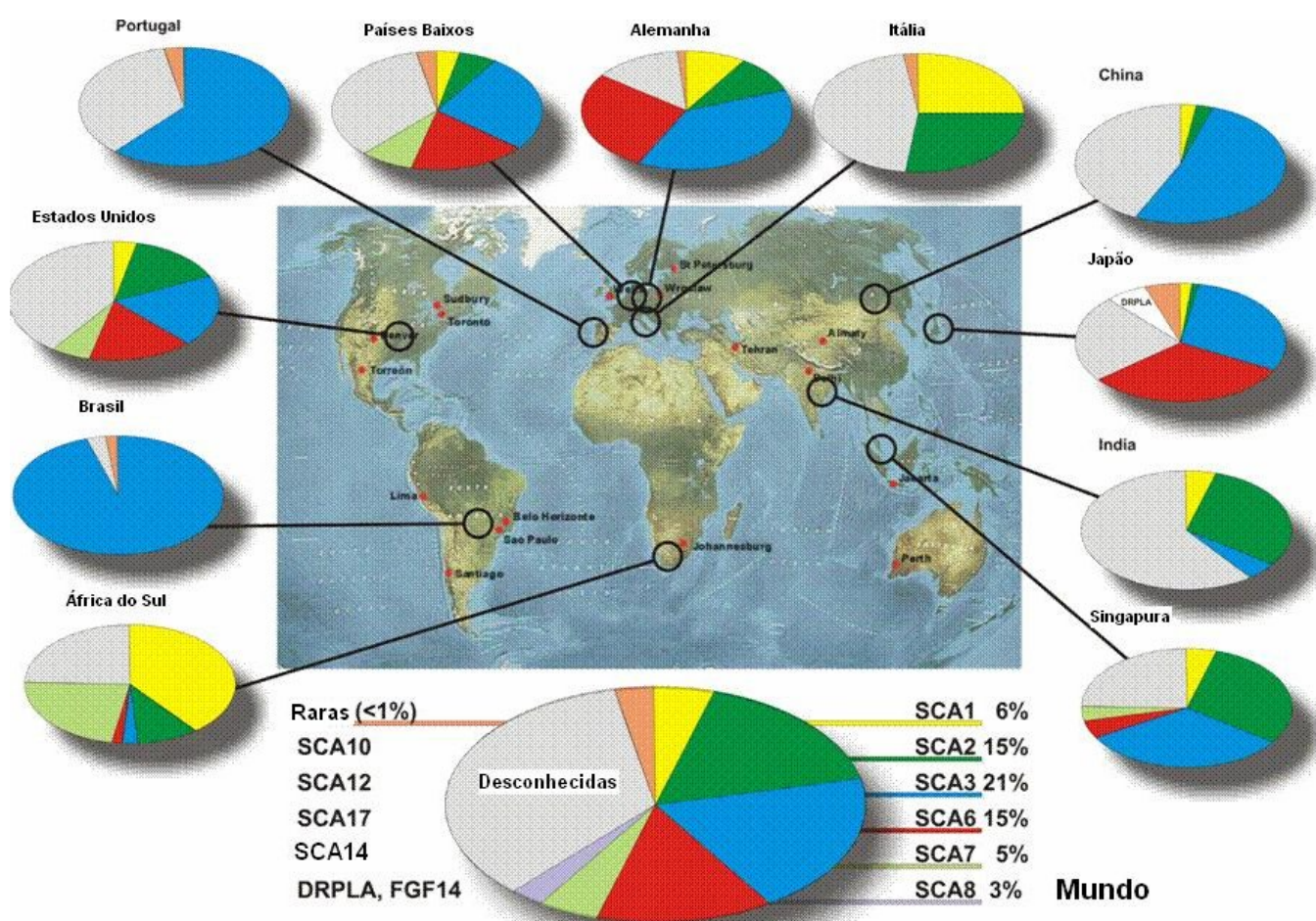


Figura 1: Prevalência das ataxias espinocerebelares em diferentes países e um panorama mundial. (modificada de www.geneclinics.org, 2007a)

A prevalência da DMJ nos Açores, onde representa um verdadeiro problema de saúde pública é de 1:2309 habitantes nas ilhas de Açores e na Ilha de Flores a prevalência é ainda maior, de 1:103 habitantes (Lima *et al*, 1997). Os dados atuais sobre a frequência da DMJ, no Rio Grande do Sul, não permitem mais do que uma subestimativa. Conhecemos aproximadamente 300 doentes de 85 famílias com diagnóstico molecular de DMJ. Com esses dados, estima-se que a DMJ atinja 1,8:100.000 habitantes (Jardim *et al*, 2001b).

3.1.2 Genética da doença de Machado-Joseph

A DMJ é transmitida de modo autossômico dominante. Como já se disse, a penetrância da DMJ é muito elevada, mas incompleta: ela é estimada em 98% (Sequeiros, 1996). Há alguns casos de portadores comprovados que permaneceram assintomáticos mesmo aos 90 anos de idade. Assim, na DMJ, a distinção entre penetrância incompleta e expressividade variável dependerá da sobrevivência dos heterozigotos, pois houve casos nos quais a doença se iniciou aos 73 anos (Sequeiros, 1996). Não existem diferenças importantes entre os sexos nessa doença. Homens e mulheres tendem a ser afetados nas mesmas proporções, com a mesma gravidade e com distribuições de idade muito semelhantes (Dürr *et al*, 1995; DeStefano *et al*, 1995).

O risco teórico de transmissão à prole, nas doenças autossômicas dominantes, é de 50%. Entretanto, a observação clínica sugere que os gametas que trazem a mutação no gene *MJD1* são de alguma maneira, favorecidos (Ikeuchi *et al*, 1996; Iughetti *et al*, 1998). A observação de irmandades com mais de 50 anos, por exemplo, revelou que 68% dos indivíduos eram afetados, uma proporção muito maior do que a esperada (Jardim *et al*, 2001a). Esse fenômeno poderia agir como uma força seletiva agindo *a favor* da permanência do alelo DMJ na população.

Um outro fenômeno genético que caracteriza muito fortemente essa doença é a “antecipação” (Figura 2). Antecipação significa “o aparecimento progressivamente mais precoce e com intensidade aumentada de uma doença em gerações sucessivas” (Thompson & Thompson, 1993). Na DMJ, a antecipação foi observada em muitos pares de genitor/prole, os filhos adoecendo oito a dez anos antes do que os seus pais (Maruyama *et al*, 1995; Harper, 1997; Iughetti *et al*, 1998; Jardim *et al*, 2001a). As descobertas moleculares sobre os segmentos repetitivos e expandidos CAG vieram a demonstrar que

esse fenômeno tem base biológica. Sabe-se que existe uma tendência de o número de repetições se modificar no gene mutante (às vezes diminuindo, mas mais frequentemente aumentando) ao passar de uma geração para outra, na meiose (Maciel *et al*, 1995; Maruyama *et al*, 1995). Se a mutação se torna “mais patogênica” (maior), o efeito fenotípico será o de aumentar a gravidade do quadro, e entre outras coisas, de tornar mais precoce o seu início. Para a DMJ, a antecipação funcionaria como uma força seletiva agindo *contra* a permanência do alelo mutante na população.

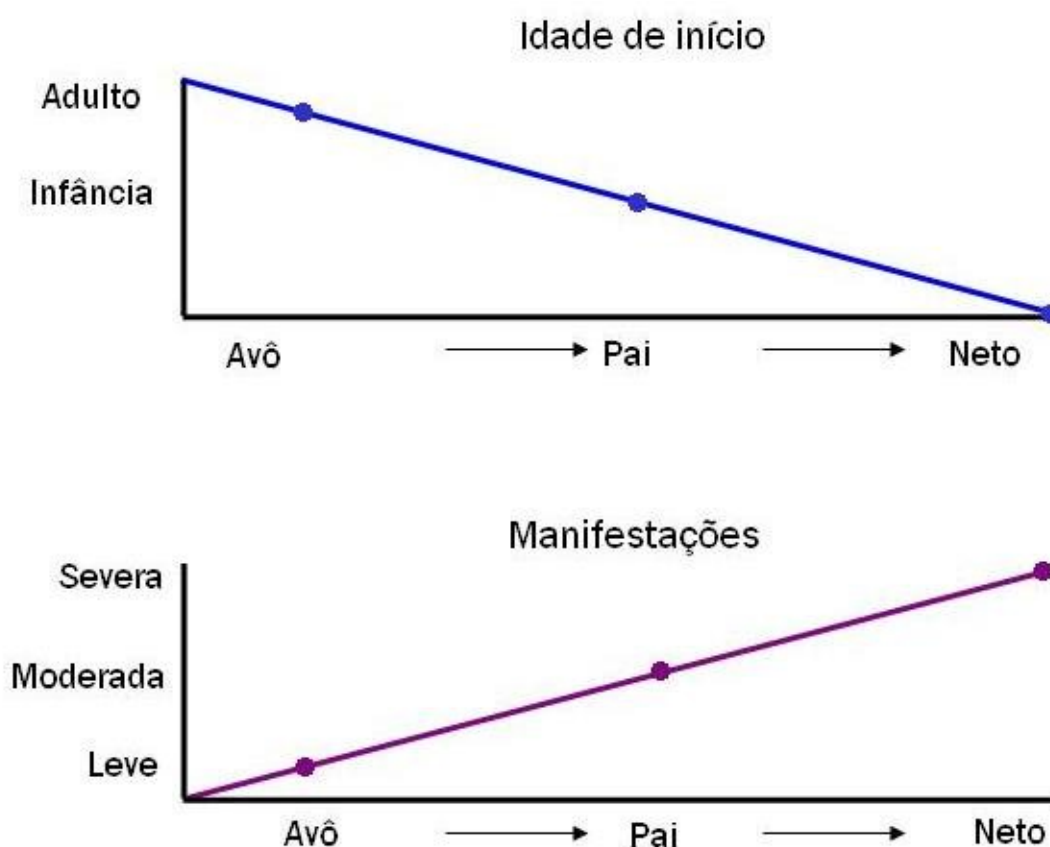


Figura 2: Fenômeno da antecipação, característica de algumas doenças genéticas, onde as sucessivas gerações tendem a apresentar os sintomas precocemente e/ou de maneira mais severa. (modificada de www.geneclinics.org, 2007b)

Uma das características específicas das mutações devidas à expansão de seqüências repetitivas de bases nucleotídicas é o fato de a expansão ser instável durante as divisões celulares, sejam elas mitóticas ou meióticas. Por isso, esse tipo de mutação é também chamado de *mutação dinâmica*. A instabilidade meiótica foi observada em inúmeras

transmissões de genitor-para-prole e explica, em parte, tanto a antecipação como a expressividade variável (Harper, 1997). Há uma correlação negativa entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início da doença. Essa correlação varia entre $-0,68$ e $-0,87$, na DMJ (Maciel *et al*, 1995; Maruyama *et al*, 1995).

O mosaïcismo somático do trato (CAG)_n foi demonstrado não só na DMJ (Lopes-Cendes *et al*, 1996), mas também na Ataxia Espinocerebelar Tipo 1 (SCA1), na Atrofia Dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) e na Doença de Huntington (HD) (Maciel *et al*, 1997). Esse mosaïcismo pode ser atribuído a dois períodos mitóticos diferentes. O primeiro seria o da embriogênese e o segundo, o das divisões celulares da glia durante a vida fetal e pós-uterina. Não se sabe o quanto cada uma das possibilidades contribui com o que foi observado. Em todo caso, o mosaïcismo visto entre as diferentes regiões do SNC segue um mesmo padrão entre todas as doenças devidas à expansão CAG estudadas e não se associa aos padrões patológicos específicos de cada uma delas (Lopes-Cendes *et al*, 1996; Maciel *et al*, 1997). Ou seja, as regiões encefálicas com maiores (CAG)_n não foram sempre as primeiras a serem afetadas no processo da doença.

3.1.3 A transmissão não-mendeliana do alelo mutante na DMJ

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

3.2. O que é o valor adaptativo de um fenótipo (ou genótipo)

A frequência de um alelo permanece, em tese, estável na população, a não ser que alguma influência externa a perturbe. Essas influências seriam: uma nova mutação; a seleção natural; migrações; e flutuações devidas ao acaso. Examinemos a força da seleção natural sobre a frequência de um alelo deletério, como o é o da DMJ.

A seleção natural é reconhecida, desde Charles Darwin, como sendo a maior força determinante da evolução. Faz parte dos paradigmas da teoria da evolução o conceito do valor adaptativo biológico, ou aptidão biológica, e, mais especificamente, o valor adaptativo de um fenótipo – ou a aptidão de um fenótipo. O valor adaptativo de um fenótipo é uma medida simples de sucesso reprodutivo, onde aqueles que sobrevivem e produzem maior número de prole capaz de se reproduzir, garantem a manutenção do pool gênico da sua população (Stine, 1989). Em 1997, Vogel e Motulsky definiram o valor adaptativo de um genótipo como a performance reprodutiva de um certo genótipo, ou seja, a eficiência em produzir descendência. Este é um conceito inclusive numérico, ou propenso ao tratamento aritmético ou estatístico.

A maior parte das doenças dominantes reduz as taxas médias de reprodução dos seus portadores. Isso acontece porque a mutação modifica o fenótipo do portador, reduzindo ou impedindo a sua reprodução – seja por impedi-la fisicamente, seja por reduzir a sobrevivência do portador, seja por torná-lo sexualmente menos interessante para os seus parceiros. Em todo o caso, o portador de uma doença dominante que o afete de alguma dessas maneiras terá menos filhos do que o esperado. Haverá, portanto, uma perda da carga genética populacional (desse particular genótipo) em cada geração sucessiva, em uma proporção que dependerá da desvantagem seletiva dos envolvidos. Haverá uma “seleção contra” os heterozigotos, ou uma desvantagem seletiva dos mesmos.

Por outro lado, sabe-se que às vezes a seleção age “a favor dos heterozigotos”. Isso se dá se o estado heterozigótico confere alguma vantagem ao portador. Exemplos dessa força não são muitos. Em especial, lembramos o papel das doenças infecciosas, as quais podem revelar um efeito benéfico (de proteção contra a infecção) de um determinado alelo mutante, até então visto como danoso. O exemplo seria a seleção favorável do traço falciforme na presença de uma malária endêmica.

Assim, poderíamos prever que o valor adaptativo do genótipo heterozigoto para a DMJ – a capacidade de os portadores deixarem descendência – seria menor do que o dos indivíduos normais. Afinal, a DMJ é uma doença incapacitante, na qual ainda acontece a antecipação, tirando a capacidade reprodutiva dos afetados à medida que as gerações se sucedem.

Se acontecesse o contrário – uma capacidade maior do que a esperada, de os portadores da DMJ deixarem descendência – estaríamos perante um valor adaptativo genético aumentado, para o qual deveríamos buscar uma explicação.

Aqui devemos distinguir dois fenômenos. Já se disse, acima, que na DMJ a transmissão do gene mutante para a prole é maior do que o esperado. A explicação teórica até hoje mais levantada diz respeito à seleção gamética. O termo “seleção gamética” é atribuído às conseqüências decorrentes de alguns gametas terem chances maiores de fertilização do que outros. Muitos autores já mencionaram a possibilidade de o alelo expandido, mutante para a DMJ, conferir uma vantagem para o gameta que o portar. Entretanto, a seleção gamética é apenas um aspecto do problema.

O outro aspecto, o valor adaptativo do genótipo DMJ, ainda resta por ser explicado. Não sabemos se esse valor adaptativo, em seu *sensu stricto*, estará ou não alterado. Ou seja: se os portadores da DMJ se reproduzem mais ou menos do que a população geral.

4. Objetivos

Geral

Em uma condição onde impera uma forte antecipação, o objetivo maior do trabalho será verificar se a prevalência alta da DMJ poderia estar relacionada com um valor adaptativo genético maior no grupo de doentes do que na população.

Específicos

- relacionar o sexo dos portadores de DMJ com a fecundidade;
- avaliar a idade de início da DMJ e a fecundidade (se só os indivíduos com idade de início particularmente tardia fossem capazes de se reproduzir, poderíamos estar sempre colhendo amostras enviesadas – interpretação clássica da antecipação).
- e estimar o número de afetados vivos e o número de indivíduos em risco para a DMJ, no Rio Grande do Sul, através da atualização dos heredogramas das (ao menos) 85 famílias identificadas até 2004 e catalogadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5. Artigo

Artigo científico a ser submetido à revista *Annals of Human Genetics*.

Machado-Joseph Disease enhances genetic fitness: a comparison between affected *versus* unaffected relatives and the general population

P.R. Prestes¹, M.L. Saraiva-Pereira^{1,2,4} and L.B. Jardim^{1,3,4}

Departments of ¹ Genetics and Molecular Biology, ² Biochemistry and ³ Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and ⁴ Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Corresponding author:

Laura B. Jardim

Medical Genetics Service

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90.035-903 Porto Alegre, Brazil

phone: + 55 51 2101 8011

fax: + 55 51 2101 8010

e-mail: ljardim@hcpa.ufrgs.br

Running head: **Machado-Joseph Disease enhances genetic fitness**

Key words: genetic fitness; fertility; Machado-Joseph Disease; polyglutamine diseases; spinocerebellar ataxias.

SUMMARY

Background: Machado-Joseph Disease (MJD), a spinocerebellar ataxia related to an expansion of a CAG tract, has already been related to anticipation and meiotic drive.

Fitness of MJD carriers was rarely studied. **Objective:** To analyze the genetic fitness of MJD patients, comparing them to their unaffected relatives and to the population from

where they originated. **Subjects and methods:** 182 informants, belonging to 82 MJD families, agreed to participate in the study either by means of personal interviews or

telephone calls. Informants supplied data about 824 patients. Number of children (NC),

gender, age, school attainment, menarche and menopause were compared between general and emeritus (older than 45 years of age or deceased) groups. **Results:** Mean NC of the

women population and of MJD patients were respectively 1.90 and 2.93 ± 2.3 ($p = 0.001$).

The NC of women younger than 45 years was 1.12 in the general population and 1.95

($p < 0.001$) in the MJD population, and the NC of emeritus women was 3.52 in the general

population and 3.89 in the MJD population (ns). Comparisons within families showed

larger differences: The NC of unaffected and affected emeritus MJD women were

respectively 2.89 and 3.84 ($p = 0.007$). Affected MJD women had earlier mean ages at the

delivery of their first child and menopause ($p < 0.0001$ and 0.005 , respectively). Among

affected women, CAG tract was inversely correlated to the NC ($r = -0.281$, $p < 0.0001$).

Conclusion: Machado-Joseph disease enhances the fitness of its carriers, and this

phenomenon seems to have a biological basis. If the fitness of emeritus unaffected MJD

women is 1.0, the fitness of affected women would be 1.32.

INTRODUCTION

Machado-Joseph Disease (MJD or SCA 3), a spinocerebellar ataxia of adulthood, is related to an expansion of a CAG tract at the *MJD1* locus located at 14q32.1 above the threshold of about 54-86 repeats (Takiyama *et al*, 1995, Kawaguchi *et al*, 1994, Bauer *et al*, 2005). The expanded allele is dominant, and there is an important correlation between repeat amplification and symptom severity in affected individuals. Since the disease usually starts after reproductive age, most affected individuals have children before knowing their genetic status. Predictive testing is available, but is generally used by a minority of people at risk (Paúl, 1997).

A worldwide prevalence estimate of spinocerebellar ataxias (SCA) in general is about 3:100,000; MJD would account for 21% of the cases (Schöls *et al*, 2004). MJD comprises 92% of the South Brazilian SCA families and it has an estimated prevalence of 1.8:100,000 inhabitants (Jardim *et al*, 2001).

Among selective forces influencing the prevalence of MJD, at least three deserve investigation: anticipation, meiotic drive, and genetic fitness.

Anticipation, which is explained by a tendency for repeats to expand during vertical transmission (particularly in paternal transmission) and by the age of onset to be inversely correlated to repeat length, is a well-known phenomenon in MJD (Maciel *et al*, 1995). Anticipation is expected to produce a strong negative selection against the expanded allele.

As for meiotic drive, clinical observations and single sperm analysis of the CAG repeats showed the existence of a segregation distortion favoring the expanded allele (Ikeuchi *et al*, 1996; Iughetti *et al*, 1998; Takiyama *et al*, 1995). The advantage assigned to gametes

may be acting in fertilization or in a post-zygotic phase (Leeflang *et al*, 1996) and would produce a positive selection in favor of the expanded allele.

To our knowledge, fitness has rarely been studied in MJD. Investigations have been limited to within family comparisons (Silva *et al*, 1997). The objective of the present study was to analyze the genetic fitness of MJD patients and compare these results with those found in the population from which they originated.

MATERIALS AND METHODS

The present study was approved by the local ethics committee. After consent, an interview was performed with patients and their relatives aged 18 or over whose families had a molecular diagnosis of MJD, as well as follow-up visits to our Institution. All cases belonged to MJD registered families. All informants were interviewed in person. Each informant provided data on his/her relatives following a structured questionnaire about each family member. Only individuals with entirely known reproductive history were included. Data was double-checked by a second (or a third, or more) informants of the same family: only concordant information was included. Individuals born before 1903 were not included in the study. Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil, was the geographical origin of all families; all studied cases were carriers of the A-C-A haplotype (Bressel, 2003).

Results were also compared to those found by the 2000 Brazilian Demographic Census (IBGE, 2003). To avoid data duplication, the Census only registered the number of

women's children. Therefore, only the results of female MJD patients were compared to data of the population. All data were adjusted to the year 2000.

Among MJD family members, associations were sought between the number of children (NC) and the following individual characteristics: age, sex, genetic status (symptomatic or asymptomatic), school attainment, age at onset (if symptomatic), CAGn (if applied), age at menarche and at menopause (if applied). Age at delivery of the first and the last child and the genetic status of individuals older than 50 were also studied.

Three main stratifications were made: (a) the number of children (NC) of symptomatic ("affected") *versus* asymptomatic ("unaffected") relatives over 45 years old; (b) the NC of MJD women *versus* the women population of Rio Grande do Sul; and (c) the NC of over 45 years old MJD women *versus* women population of equivalent age. This age category was chosen for two reasons: first, women over 45 years of age usually have already finished their reproductive period and are considered emeritus; therefore, their fitness can be reliably estimated; second, asymptomatic individuals over 45 years have a very low risk of being *MJD1* carriers and can be roughly taken as non-carriers. Most of the present data relied on reported phenotypes and not on genotypes. For this reason, the strategy of classifying individuals as affected or unaffected by their phenotype at age 45 or over was chosen, even if the so-called unaffected group would have eventually included some carriers (with a later age of onset, unknown to the related informants, or who died after 45 but before the symptomatic age).

Fitness was calculated in two ways: (a) considering the total NC born to women either older than 45 years or deceased before that age; and (b) considering the total NC of all individuals. Since only recent generations were included in the analyses, biases due to

losses related to prereproductive mortality were considered negligible, and the offspring also included young children. The mean NC obtained on the population was equated to a fitness value of 1. The fitness of MJD patients was expressed against this standard.

Means between groups were analyzed using Student's t or Mann-Whitney's U test according to the distribution of the variables. Other comparisons were made with ANOVA and Kruskal-Wallis H tests. In order to test correlations between measures, Pearson's coefficient was employed for continuous variables and Spearman's rank test for ordinal or not normally distributed variables. All tests were two-tailed; p values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS 14.0 for Windows.

RESULTS

One hundred and five MJD families were identified in Rio Grande do Sul, Brazil and 82 of them were recruited; 182 informants agreed to participate in this study. Data from 824 (415 affected) individuals belonging to those 82 MJD families were included. Table 1 shows the general characteristics of the study sample.

Twenty-three of the 105 families were not included: one family did not agree to participate in the study, and other 22 were not found by correspondence or telephone calls after repeated attempts (true losses). A general comparison of the previously known pedigrees of families included and lost did not reveal rough differences.

3.1 Estimated prevalence of MJD in Southern Brazil

Data about 272 MJD patients of 82 families alive in the 2000 Census was available. Considering the same rate of cases alive in the 105 families diagnosed as having MJD in the state, the prevalence of MJD patients in that year was estimated to be 350. This figure corresponds to a prevalence of 3.5:100,000 inhabitants in the state of Rio Grande do Sul.

3.2 Differential fitness of affected individuals in the MJD cohort versus those of the general population

In 2000, the female population in Rio Grande do Sul totaled 4,338,076 women. Mean NC of women in this population and mean NC of MJD patients were 1.90 and 2.93 ± 2.3 , respectively, and this difference was significant ($p=0.001$). If the population fitness is 1.0, then the fitness of the MJD carriers would be 1.54.

This data can be stratified into a subgroup of women who had completed their reproductive periods– women called emeritus – and the subgroup of women still at their reproductive age. These results are shown in Table 2.

Checking the diverse distribution of social classes was mandatory because one supposes that low social income is related to an increased NC. It is known that low social income rates are the most prevalent strata in the population (IBGE, 2003). Since a significant part of the MJD sample lacked data about income rates, school attainment was used to evaluate social class distribution. No statistical differences were found between the MJD sample and the general population (data not shown).

3.3 Differential fitness of affected *versus* unaffected individuals in the MJD cohort

Affected MJD individuals had a significantly higher NC than unaffected relatives, as shown in Table 3. This phenomenon appeared both in the women's and the men's offspring. The NC of MJD did not vary between genders. Therefore, no gender effect was acting on fitness.

The most reliable comparison was between affected and unaffected MJD women over 45 years or deceased because their offspring could be reliably estimated. Moreover, in order to test if an early perception of disease could influence fertility decisions, these women were also stratified according to their age at the onset of symptoms. Results confirmed that emeritus, affected women had more children than unaffected women, even when the disease started later than at the age of 30 years (Table 3).

MJD individuals with no offspring would be absolutely lost at the end of the observation in a cohort starting, for instance, two hundred year ago. Therefore, the effect on progeny in individuals with no children could be measurable only in a contemporary cohort. Table 4 compares only contemporary women who completed their fertile period, i.e., those born between 1936 and 1955 (between 45 and 64 years of age in 2000) or deceased. "Family size" was larger in all the strata of affected women than in unaffected women ($p=0.008$, Mann-Whitney U test) (Table 4). Emeritus MJD women with no offspring were also less frequent than their unaffected female relatives without offspring.

3.4 Reproductive interval of MJD affected women *versus* unaffected women

Mean ages at delivery of the first and last child were both lower in affected women when compared to unaffected MJD women ($p=0.0001$ and 0.04 , respectively); and therefore there were no differences in reproductive intervals as shown in Table 5. Interestingly, MJD women had their menarche at the same age as those of the general population, but had their menopause at an earlier age ($p=0.005$).

3.5 MJD severity *versus* fertility

Although not the main objective of this study, two parameters of severity were obtained from the present sample: age at onset of all affected individuals and CAGn, when available.

There was a direct correlation between age at onset of symptoms and NC ($r=0.322$, $p<0.0001$, Spearman correlation test) (Figure 1). On the other hand, in 78 MJD patients, CAGn was inversely correlated to NC ($r = - 0.281$, $p < 0.0001$, Spearman). The possible effect of CAGn on fertility is also shown in Figure 2, that is, MJD women who did not have children had significantly larger CAGn (76 CAGs) than MJD women who had children (74 CAGs) ($p> 0.05$, Mann-Whitney U test).

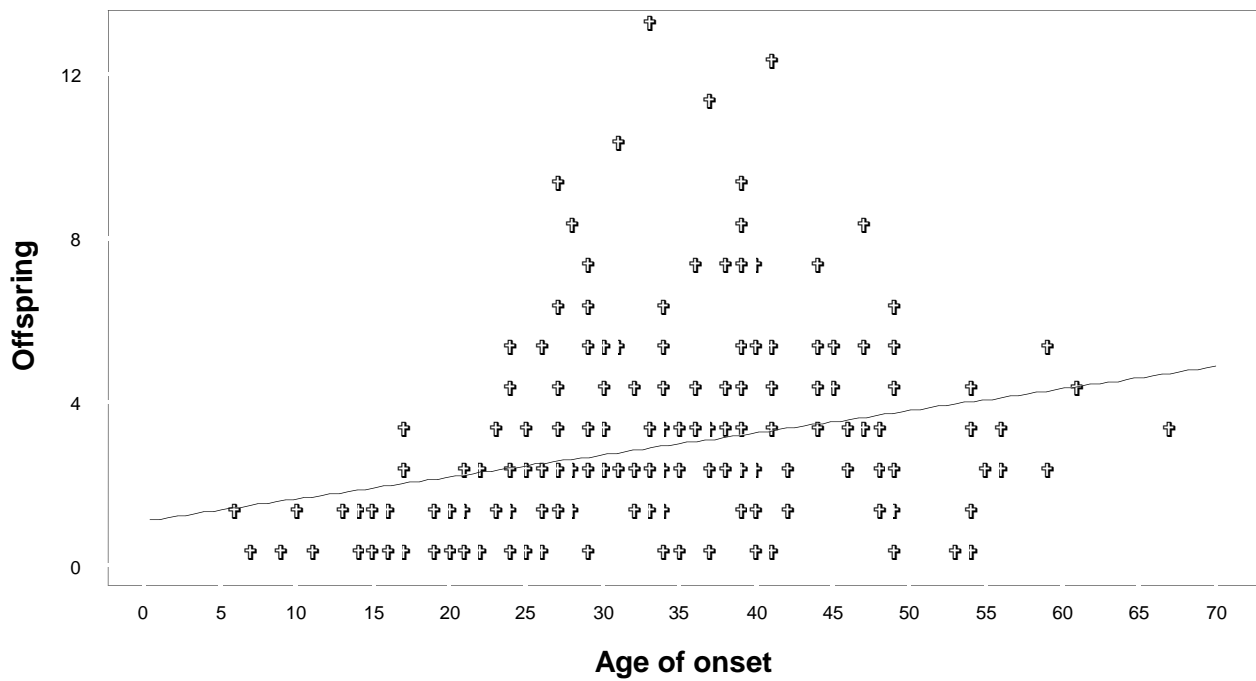


Figure 1 – Correlation between age at onset and number of children (offspring) of MJD women ($r=0.32$, $p<0.0001$, Pearson test).

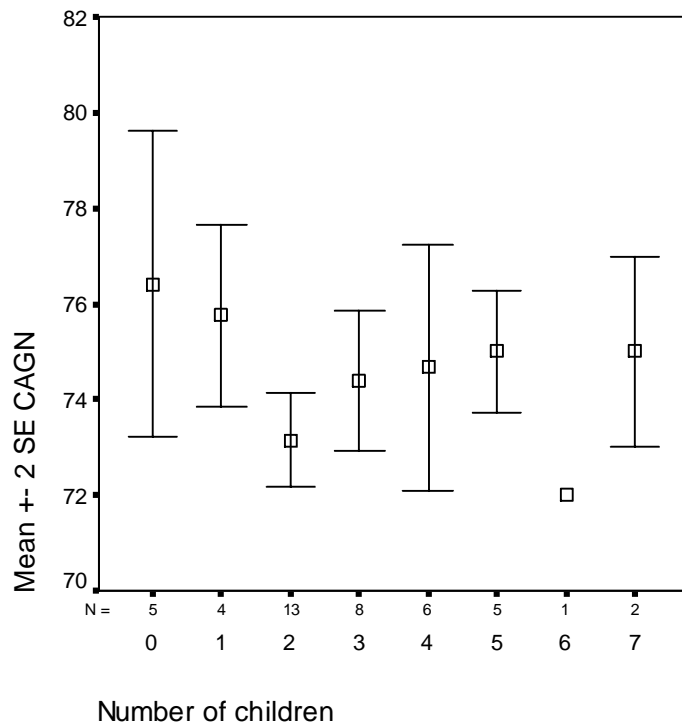


Figure 2 – CAGn of MJD affected women according to their number of children. Median CAGn of women who had no children was significantly larger than that of the remaining MJD women's CAGn ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test).

DISCUSSION

Genetic fitness was analyzed in MJD families from a definite geographical area. In this set of data, MJD patients born after 1903 had an increased genetic fitness both when compared to their asymptomatic relatives or when compared to the general population.

Intrafamilial comparisons were rather striking. MJD carriers older than 45 had significantly more offspring than their asymptomatic (or unaffected) relatives: 3.89 *versus* 2.68 children, on average. It should be emphasized that this control group was actually a combination of carriers of abnormal asymptomatic and normal genotypes, and therefore the comparison is conservative. Even so, the differences occurred. In the comparison between the MJD sample and the general population however, although emeritus MJD women (older than 45 years or deceased) had on average more offspring than those of the general population of emeritus women (3.89 *versus* 3.52 children), this difference was not significant. One possible explanation for this finding was the MJD small sample size (112 individuals). Significance would perhaps be obtained with a larger sample.

There is no doubt that the NC of MJD women younger than 45 is higher than that of the general female population. An enhanced fertility working in the early years of adulthood and disappearing in later years is a possibility, and it would be in accordance with the finding of an earlier menopause in MJD women. Another explanation would be that MJD women living from 1980 onwards, having some biological tendency to be fertile, were not so prone to the demographic transition, i.e., to the progressive reduction of the mean NC that follows a previous reduction in mortality in populations under industrial development (Montgomery, 2006).

MJD individuals born before 1903 who had no offspring were absolutely lost from this study. Only fertile ancestry is represented nowadays. This was the reason for measuring fertility in recent contemporary cohorts; as a result, we could include information on individuals with no offspring. We analyzed the family size of contemporary MJD affected versus unaffected women and compared the number of women with no children in both groups. First, women with no children were more common in the unaffected group than in the affected group. Therefore, normal CAG tracts were probably further lost, in the genetic pool of these families than expanded CAGs. On the other hand, affected women with no children had larger CAGn than those who had offspring: these longer expansions were actually lost for the following generations.

The population genetics of MJD reveals some phenomena that are in accordance with an enhanced fitness of the mutated allele. The worldwide association of MJD to a limited set of haplotypes – haplotype A-C-A being shared by 71% of 270 MJD families from 24 different origins (Martins *et al*, *in press*) – strongly supports the maintenance of this set of expanded alleles, in spite of selection. Under the assumption of a mutation/selection equilibrium, the expanded alleles lost at each generation in severe (early onset) MJD cases with no offspring could be replaced by new mutations. However, new mutations would introduce variation in intra and extragenic markers. This is not the case in the MJD expansions. Only five extended haplotypes were described, confirming that the disease frequency is mainly explained by two mutational events occurred in the A-C-A and G-G-C lineages (Gaspar *et al*, 2001; Martins *et al*, *in press*). No new mutations have been described in this disease.

Two findings confirmed selection against larger expansions. First, the fact that the earlier the disease starts, the smaller the offspring is (Figure 1); second, the association between no offspring and larger CAGn (Figure 2). Carriers of larger expansions are expected to have few children, if any. These results are in agreement with the model proposed by Frontali *et al* (1996). Under this model, most of the alleles with the largest expansions would be lost at each generation, while the pool of the low/medium expansions would be maintained by the increased fitness of their carriers.

One can only speculate about the causes for a higher fitness in carriers of MJD expansions. As Frontali *et al* (1996) have pointed out these “include possible effects of CAG expansions on reproductive physiology or on sexual drive and behaviour”. For instance, CAG expansion could have an effect on reproduction: this could explain why carriers had an earlier age at the delivery of the first child and, apparently, had a tendency to an earlier menopause than the general population.

The change in reproduction associated with CAG expansion seems to be independent of psychological mechanisms. Both asymptomatic women over 45 years and symptomatic women whose disease started after their thirties have their offspring on average, before the onset of the disease (from 21 to 29 in the case of carriers, whose disease started after 30; and from 24 to 32 years in the case of asymptomatic women over 45 years of age). Both groups had their offspring when living with the same uncertainty about their future.

Evidences in favor of a differential fitness have also been found in Huntington Disease (HD), Spinocerebellar Ataxia 1 (SCA1), and allele 4 of the Apolipoprotein E (APOE) locus (Harper, 1996; Frontali *et al*, 1996; Charlesworth, 1994). In all these cases, mutations lead to neurodegenerative phenotypes appearing after the reproductive age and acting like

a “neurological senescence”. Of course, these mutations are “individually and collectively exceedingly rare and best regarded as leading to private modulations of the senescent phenotype” (Martin, 2001). Notwithstanding, the higher fitness found in these diseases tempted us to see them as possible examples of antagonistic pleiotropy (Williams, 1957). In this speculative scenario, CAG expansion, common to HD, SCA1, and MJD, could anticipate and enhance to some extent fertility and fitness and later be associated to an earlier ovarian failure, perhaps mimicking the already known apoptosis that affects neuronal populations in these diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the patients and relatives who agreed to participate in this project. This study was partially supported by CAPES through a scholarship given to P.R.Prestes. Prof. L. Jardim was supported by CNPq.

REFERENCES

- Bauer, P.O., Kotliarova, S.E., Matoska, V., Musova, Z., Hedvicakova, P., Boday, A., Tomek, A., Nukina, N., Goetz, P. (2005) Fluorescent multiplex PCR-fast’ method for autosomal dominant spinocerebellar ataxias screening. *Genetika* 41, 830-837.
- Bressel, T.A.B. (2003) Análise de haplótipos intragênicos ao gene *MJD1* em pacientes com a doença de Machado-Joseph. Master’s Thesis, Federal

University of Rio Grande do Sul

Charlesworth, B. (1994) *Evolution in age structured populations* 2^{sd} edition. New York, Cambridge University Press. Cambridge.

Frontali, M., Sabbadini, G., Novelletto, A., Jodice, C., Naso, F., Spadaro, M., Giunti, P., Jacopini, A.G., Veneziano, L., Mantuano, E., Malaspina, P., Ulizzi, L., Brice, A., Durr, A., Terrenato, L. (1996) Genetic fitness in Huntington's Disease and Spinocerebellar Ataxia 1: a population genetics model for CAG repeat expansions. *Ann. Hum. Genet.* 60, 423-35.

Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y.X., Soong, B.W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G.A., Brunt, E., Higgins, J.J., Lauritzen, M., Tranebjaerg, L., Volpini, V., Wood, N., Ranum, L., Tsuji, S., Brice, A., Sequeiros, J., Rouleau, G.A. (2001) Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 523-528.

Harper, P.S. (1996) *Huntington's disease*. London, Saunders, pp. 294-298.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2003) Censo Demográfico 2000 – Nupcialidade e Fecundidade, Resultados da Amostra. Rio de Janeiro.

Ikeuchi, T., Igarashi, S., Takiyama, Y., Onodera, O., Oyake, M., Takano, H., Koide, R., Tanaka, H. and Tsuji, S. (1996) Non-mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant

- allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 730-733.
- Iughetti, P., Otto, P.A., Zatz, M. e Passos-Bueno, M.R. (1998) Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am. J. Med. Genet.* 77, 246-248.
- Jardim, L. B., Silveira, I., Pereira, M. L., Ferro, A., Moreira, M. C., Mendonça, P., Ferreirinha, F., Sequeiros, J., Giugliani, R. (2001) A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil – 110 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *Journ. Neurol.* 248, 870-876.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., *et al* (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.* 8, 221-8.
- Leeflang, E.P., McPeck, M.S., Arnheim, N. (1996) Analysis of meiotic segregation, using single sperm typing: meiotic drive at myotonic dystrophy locus. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 896-904.
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E.L., Nezarati, M.M., Corwin, L.I., Lopes-Cendes, I., Rooke, K., Rosenberg, R., MacLeod, P., Farrer, L.A., Sequeiros, J., Rouleau, G.A. (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 54-61.

- Martin, G.M (2001) Genetics and Aging. In: *The metabolic & molecular bases of inherited disease*.(eds. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle), p 215-223. Eight edition. Volume 1. Mc Graw-Hill Medical Publishing Division.
- Martins, S., Calafell, F., Gaspar, C., Silveira, I., Wong, V., Hsieh, M., Soong, B.W., Tranebjaerg, L., Brunt, E., Nicholson, G.A., Tsuji, S., Watanabe, M., Jardim, L., Riess, O., Wood, N., Sasaki, H., Ranum, L., Brice, A., Rouleau, G., Coutinho, P., Amorim, A., Sequeiros, J. The worldwide spread mutational event in Machado-Joseph disease has an Asian origin. *Arch. of Neurol.*, in press.
- Montgomery K. (2006) “The demographic transition”. Web page of Univeristy of Wisconsin. www.uwmc.uwc.edu/geography/Demotrans/demtran
- Paúl, M.C. (1997) Genética psicossocial: o estudo das atitudes face a realização do teste preditivo da Doença de Machado Joseph. *Psicologia: teoria, investigação e prática* 2, 241-250.
- Pedro, A.O., Pinto-Neto, A.M., Paiva, L.H.S.C., Osis, M.J., Hardy, E. (2003) Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. *Cad. Saúde Pública* 19, 17-25.
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., Riess, O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 3, 291-304.
- Silva, M.C., Coutinho, P., Pinheiro, C.D., *et al* (1997) Hereditary ataxias and spastic paraplegias: methodological aspects of a prevalence study in Portugal. *J.*

Clin. Epidemiol. 50, 1377-1384.

Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., Sanpei, K., Liang, Y., Saito, M., *et al* (1995) Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum. Molec. Genet.* 4, 1137-1146.

Thomas, F., Renaud, F., Benefice, E., de Meeus, T., Guegan, J.F. (2001) International variability of ages at menarche and menopause: Patterns and main determinants. *Hum. Biol.* 73, 271-90

Williams, G.C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11:398.

Table 1 – Characteristics of the studied sample

		Symptomatic	Asymptomatic	Total	P
Families				82	
Individuals		415	409	824	
	Mean age±sd (range)	47.85±17.64	33.67±14.0	40.74±17.47	0.0001
Deceased		143	15	158	
More than 45 years of age		227	89	316	
Women		221	221	442	0.039
	Mean age	46.08±16.95	33.02±14.03	39.55±16.86	
Men		190	192	382	
	Mean age	49.91±18.25	34.41±14.23	42.12±18.08	
Women more than 45 years of age		110	47	157	0.18
	Mean age	59.57±11.77	53.45±8.68	57.70±11.20	
Men with more than 45 years of age		115	42	157	
	Mean age	61.26±13.41	54.79±10.67	59.5±13.0	
CAGn Mode (n; range)		73 (78; 69-83)			
Mean age ± sd at onset of symptoms (n; range)		36.38 ± 11.29			
	Women	35.3 ± 10.0			0.04
	Men	37.7 ±11.0			
Median age at death (n; range)		58 (143; 20-85)	52 (15; 18-87)		0.3

Table 2 – Fitness of MJD affected women versus the general female population

	Population		MJD affected women		p
	Number of women (%)	Mean Number of Children	Number of women	Mean \pm sd Number of Children (range)	
All ages	4,338,076	1.90	222	2.93 \pm 2.3 (0-13)	p<0.001**
Fitness		1		1.54	
Emeritus (Over 45 years) *	1,411,604	3.52	112	3.89 \pm 2.52 (0-13)	p=0.1**
Fitness		1		1.1	
Between 10 and 44 years	2,926,425	1.12	110	1.95 (0-9)	p<0.001**
Fitness		1		1.74	
Women who did not have children	1,482,010/ 4,338,076 (34.16%)	0	28/222 (12.6%)	0	p<0.001 ***
Contemporary, emeritus women (born between 1936 and 1955) who did not have children	100,748/979,688 (10.28%)	0	6/75 (8.0%)	0	p>0.2 ***

* The subgroup of emeritus MJD women also included dead women since in both cases (alive and over 45 or dead) the offspring was complete.

** Student's t test.

*** Chi-square.

Table 3 – Mean \pm sd number of children (NC) of affected versus unaffected MJD individuals

		AFFECTED	UNAFFECTED	p	TOTAL
Deceased		143	15		158
More than 45 years of age		227	89		316
	Number of children	3.84	2.89	0.007*	
Total women		221	221		442
	Number of children	2.93\pm 2.3	1.66\pm1.6	0.0001*	2.31 \pm 2.1
Total men		190	192		382
	Number of children	2.91\pm2.6	1.66\pm1.7	0.0001*	2.29 \pm 2.2
Women more than 45 years of age		110	47		157
	Number of children	3.89\pm2.5	2.68\pm2	0.001*	
	fitness	1.45	1		
		SYMPTOMS STARTING AFTER THE AGE OF 30	UNAFFECTED		
Women more than 45 years of age	n	93	47		
	Number of children	4.03 \pm 2.5	2.68\pm2.0	0.001*	

* Although means \pm sd were presented, Mann-Whitney U test was performed due to the distribution of variables.

Table 4 – Number of children of emeritus, contemporary MJD women born between 1936 and 1955.

	<i>Number of children (family size)</i>														Total	p
	<i>Zero</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>		
Unaffected Women	7	3	13	12	4	2	0	2	0	0	1	0	0	0	44	0.008*
	(15%)		(63%)		(13%)						(6%)					
Affected Women	9	6	26	22	13	18	4	6	3	2	1	1	1	1	113	
	(7%)		(47%)		(30%)						(13%)					
Total	16	9	39	34	17	20	4	8	3	2	2	1	1	1	157	

* Mann-Whitney U test.

Table 5 – Reproductive characteristics of MJD affected and unaffected women and the general population

	Affected	Unaffected at 45 years or more	Population	p
	average \pm sd (n; range in years)			
Age at delivery of the first offspring	21.7 \pm 4.5 (188; 14-42)	24.2 \pm 3.7 (36; 16-32)		0.0001*
Age at delivery of the last offspring	29.8 \pm 6.4 (188; 16-46)	32.2 \pm 5.6 (36; 22-43)		0.04*
Reproductive interval	8.12 \pm 6.5 (188; 0-29)	8.0 \pm 6.6 (36; 0-27)		0.89*
Age at menarche	12.9 \pm 1.8 (30; 10-17)		12.9 ***	1.0**
Age at menopause	46.87 \pm 5.1 (15; 38-56)		51.2 *****	0.005**

* Although means \pm sd were presented, Mann-Whitney U test was performed due to the distribution of variables.

** Student's t test.

*** Thomas *et al* (2001).

***** Pedro *et al* (2003).

6. Resultados e Discussão:

A investigação da fecundidade abrangeu mulheres com 10 anos ou mais de idade e nascidas após 1903. Para evitar a duplicação de dados, o Censo Brasileiro somente registra informações sobre a fecundidade feminina (IBGE, 2003); por esse motivo, o valor adaptativo foi calculado com base no número de filhos das mulheres provenientes das famílias com diagnóstico molecular positivo para DMJ.

Os dados populacionais fornecidos no Censo do IBGE (IBGE, 2003) foram tomados como base para as comparações, já que representam as características da população do Brasil. As parentes assintomáticas foram usadas como controles (Frontali *et al*, 1996), para descartar efeitos secundários na reprodução, já que apresentam as mesmas condições familiares que as doentes.

O valor adaptativo genético, analisado a partir das mulheres de famílias com diagnóstico molecular para a DMJ, mostrou-se aumentado quando comparado tanto com os dados da população do estado do RS, como quando comparado com seus parentes assintomáticos.

6.1. Doentes *versus* População do RS

O número médio de filhos das mulheres da população do RS e das mulheres com DMJ, em 2000, foi 1,90 e $2,93 \pm 2,3$, respectivamente, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Se o valor adaptativo da população for considerado 1,0, o da DMJ seria de 1,54.

Se analisarmos apenas as mulheres jovens, com menos de 45 anos em 2000, e já doentes, notaremos que estas tiveram significativamente mais filhos ($1,95 \pm 1,56$ filhos) do que as mulheres da população igualmente com menos de 45 anos (1,12 filhos) ($p < 0,001$). Assim, parece que as mulheres com DMJ não estão acompanhando a tendência histórica da transição demográfica, ou seja, de as populações, ao se tornarem mais urbanas e industriais, apresentarem redução da natalidade (IBGE, 2003).

Entretanto, a melhor alternativa para avaliar o valor adaptativo é comparar o número médio de filhos das mulheres eméritas – com mais de 45 anos ou já falecidas –, pois essas já completaram seu período reprodutivo. Embora o número médio de filhos das

eméritas com DMJ fosse de $3,89 \pm 2,52$ e o das mulheres eméritas da população geral fosse de 3,52 filhos, essa diferença não foi significativa. Como se sabe que os doentes com precoce idade de início da doença têm menos chances de encontrar um “par” (Lima *et al*, 2001), selecionamos somente as mulheres eméritas com DMJ e com idade de início dos sintomas a partir dos 20 anos. A média de filhos nesse grupo foi 4,10 ($\pm 2,55$); e quando comparado com a média da população do RS, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Existem algumas sugestões para a ausência de significância estatística na comparação entre as mulheres eméritas com DMJ, independente da idade de início dos sintomas da doença, e as da população, que são:

- (a) o pequeno tamanho amostral no grupo de doentes ($n=112$);
- (b) um possível aumento da fecundidade no início da vida reprodutiva das DMJ, característica que desaparece posteriormente;
- (c) o fato da menopausa das mulheres com DMJ ocorrer mais cedo do que na população (este dado será analisado posteriormente); ou
- (d) a tendência histórica de que, até os anos 1950-60, as mulheres da população tinham muitos filhos e o valor adaptativo aumentado da DMJ poderia ficar oculto.

6.2. Doentes *versus* Assintomáticas

Quando analisamos o número médio de filhos das mulheres afetadas com o de suas parentes assintomáticas, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) tanto na comparação independentemente da idade – $2,93 \pm 2,3$ e $1,66 \pm 1,6$, respectivamente (figura 1) – como entre as mulheres eméritas – $3,89 \pm 2,5$ e $2,68 \pm 2,0$, respectivamente (figura 2). A comparação entre as mulheres eméritas com DMJ, independente da idade de início dos sintomas, e suas parentes assintomáticas reforça a sugestão de que o pequeno tamanho amostral na comparação com a população pode ter influenciado os testes realizados.

Uma vez que as pessoas identificadas como assintomáticas não possuem diagnóstico molecular estabelecido, isso pode ter gerado confusão em algumas avaliações. Indivíduos portadores – mas ainda assintomáticos – podem ter sido misturados aos não portadores do gene para DMJ.

Desse modo, poder-se-ia esperar que o valor adaptativo genético no grupo de doentes fosse ainda maior se essa distinção fosse feita. Entretanto, se o valor adaptativo das consangüíneas assintomáticas, aos 45 anos, for considerado 1,0, o das portadoras de DMJ, aos 45 anos, seria de 1,45.

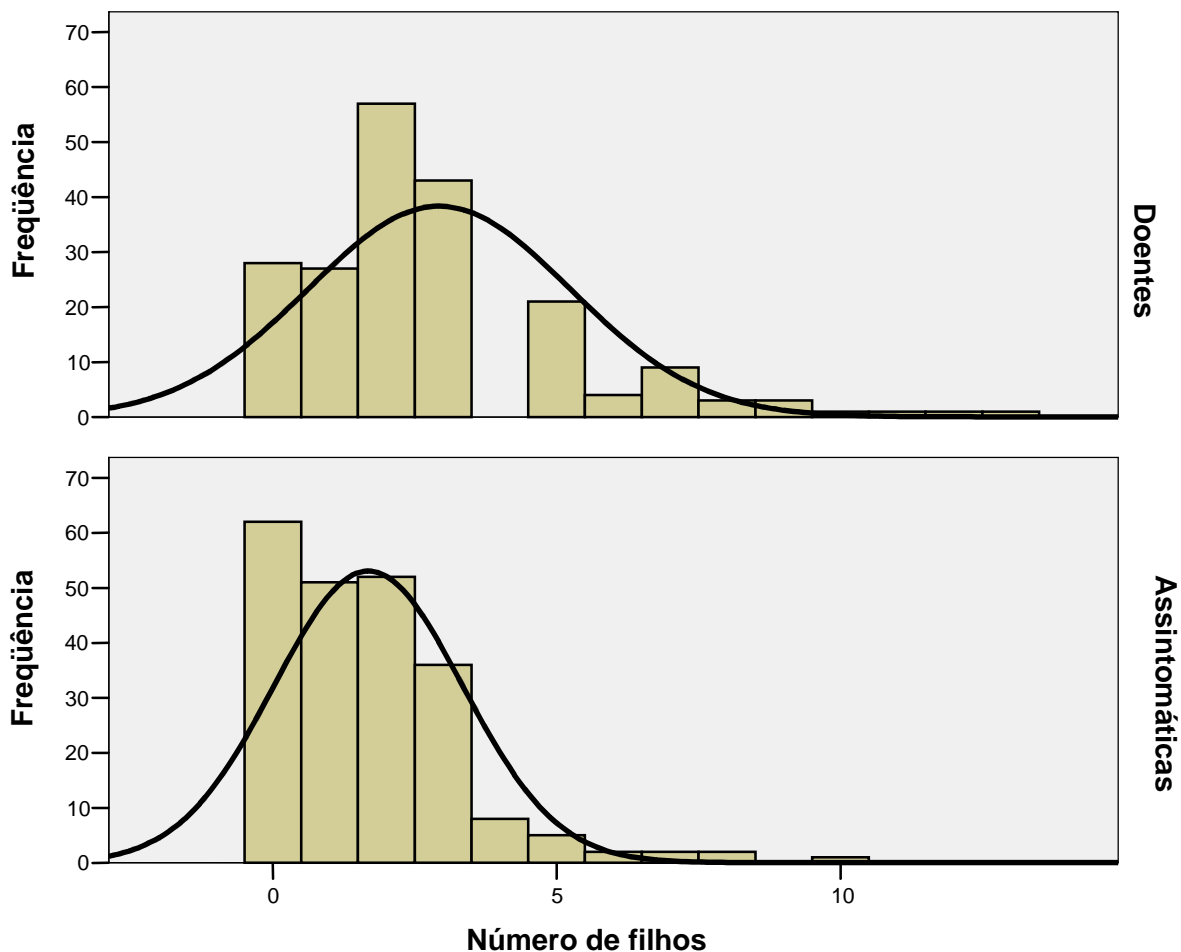


Figura 3: Distribuição do número de filhos das mulheres doentes e assintomáticas, independente da idade em 2000.

Esses resultados demonstram um aumento no valor adaptativo genético dos pacientes com DMJ, quando comparados tanto com a população do estado do RS, como com seus parentes assintomáticos.

As mulheres portadoras de DMJ que não tiveram filhos são menos frequentes do que suas parentes assintomáticas, de acordo com as informações coletadas ($p < 0,001$). Quando as mulheres doentes que não tiveram filhos foram comparadas com as mulheres da

população do RS que também não tiveram filhos, a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Das 222 mulheres doentes da amostra DMJ, 12,6% (28) não tiveram filhos; enquanto na amostra de parentes assintomáticas 28,05% de 221 (62) não tiveram filhos; e de acordo com o Censo do IBGE de 2000, das 4.338.076 mulheres com mais de 10 anos, 34,16% (1.482.010) não tiveram filhos. Esperava-se que as proporções de mulheres que não tiveram filhos estivessem equilibradas, o que não ocorreu.

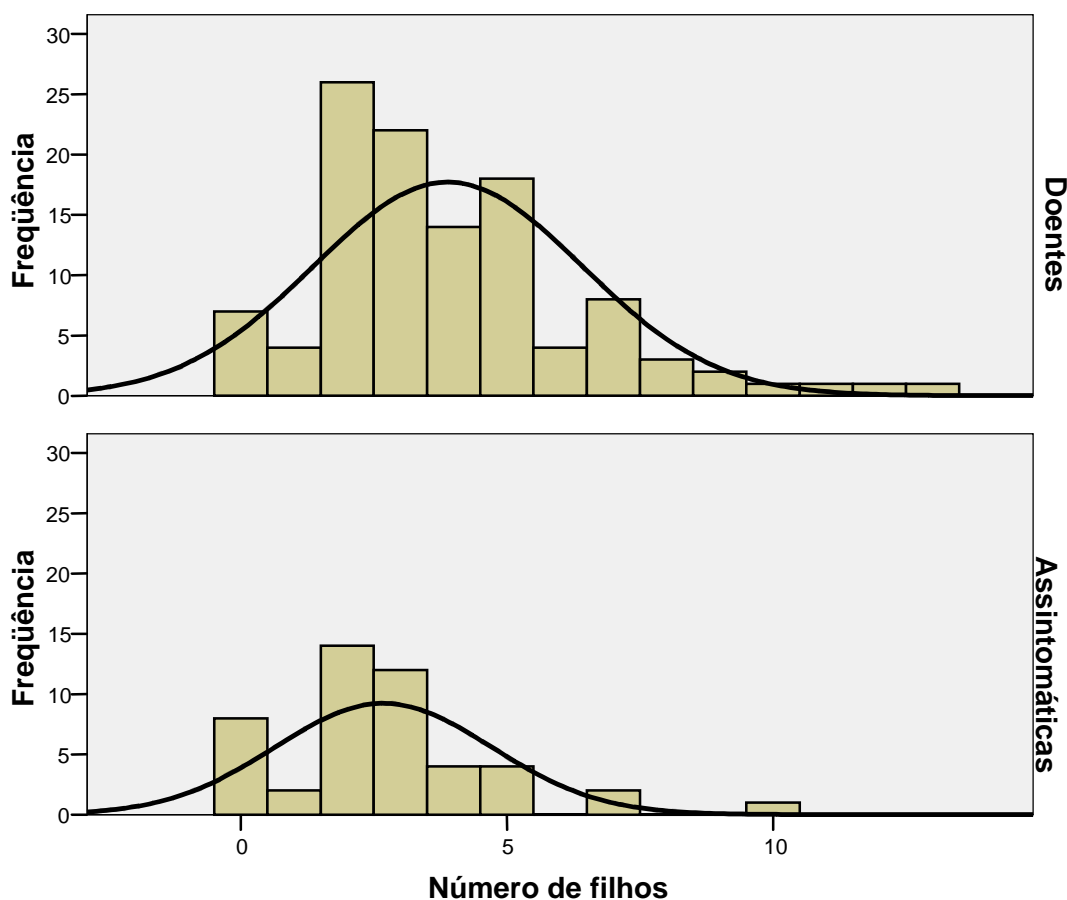


Figura 4: Distribuição do número de filhos das mulheres doentes e assintomáticas e eméritas – com mais de 45 anos ou falecidas em 2000.

6.3. Idade das mulheres ao nascimento do primeiro filho

A idade da mulher ao nascimento do primeiro filho pode influenciar no tamanho da prole, uma vez que quem começa a ter filhos mais cedo, teoricamente, pode tê-los por mais tempo. Comparamos, então, a idade ao nascimento do primeiro filho das mulheres doentes e das que permaneceram assintomáticas após os 45 anos (figura 5). As mulheres doentes tiveram o primeiro filho em média aos $21,7 \pm 4,5$ anos, já as assintomáticas, aos $24,2 \pm 3,7$ anos. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,006$), ou seja, as mulheres doentes tiveram o primeiro filho 2,5 anos antes que as assintomáticas.

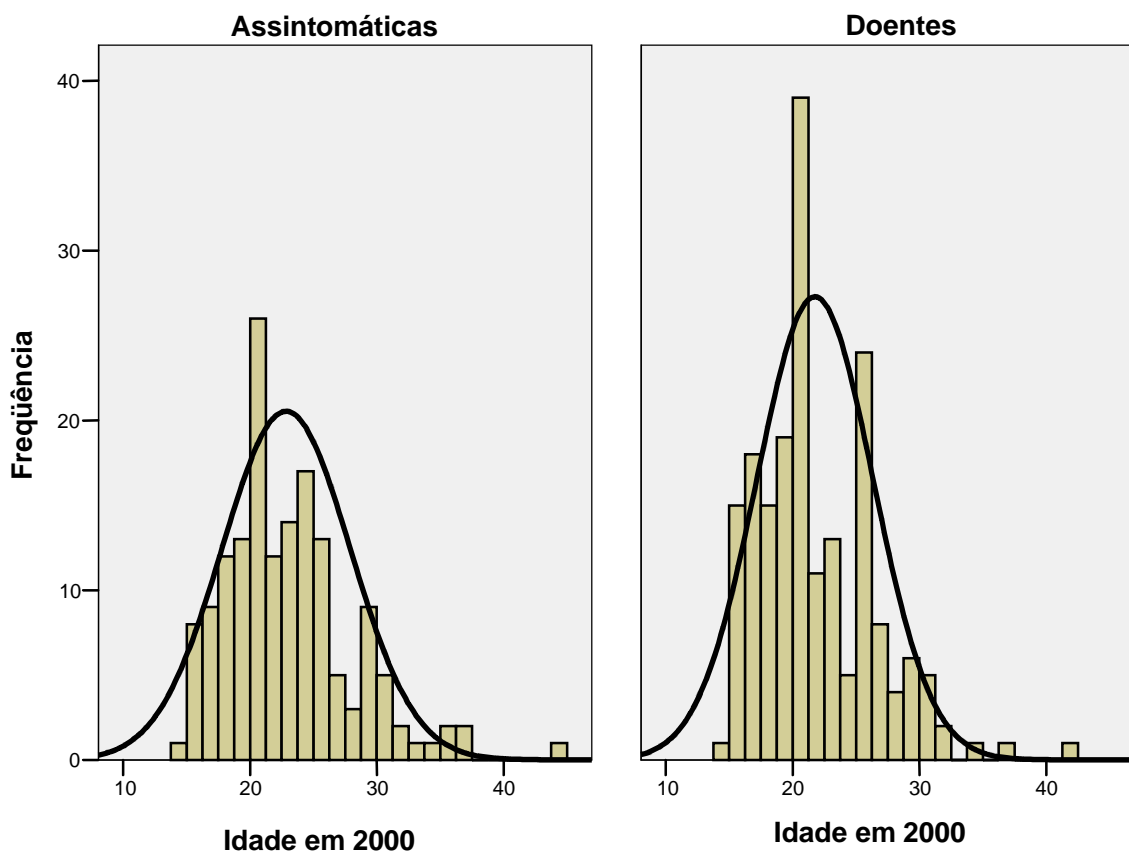


Figura 5: Distribuição da idade de mulheres assintomáticas e doentes ao nascimento do primeiro filho em 2000.

Para que não houvesse a influência da percepção do início dos sintomas na decisão de ter filhos retiramos da análise as mulheres doentes que tiveram idade de início dos sintomas antes dos 30 anos. Essa comparação continuou mostrando-se estatisticamente significativa ($p=0,008$), ou seja, as sintomáticas cuja doença começou aos 30 anos ou mais,

também tiveram o primeiro filho mais cedo do que as mulheres que continuaram assintomáticas após os 45 anos (dados não mostrados).

Podemos concluir que o valor adaptativo aumentado das portadoras de DMJ está ainda associado a um início da reprodução precoce, quando comparado com as assintomáticas.

6.4. Idade das mulheres ao nascimento do último filho

Assim como a idade ao nascimento do primeiro filho pode influenciar o tamanho da prole, a idade ao nascimento do último filho também pode ter sua contribuição. Novamente encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$) na comparação entre a idade ao nascimento do último filho em mulheres doentes ($29,8\pm 6,4$ anos) e em mulheres assintomáticas aos 45 anos ($32,2\pm 5,6$ anos). Nesse caso, as mulheres assintomáticas têm seus últimos filhos 2,4 anos após as sintomáticas.

6.5. Intervalo reprodutivo

Com base nas informações obtidas, da idade das mulheres ao nascimento do primeiro e último filhos, calculamos o intervalo reprodutivo das mulheres doentes e assintomáticas acima de 45 anos. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,89$), como era esperado. As mulheres doentes têm seus primeiros filhos mais cedo do que suas parentes assintomáticas, mas também têm os últimos filhos mais cedo. Conclui-se com isso que DMJ não abrevia o intervalo reprodutivo.

6.6. Menopausa e menarca

A menopausa nas mulheres com DMJ ocorre em média 5 anos antes do que nas mulheres da população, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,01$). As mulheres doentes encontram-se na menopausa, em média, aos $46,87\pm 5,1$ anos; já as mulheres da população em geral encontram-se na menopausa, em média, aos 51,2 anos (Pedro *et al*, 2003).

Por outro lado, a idade na menarca não apresenta diferença ($p=1,0$), pois ambos os grupos tiveram a menarca aos 12,9 anos, em média. A partir desses dados, notamos que as mulheres com DMJ encontram-se na menopausa antes do que as mulheres da população, o que confirma o encurtamento do desfecho reprodutivo mostrado anteriormente.

6.7. Idade de início dos sintomas e Expansão CAG

Por se tratar de uma doença incapacitante e progressiva, quanto mais cedo os sintomas iniciam, menores as chances de encontrar um cônjuge e ter filhos (Lima *et al*, 2001). Houve uma correlação direta, mas fraca, entre a idade de início dos sintomas e o número médio de filhos das mulheres com DMJ ($r=0,322$, $p<0,0001$). Quanto mais cedo os sintomas da doença se manifestam, menos filhos as mulheres têm. Já que a idade de início dos sintomas está inversamente correlacionada com o tamanho da expansão CAG que os doentes portam, esperava-se que quanto maior fosse a expansão apresentada pelos doentes, menos filhos eles teriam. Essa hipótese foi confirmada, pois a expansão CAG está inversamente correlacionada ao número médio de filhos, embora essa correlação seja fraca ($r= -0,281$, $p<0,0001$).

6.8. Homens *versus* Mulheres

Como não existem diferenças entre homens e mulheres quanto à proporção de afetados ou gravidade da doença (Dürr *et al*, 1995; DeStefano *et al*, 1995), o número médio de filhos foi estudado para descartarmos o efeito do sexo no tamanho da prole. Os homens doentes têm em média $2,91\pm 2,62$ filhos e as mulheres têm $2,93\pm 2,3$ filhos. Não houve diferença quanto ao tamanho da prole de homens e mulheres afetados ($p=0,91$).

6.9. Anos de estudo

De acordo com o IBGE (2003), à medida que aumenta a instrução das mulheres, as taxas de fecundidade tentem a se reduzir. Para avaliar a influência do nível de escolaridade na taxa de fecundidade, comparamos o número de anos de estudo das mulheres doentes com o da população do estado e com as assintomáticas.

Foram criados grupos de acordo com a classificação utilizada pelo IBGE no seu Censo de 2000. O grupo “0” corresponde a pessoas analfabetas, que não completaram nenhum ano de estudo; grupo “1” – de um a três anos de estudo; grupo “2” – de quatro a sete anos de estudo; grupo “3” – de oito a dez anos de estudo; grupo “4” – de onze a quatorze anos de estudo e grupo “5” – mais de quinze anos de estudo.

Não houve diferença significativa quanto ao número de anos de estudos entre as mulheres da população geral do RS e as mulheres com DMJ com mais de 45 anos em 2000 (Tabela 1). Já que as mulheres da amostra não diferem das mulheres da população em relação ao número de anos de estudo, essa variável não parece estar influenciando no valor adaptativo das mulheres com DMJ.

As mulheres assintomáticas e doentes, com mais de 45 anos em 2000 não diferiram quanto ao grau de escolaridade ($p=0,309$), mas quando foram comparadas às mulheres com menos de 45 anos, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,007$). Essa diferença, entretanto, não parece ser relevante, pois os dados foram separados em categorias para a comparação da escolaridade e ambos os grupos estão localizados no mesmo estrato – entre 8 e 10 anos de estudo.

Tabela 1: Número absoluto e percentual válido de mulheres da população do Rio Grande do Sul e de mulheres com DMJ acima dos 45 anos de idade em 2000, de acordo com os grupos de anos de estudo.

	Grupos de anos de estudo						
	0	1	2	3	4	5	Total
População do RS (% válido)	255.328 6,6%	465.509 12,1%	1.433.414 37,1%	736.337 19%	728.062 18,8%	245.633 6,4%	3.864.283
Mulheres DMJ (% válido)	3 4,4%	10 14,5%	33 47,8%	11 15,9%	8 11,6%	4 5,8%	69

6.10. Prevalência

A partir dos dados obtidos, a prevalência estimada da doença é de 3,5:100.000 habitantes na nossa região, número superior ao descrito anteriormente por Jardim e colaboradores em 2001, quando a prevalência calculada foi de 1,8:100.000 habitantes. Entre a população das ilhas açorianas, na costa portuguesa, onde a DMJ representa um verdadeiro problema de saúde pública, a prevalência é ainda maior. Nas ilhas de Açores, há uma pessoa afetada em cada 2309 habitantes, já na Ilha de Flores a prevalência é de 1:103 habitantes (Lima *et al*, 1997).

7. Algumas especulações

De acordo com Lima e colaboradores (2001), em doenças cuja idade de início dos sintomas ocorre geralmente na vida adulta e não impõem limitações fisiológicas ou biológicas para reprodução, uma redução no valor adaptativo poderia ser mediada pelo comportamento social. A seleção comportamental contra o gene *MJD1* poderia ocorrer se algum doente, ou parente ainda não diagnosticado, não quisesse ou estivesse incapacitado de se reproduzir, o que não parece ser o caso. Doentes e assintomáticos têm filhos, mesmo com a presença dos sintomas, para os primeiros, e da dúvida, para os últimos.

Altas taxas de fecundidade podem ter sido selecionadas favoravelmente para as espécies animais que evoluíram sob a pressão de um alto risco – predadores, doenças infecciosas, alta prevalência de desastres, desnutrição, etc –, haveria uma forte pressão seletiva por alelos que conferissem crescimento, desenvolvimento e maturação sexual todos rápidos – qualidades essas que garantiriam um número grande de descendentes em um curto período de tempo (Martin, 2001).

Essas capacidades, ou qualidades de um indivíduo, nas mais diversas espécies, vêm acopladas com uma redução na sobrevivência média. Isso é explicado pela existência de genes cuja ação confere tanto efeitos benéficos precoces na vida (desenvolvimento e maturação sexual rápidos), como simultaneamente efeitos deletérios em fases mais tardias. Esse fenômeno é chamado de pleiotropismo antagonístico de um gene (Williams, 1957; Martin, 2001).

Assim, além das explicações de ordem psicológica já mencionadas, duas possibilidades de ordem biológica e evolutiva, poderiam explicar as altas taxas de fecundidade entre portadores da DMJ:

- a condição DMJ, ao levar à morte precoce, agiria como uma pressão seletiva na população com DMJ. Morrendo precocemente, os afetados, através dos séculos e de diversos *rounds* reprodutivos, estariam incluídos entre os mortos, tanto doentes com maturação sexual precoce (estes, já com prole) como os doentes com maturação sexual tardia (estes sem prole). Com a sucessão das gerações, estariam selecionadas, se em ligação, entre as famílias de DMJ, as linhagens com maturação sexual precoce;

- o próprio mecanismo fisiopatogênico do alelo expandido *MJD1* poderia ser responsável por ambos os eventos. A expansão CAG produz um trato de poliglutamina que, de algum modo, está associado à apoptose celular de neurônios. Esse é um efeito deletério do gene *MJD1*, que em tudo evoca mecanismos gerais de envelhecimento – apoptose é morte celular programada geneticamente. Ora, se os genes que desencadeiam o envelhecimento podem ter um efeito positivo nas fases iniciais da vida (o pleiotropismo antagonístico, conceito criado por Williams, citado logo acima), é possível que a própria expansão CAG no gene *MJD1* também tenha esses efeitos. Assim, portadores da DMJ teriam “crescimento, desenvolvimento e maturação sexual todos rápidos – e um número grande de descendentes em um curto período de tempo” – por terem uma seqüência expandida CAG que, mais tarde no ciclo vital, desencadearia a morte programada de certas células (os neurônios).

O aumento da fecundidade encontrado em pacientes com DMJ foi semelhante ao já descrito anteriormente nas portadoras de Doença de Huntington (DH) e na Ataxia Espinocerebelar 1 (SCA1), também doenças neurodegenerativas, quando foram comparadas às suas parentes não portadoras. Especulamos a possibilidade de haver pleiotropismo antagonístico nos genes envolvidos nessas mutações. Embora insuficiente para repercutir no pool genético da população, esse possível pleiotropismo antagonístico poderia explicar, em parte, a manutenção dessas mutações ao longo do tempo, ainda que em um grupo pequeno de indivíduos, em relação à população.

Por exemplo, sabe-se que a mutação DMJ associada ao haplótipo intragênico A-C-A (o haplótipo é encontrado em 70% da população mundial com DMJ e em 92% da população local) deve ter surgido há 5774 ± 1116 anos atrás (Martins *et al*, *in press*). Ou seja, apesar da forte antecipação, a DMJ subsiste na população humana há 240-300 gerações.

A principal evidência em favor da manutenção dessas mutações ao longo do tempo é a sua relativa homogeneidade de origem: há poucos haplótipos, para uma condição que determina tão graves desfechos aos seus portadores. A associação mundial da DMJ com um limitado grupo de haplótipos – haplótipo A-C-A sendo compartilhado por 71% das 270 famílias de 24 origens diferentes (Martins *et al*, *in press*) – concorda fortemente a favor da manutenção deste grupo de alelos expandidos, apesar da seleção. Sob a suposição de

equilíbrio mutação/seleção, os alelos expandidos perdidos a cada geração, em casos graves de DMJ (idade de início precoce) sem filhos, deveriam ser substituídos por mutações novas. Entretanto, o surgimento de mutações novas introduziria variação em marcadores intra e extragênicos. Este não é o caso das expansões DMJ: somente cinco haplótipos expandidos foram descritos, confirmando que a frequência da doença é explicada principalmente por dois eventos mutacionais ocorridos nas linhagens A-C-A e G-G-C (Gaspar *et al*, 2001; Martins *et al*, *in press*). Novas mutações nunca foram descritas nessa doença.

8. Conclusões

8.1. Pacientes com DMJ têm mais filhos do que a população em geral, quando comparados globalmente, independente da idade e com seus parentes assintomáticos. Portanto, o valor adaptativo está aumentado em pacientes com DMJ, e é possível que isso seja responsável, em parte, pela manutenção desse genótipo, ao longo das gerações, a despeito das forças evolutivas contrárias ao mesmo. Como consta acima, se o valor adaptativo das portadoras assintomáticas, aos 45 anos for considerado 1,0, o da DMJ seria de 1,45.

8.2.1. O sexo dos portadores de DMJ não se relacionou a taxas de fecundidade discordantes e, portanto, não parece interferir. As mulheres, por saberem melhor quantos filhos tiveram, são os sujeitos classicamente interrogados sobre a fecundidade nos Censos, e por isso foram eleitas para as comparações do presente estudo. Essa escolha trouxe outras vantagens para um estudo de fecundidade: a análise das variáveis associadas ao intervalo reprodutivo – menarca e menopausa –, além do próprio intervalo reprodutivo. Estudar essas variáveis revelou achados muito interessantes e que puderam sugerir a natureza das forças biológicas envolvidas nesse valor adaptativo aumentado. Listamos esses aspectos como as próximas conclusões.

8.2.2. Mulheres doentes apresentaram o início dos sintomas em média depois de terem iniciado seu ciclo reprodutivo. Desta forma, ao início da fase de reprodução, a maioria das mulheres (que posteriormente vieram a manifestar os sintomas da doença), não sabia se era portadora do gene *MJDI*. As mesmas estavam na dúvida quanto ao seu status genético e, mesmo assim, tiveram mais filhos do que suas parentes assintomáticas – que viviam sob as mesmas dúvidas, afinal. Parece que a percepção do início dos sintomas não influenciou na decisão de iniciar a fase reprodutiva. Desse modo, podemos excluir a hipótese de que o efeito psicológico de percepção dos sintomas tenha influenciado no tamanho da prole de indivíduos com DMJ.

8.2.3. As mulheres doentes, já eméritas, tiveram o primeiro filho mais precocemente do que suas parentes assintomáticas. Da mesma forma, as mulheres doentes que informaram sua menopausa a tiveram significativamente mais cedo do que as mulheres da população. Esses dados são bastante sugestivos de que a maturação sexual e o subsequente declínio foram ambos, acelerados nas portadoras da DMJ.

8.3. A idade de início dos sintomas repercutiu, ainda que com uma correlação fraca, na fecundidade. As mulheres cuja idade de início dos sintomas foi precoce tiveram menos filhos do que aquelas cujos sintomas iniciaram mais tarde.

8.4. A prevalência da DMJ pode ser melhor estimada do que anteriormente, frente aos dados sobre um grande número de indivíduos doentes, aos quais tivemos acesso. O número encontrado de 3,5 doentes:100.000 habitantes continua sendo uma sub-estimativa, já que o presente estudo não foi, de fato, um estudo transversal e nem cobriu toda a população do nosso Estado.

Em conclusão, a presença da mutação DMJ conferiu um valor adaptativo aumentado às suas portadoras eméritas, quando comparadas às não portadoras eméritas, e a mesma tendência apareceu nas comparações feitas com a população geral. O aumento no valor adaptativo não parece ter sido influenciado por fatores psicológicos ou secundários, mas parece ter uma base biológica, ainda de natureza desconhecida.

9. Referências Bibliográficas

- Bauer PO, Kotliarova SE, Matoska V, Musova Z, Hedvicakova P, Boday A, Tomek A, Nukina N, Goetz P (2005) Fluorescent multiplex PCR – fast method for autosomal dominant spinocerebellar ataxias screening. *Genetika*, 41(6): 830-837.
- DeStefano AL, Ferrer LA, Maciel P, Gaspar C, Rouleau GA, Coutinho P, Sequeiros J (1995) Gender equality in Machado-Joseph disease. *Nature Genet*, 11:118-119.
- Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Chneiweiss H, Agid Y, Feingold J, Brice A (1995) Gender equality in Machado-Joseph disease. *Nature Genet*, 11:118–119.
- Frontali M, Sabbadini G, Novelletto A, Jodice C, Naso F, Spadaro M, Giunti P, Jacopini AG, Veneziano L, Mantuano E, Malaspina P, Ulizzi L, Brice A, Durr A, Terrenato L (1996) Genetic fitness in Huntington's Disease and Spinocerebellar Ataxia 1: a population genetics model for CAG repeat expansions. *Ann Hum Genet*, 60(Pt 5):423-35.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, Goto J, Arvidsson K, Dias A, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Lima M, Zhou YX, Soong BW, Watanabe M, Giunti P, Stevanin G, Riess O, Sasaki H, Hsieh M, Nicholson GA, Brunt E, Higgins JJ, Lauritzen M, Tranebjaerg L, Volpini V, Wood N, Ranum L, Tsuji S, Brice A, Sequeiros J, Rouleau GA (2001) Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68:523-528.
- Harper P (1997) Trinucleotide repeat disorders. *J Inher Metab Dis*, 20: 122–124.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003) Censo Demográfico 2000 – Nupcialidade e Fecundidade, Resultados da Amostra. Rio de Janeiro, 218pp.
- Ikeuchi T, Igarshi S, Takiyama Y, Onodera O, Oyake M, Takano H, Koide R, Tanaka H; Tsuji S (1996) Non-mendelian transmission in dentatorubralpallidolysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet*, 58: 730–733.
- Iughetti P, Otto PA, Zatz M; Passos-Bueno MR (1998) Different behavior in the paternal vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet*, 77: 246–248.

- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001a) Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand*, 104: 224-231.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Moreira MC, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J and Giugliani R (2001b) A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 39 families with Machado-Joseph disease, SCA7 and SCA8. *J Neurol*, 248: 870-876.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, *et al* (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet*, 8: 221-8.
- Leeflang EP, McPeck MS, Arnheim N (1996) Analysis of meiotic segregation, using single-sperm typing: meiotic drive at the myotonic dystrophy locus. *Am J Hum Genet*. 59:896-904.
- Lima M, Mayer F, Coutinho P, Abade A (1997) Prevalence, geographic distribution, and genealogical investigation of Machado-Joseph disease in the Azores (Portugal). *Hum Biol*. 69(3):383-91.
- Lima M, Smith MT, Silva C, Abade A, Mayer FM, Coutinho P (2001) Natural selection at the MJD locus: phenotypic diversity, survival and fertility among Machado-Joseph Disease patients from the Azores. *J Biosoc Sci*. 33(3):361-73.
- Lopes-Cendes I, Maciel P, Kish S, Gaspar C, Robitaille Y, Clark HB, Koeppen AH, Nance M, Schut L, Silveira I, Coutinho P, Sequeiros J, Rouleau GA (1996) Somatic mosaicism in the central nervous system in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease. *Ann Neurol*. 40:199-206.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57:54-61.
- Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Sequeiros J, Rouleau GA (1997) Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet*. 60:993-6.

- Martin GM (2001) Genetics and Aging. In: Scriver CR, Beaudet *al*, Sly WS, Valle D (eds): The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York, p 215-223.
- Martins S, Calafell F, Gaspar C, Silveira I, Wong V, Hsieh M, Soong B-W, Tranebjaerg L, Brunt E, Nicholson GA, Tsuji S, Watanabe M, Jardim L, Riess O, Wood N, Sasaki H, Ranum L, Brice A, Rouleau G, Coutinho P, Amorim A, Sequeiros J. The worldwide spread mutational event in Machado-Joseph disease has an Asian origin. Arch of Neurol, in press.
- Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Nishio T, *et al* (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. Human Molec Genet, 4:807-812.
- Nakano KK, Dawson DM and Spence A (1972) Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. Neurology, 22:49-55.
- Paúl MC (1997) Genética psicossocial: o estudo das atitudes face a realização do teste preditivo da Doença de Machado Joseph. Psicologia: teoria, investigação e prática, 2:241-250.
- Pedro, A.O., Pinto-Neto, A.M., Paiva, L.H.S.C., Osis, M.J., Hardy, E. (2003) Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. *Cad. Saúde Pública* 19, 17-25.
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976) Autosomal dominant striatonigral degeneration. Neurology, 26:703-714.
- Sequeiros J, Coutinho P (1993) Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. *Adv Neurol* 1993, 61:139-153
- Sequeiros J (1996) O teste preditivo da Doença de Machado-Joseph. UnIGENE, IBMC. Porto.
- Stine GJ (1989) The New Human Genetics, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 499pp.

- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Edo K, Ohta S *et al* (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet*, 4:300-4.
- Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, Endo K, Rogaev EI, Tanaka H, Sherrington R, Sanpei K, Liang Y, Saito M, *et al* (1995) Evidence for intergenerational instability in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Molec Genet*, 4: 1137-1146.
- Thompson JS, Thompson MW (1993) *Genética Médica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 339 pp.
- Vogel F, Motulsky AG (1997) *Human Genetics – problems and approaches*. Third edition. Springer Verlag, New York, 900pp.
- Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11:398.
- Woods BT and Schaumburg HH (1972) Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci*, 17:149-166.
- Zatz M, Cerqueira A, Vainzof M, Passos-Bueno MR (1997) Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DMJ families. *J Med Genet*, 34:790-1.

10. Fontes on-line

<http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=8888891&key=NJCYfdXJAm6zl&fcn=y&fw=Bz30&filename=/about/content/anticipation.html> (acessado em janeiro de 2007a).

<http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=8888890&key=Jb4W2KpoXYiGw&gry=IN SERTGRY&fcn=y&fw=OUzR&filename=/glossary/profiles/ataxias/worldmap.html> (acessado em janeiro de 2007b).

11. Anexos

11.1. Aprovação deste projeto pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

11.2. Termo de consentimento.

11.3. Liberação dos recursos financeiros pelo FIPE para a realização deste projeto.

11.4. Questionários aplicados durante o desenvolvimento da pesquisa.

11.5. Resumos enviados para congressos e semanas científicas.

11.6. Instruções para publicação na revista escolhida para submissão do artigo científico.