

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS NA DOENÇA DE MACHADO
JOSEPH**

GERSON DA SILVA CARVALHO

Porto Alegre
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS NA DOENÇA DE MACHADO
JOSEPH**

GERSON DA SILVA CARVALHO

Orientadora: Prof^a. Dra. Laura Bannach Jardim

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

*“Vem dias..., em que o que lava se seguirá ao que ceifa,
e o que pisa as uvas, aos que lançam as sementes,
e os montes destilarão vinho novo”*

Amós 9:13

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional manifestado pela oportunidade de aprender, superar e acreditar naquilo que não se vê e não se palpa, mas move meu dia-a-dia por meio da obstinação e resiliência. Gratidão eterna.

Aos meus pais, Gervásio (*in memoriam*) e Francisca, pelos ensinamentos e pelo amor que foram plantados, sem muitas vezes eles terem noção, mas que muito surte em efeito. Com amor.

Aos meus irmãos: Geane, Geciara, Geovânia, Gênova, Carvalho (*in memoriam*), Genalva (*in memoriam*), Gercilda, Gercineide e Gonçalo pelo carinho, amizade e exemplo de superação. Estes amigos são mais que irmãos. Com amor.

Aos pacientes e suas famílias, pela coparticipação e por confiar o cuidado. Com carinho.

À Prof^ª. Dra. Laura Jardim Bannach pela maestria e paciência. Um marco na minha formação acadêmica, na minha vida profissional e por me possibilitar aprender com as mais variadas circunstâncias no processo de aprendizado. Com respeito.

Ao colega Dr. Jonas Saute, pela contribuição e disponibilidade. Com admiração.

Ao Prof. Luiz Valmor Portella e à colega Clarissa Hass que tornaram possível a realização da metodologia deste trabalho. Um grande abraço.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção – INCT pelos insumos de financiamento. Muito Obrigado.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos ensinamentos. Com admiração.

Aos colegas do Núcleo de Genética Médica do Distrito Federal e do Hospital da Criança José de Alencar pela confiança, parceria e incentivo. Com carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médica (PPGCM/UFRGS), em especial, a Vera Susana Vargas Ribeiro, por ser uma importante mediadora acadêmica. Obrigado.

GERSON DA SILVA CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS NA DOENÇA DE MACHADO JOSEPH

Esta Dissertação foi julgada e aprovada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Prof. Dr. Fernando Kok

Prof^ª. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Prof^ª. Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza

Prof^ª. Dra. Carmen Regla Vargas

RESUMO

A Doença de Machado Joseph (DMJ) é uma doença genética autossômica dominante de início na vida adulta que afeta a coordenação motora e cursa com sintomas neurodegenerativos. É causada por uma expansão da repetição CAG no gene *ATXN3*. Há várias hipóteses a respeito da sua fisiopatogenia, e uma delas envolve a resposta inflamatória. O objetivo deste estudo foi descrever as concentrações séricas das citocinas em indivíduos sintomáticos, assintomáticos e compará-los com os controles saudáveis. Após a confirmação molecular dos pacientes e controles pareados por sexo e idade, os indivíduos foram convidados a participar do estudo. A idade de início e a duração da doença foram obtidas, e as escalas clínicas Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA), Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxias (NESSCA), SCA Functional Index (SCAFI), and Composite Cerebellar Functional Score (CCFS), aplicadas. O soro dos indivíduos foi coletado e um painel de citocina foi realizado, incluindo a Eotaxina, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1b, IL-1Ra, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP1a, MIP1b, RANTES e O TNF- α . Entre os indivíduos sintomáticos, o painel foi repetido após 90 e 360 dias. O perfil das citocinas no *baseline* foi estudado por análise discriminante. Aquelas que apresentaram alterações relevantes entre os grupos tiveram seus níveis sérico reavaliados após 90 e 360 dias e estes dados foram avaliados pela equação de estimação generalizada (GEE). Sessenta e seis sintomáticos, 13 assintomáticos e 43 controles foram estudados. Quando comparados os sintomáticos e assintomáticos com seus respectivos controles saudáveis, não se observou diferenças nos padrões das citocinas. No entanto, apenas uma citocina teve destaque: os níveis séricos de Eotaxina foram significativamente mais elevados em assintomáticos ($p = 0,001$, ANCOVA) e entre os sintomáticos seus níveis foram menores após 360 dias do que naquelas obtidas no início do estudo ($p = 0,039$, GEE). A idade, a duração da doença, a expansão CAG, e as escalas NESSCA e SARA não se correlacionaram com os níveis das citocinas. O padrão relativamente benigno de citocinas em portadores sintomáticos sugere que a ativação da micróglia não seja primordial na DMJ. Entretanto, os níveis de eotaxina, um peptídeo secretado por astrócitos para repelir as células imunes circulantes, foram elevados no grupo assintomático, o que sugere que uma resposta específica destas células pode estar relacionada com a ausência de sintomas e/ou que a perda de astrócitos estaria relacionada à progressão da doença em DMJ.

Palavras-chaves: Citocinas, Análise discriminante, Eotaxina, Doença de Machado-Joseph, Neuroproteção, Ataxia Espinocerebelar Tipo 3.

ABSTRACT

Machado Joseph Disease (MJD) is an autosomal dominant genetic disease of adulthood which affects motor coordination and progresses with neurodegenerative symptoms. It is caused by an expansion of the CAG repeat at *ATXN3* gene. There are several hypotheses about its pathogenesis, and one of them involves the inflammatory response. The aim of the present study is to describe the serum concentrations of a broad spectrum of cytokines in symptomatic and asymptomatic carriers of Machado Joseph disease (SCA3/MJD) CAG expansions. Molecularly confirmed carriers and controls were studied. Age at onset, disease duration, and clinical scales Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA), Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxias (NESSCA), SCA Functional Index (SCAFI), and Composite Cerebellar Functional Score (CCFS) were obtained from the symptomatic carriers. Serum was obtained from all individuals and a cytokine panel consisted of eotaxin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- α , IFN- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, interferon gamma-induced protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, monokine induced by gamma interferon (MIG), macrophage inflammatory protein (MIP)-a, MIP-b, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and tumor necrosis factor (TNF)- α was analyzed. In a subgroup of symptomatic carriers, the cytokine panel was repeated after 90 and 360 days. Cytokine distribution among groups was studied by discriminant analysis; changes in serum levels after 90 and 360 days were studied by generalized estimation equation. Sixty-six symptomatic carriers, 13 asymptomatic carriers, and 43 controls were studied. No differences in cytokine patterns were found between controls and carriers of the CAG expansions or between controls and symptomatic carriers only. In contrast, eotaxin concentrations were significantly higher in asymptomatic than in symptomatic carriers or in controls ($p = 0.001$, ANCOVA). Eotaxin did not correlate with age, disease duration, CAG expansion, NESSCA score, and SARA score. Among symptomatic carriers, eotaxin dropped after 360 days ($p = 0.039$, GEE). SCA3/ MJD patients presented a benign pattern of serum cytokines. In contrast, levels of eotaxin, a peptide secreted by astrocytes, were elevated in the asymptomatic carriers, suggesting that a specific response of these cells can be related to symptom progression, in SCA3/MJD.

Keywords: Cytokines, Discriminant analysis, Eotaxin, Machado Joseph disease, Neuroprotection, Spinocerebellar ataxia type 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo e citações em revisão literatura de acordo com os critérios de inclusão. Página 14

Figura 2. O papel do Sistema Imune na Doença de Huntington. Página 22

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

ANCOVA	Análise de Covariância
ATXN2	Ataxina 2
ATXN3	Ataxina 3
ATX3e	Ataxina 3 expandida
ATX3n	Ataxina 3 normal
CAG	Trinucleotídeo Citocina-Adenina-Guanina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCFS	<i>Composite Cerebellar Functional Score</i>
DH	Doença de Huntington
DMJ	Doença de Machado Joseph
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GEE	Equação de Estimação Generalizada
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
GRIK2	Gene do Receptor Ionotrópico do Glutamato Cinase 2
HAT	Histonas Acetiltransferases
HDAC	Histonas Deacetiltransferases
HSP27	Proteínas heat shock de 27kD
HSP40	Proteínas heat shock de 40kD
HSP70	Proteínas heat shock de 70kD
ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
Ilha CpG	Regiões do DNA ricas em Citocina-Guanina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1RA	Antagonista do Receptor da Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor da Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL- 12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IP-10	Proteína de Indução do Interferon gama
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócito
MIG	Monoquina Induzida por Interferon gama
MIP-a	Proteína Inflamatória de Macrófago alfa
MIP-b	Proteína Inflamatória de Macrófago beta
MSH2	<i>Mismatch Repair Protein 2</i>
NEDD8	Células Precursoras Neurais 8
NEDD9	Células Precursoras Neurais 9
NESSCA	<i>Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxias</i>
NI	Inclusões Intraneuronais
PCAF	Fator associado ao CREB/p300
PoliQs	Poliglutaminas
P300-CBP	Família de acetiltransferases de histonas estruturalmente relacionadas a proteína de ligação ao CREB(<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>)
RANTES	Regulada na Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada
SARA	<i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i>
SCA1	Ataxia Espinocerebelar tipo 1
SCA2	Ataxia Espinocerebelar tipo 2
SCA3	Ataxia Espinocerebelar tipo 3
SCA6	Ataxia Espinocerebelar tipo 6
SCAFI	<i>Spinocerebellar Ataxia Functional Index</i>
SciELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UIMs	Ubiquitina
UPS	Sistema de Ubiquitina-Proteassoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Estratégias de busca de informação.....	14
2.2 Doenças de Machado Joseph/ Ataxia de Machado Joseph.....	15
2.2.1 Conceito	15
2.2.2 Funções da ataxina	16
2.2.3 Manifestações Clínicas e História Natural	17
2.2.4 Fatores modificadores da doença.....	19
2.2.4.1 O papel das expansões na determinação do fenótipo.....	19
2.2.4.2 O papel do alelo normal.....	19
2.2.4.3 A metilação do promotor do gene <i>ATXN3</i>	19
2.2.4.4 Genes modificadores do fenótipo	19
2.2.5 O Sistema Imune e as Poliglutaminopatias	20
3. MARCO TEÓRICO	22
4. JUSTIFICATIVA	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivos geral.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
7. ARTIGO	33
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	42
10. ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO

As poliglutaminopatias (PoliQ) são um grupo de doenças formado pelas Ataxias Espinocerebelares tipo (SCA)1, 2, 3, 6, 7, Doença de Huntington(DH), *Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*(DRPLA) e pela Atrofia Muscular Espinal e Bulbar (SBMA). Em geral, manifestam-se por ataxia de marcha, alteração da coordenação apendicular, disartria, disfagia e diplopia^{1, 2}. Agrupam-se pelo fenótipo e, principalmente, pelo mecanismo causal e patogênico baseados na presença de uma mutação de expansão de uma sequência CAG que codifica uma cadeia de poliglutamina expandida na proteína do gene referente a cada doença³.

A Doença de Machado Joseph, também conhecida SCA3, é uma poliglutaminopatia que ocorre por uma CAG expandida no gene *ATXN3* que codifica Ataxina 3^{4,3}. Foi descrita, inicialmente, em duas famílias, Machado e Joseph, descendentes de portugueses açorianos nos anos 70⁵, desde então é aquela de maior frequência em todo o mundo⁶. No Brasil, dados apontam para uma frequência maior no Rio Grande do Sul, embora as frequências exatas em alguns estados brasileiros sejam desconhecidas⁷. No Rio Grande do Sul, acredita-se que a prevalência desta doença seja devido a um efeito fundador descrito recentemente que se mescla com a história da colonização daquela região por portugueses açorianos⁸.

É uma doença que acomete as famílias de modo autossômico dominante^{9,10}. Sua penetrância é completa e isto justifica o fato de todos aqueles que herdaram o gene da *ATXN* expandida apresentarem sinais e sintomas da doença como repercussão da degeneração cerebelar e de suas vias aferentes e eferentes. De modo geral, apresentam sintomas por volta dos 32 aos 36 anos^{11,12}. A variação intra e interfamiliar da apresentação clínica se dá por fatores diversos, embora o tamanho da expansão seja o mais pronunciado frente aos demais. Há o fenômeno de antecipação e isto é um importante determinante como agravante na sua apresentação clínica como também na precocidade da manifestação da doença ao influenciar diretamente na sobrevivência dos pacientes, que uma vez iniciados os sintomas, é em média 21 anos¹³.

Apesar de não haver um tratamento curativo, as famílias devem ser acolhidas e acompanhadas por uma equipe multiprofissional. O objetivo desta medida é melhorar a qualidade de vida dos acometidos por meio de suporte diagnóstico psicológico, fisioterápico, fonoaudiológico e clínico. Não há tratamento curativo e, portanto, o aconselhamento genético não diretivo, além da disponibilidade de realização de testes preditivos nos estágios precoces da vida reprodutiva em descendentes de pacientes acometidos, são medidas de intervenção valiosas na prevenção de novos casos na família.

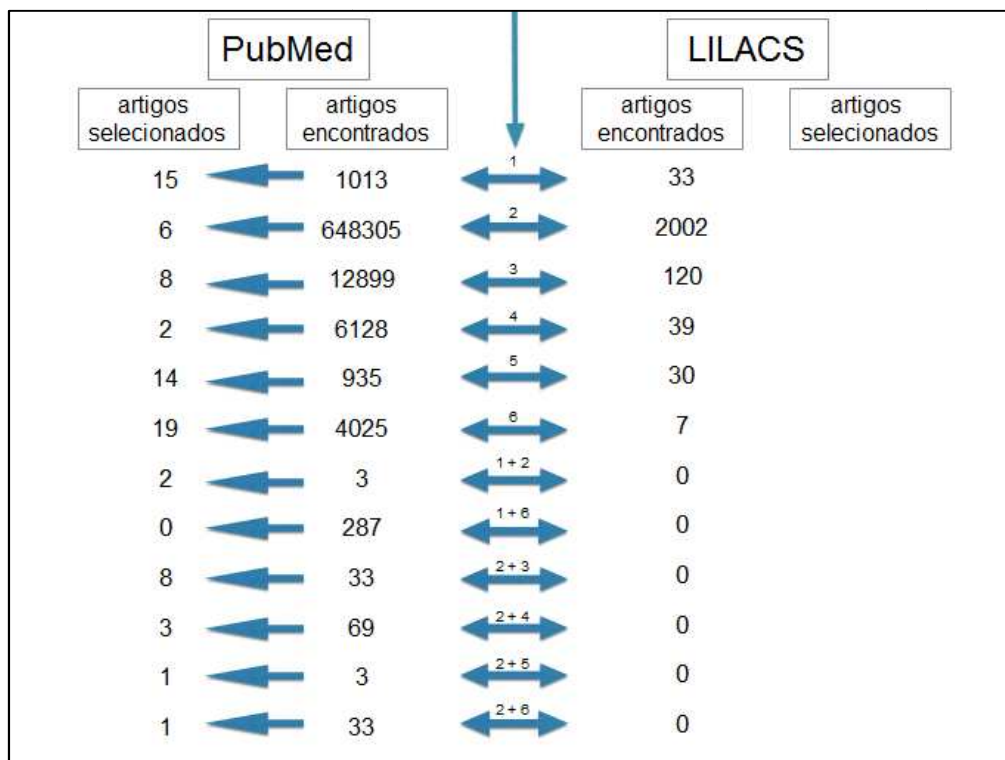
Enquanto isto, embora alguns estudos se aprofundam na compreensão de fatores patogênicos já descritos em outras doenças como Doença de Huntington, pouco se sabe sobre a participação do sistema imunológico na fisiopatologia da Doença de Machado Joseph^{14,15,16,17}. Sendo assim, este estudo visa levantar indícios de envolvimento de uma resposta imune diante da apresentação de uma proteína mutada e expandida às células do sistema imunológico ao analisar substâncias sinalizadoras, como as citocinas, produzidas em virtude de uma possível interação entre a proteína mudada, a célula apresentadora de antígeno do sistema nervoso central, os astrócitos, e os neurônios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estratégias de Busca de Informação

O referencial teórico e a revisão da literatura foram destinados a apresentar aspectos gerais da Doença de Machado Joseph, seus aspectos fisiopatológicos e em especial, sua correlação com as citocinas. Devido às poucas informações produzidas nessa área da ciência, utilizamos informações já produzidas em doenças como doença de Huntington e SCA 6, ambas poliglutaminopatias e com fisiopatologia similar que servem de embasamento para o nosso desafio científico. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS e PubMed. Foram realizadas buscas através dos termos “*Spinocerebellar ataxia type 3*”, “*Cytokines*”, “*Huntington disease*”, “*Spinocerebellar ataxia type 6*”, “*Machado-joseph disease*”, “*Polyglutamine*” e suas combinações. Outros artigos pertinentes tiveram suas referências incluídas uma vez que informações importantes foram extraídas deles para complementar o conhecimento.

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo e citações em revisão literatura de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos pelo autor.



Legenda

1 - *Spinocerebellar ataxia type 3* 2 - *Cytokines* 3 - *Huntington disease*
 4 - *Spinocerebellar ataxia type 6* 5 - *Machado-Joseph disease* 6 - *Polyglutamine*

2.2 Doenças de Machado Joseph/ Ataxia de Machado Joseph

2.2.1 Conceito

As ataxias são um grupo de distúrbios neurológicos que afeta em variados graus as vias que controlam a coordenação motora. As ataxias espinocerebelares (SCAs) - de transmissão autossômica dominante – acometem o sistema neurológico, em especial o sistema nervoso central, com predomínio de alterações no cerebelo, tronco cerebral e trato espinocerebelar¹⁸.

A Doença de Machado Joseph (DMJ), também conhecida como ataxia espinocerebelar tipo 3, é a SCAs mais prevalente em todo mundo (0,3-2:100.000)^{19, 20, 18, 21}, especialmente em países onde a colonização portuguesa e açoriana. Na Ilha de Flores, sua prevalência chega a 1:140 habitantes^{22, 12}. No Rio Grande do Sul, a sua prevalência mínima estimada de 3-6 casos para cada 100.000 habitantes²³.

A DMJ é causada por uma expansão de seqüência repetitiva CAG no locus *ATXN3*, localizado no 14q32.1. Repetições acima de um limiar superior ao redor de 54-56 repetições são consideradas patogênicas e a sua penetrância é completa, ou seja, ao se herdar um gene com a expansão, o paciente inexoravelmente apresentará sintomas da doença^{9, 10}. O alelo expandido é dominante e existe uma forte correlação entre o tamanho da expansão e a gravidade da doença^{24, 25, 26}. Essas expansões codificam repetições de poliglutaminas (PoliQ). Este mesmo mecanismo de mutação também ocorre em outras doenças como na Atrofia Muscular Espinhal e Bulbar, Doença de Huntington e em outras SCAs. Este grupo de afecções está sendo reconhecido recentemente por poliglutaminopatias^{27, 28}.

Um marco patológico da DMJ é a formação de agregados intranucleares neuronais (NI) compostos por tratos de PoliQ expandidas. O exato papel desses agregados não está bem estabelecido. Acredita-se que a estrutura terciária das poliQs seja anômala e tenha propensão à agregação, levando a um ganho de função tóxica às células³. Estes agregados são resultantes da interação das PoliQ expandidas de conformação *misfolded* com ubiquitinas e com chaperonas. Várias SCAs são causadas por expansões de poliQs em sua proteínas relacionadas, que em geral recebem o nome de “ataxina” (ataxina 1, 2, 3 etc). Além de terem em comum a estrutura de poliQ expandidas, elas compartilham sintomas entre as condições causadas pelas ataxinas alteradas (ataxina 1 na SCA1, ataxina 2 na SCA2 etc), com neurodegeneração, em especial, do cerebelo e de núcleos do tronco cerebral. As inclusões intraneurais antecedem os sintomas nos pacientes e são encontradas em todas as regiões

afetadas do sistema nervoso e também em estruturas em que não há lesão neuronal, como o córtex cerebral, o tálamo, o *striatum* e a oliva inferior.

2.2.2 Funções da Ataxina 3 (ATXN3)

A ATXN3 é um peptídeo encontrado nas células tanto no citoplasma como no núcleo. Existem várias evidências de que a ATXN3 participa do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), fora do núcleo. Ela interage com a ubiquitina (UIMs)^{29,30,31}, age como uma protease ubiquitina-específica^{32, 33, 34}, que por sua vez está envolvida no reconhecimento de substratos proteolíticos pelo proteassoma³⁵⁻³⁶, e regula a formação de agressomas³⁷. O resultado dessas interações é a supressão da toxicidade induzida pelas poliQ³⁸.

A respeito da função nuclear da ATXN3, um estudo demonstrou que a ATXN3 pode regular a transcrição ao interagir diretamente com os fatores de transcrição CBP, p300 e PCAF através do domínio C terminal, no qual estão contidas as repetições CAG. Além disso, mostrou-se que as repetições CAG estão na região de maior importância para essa interação³⁹. Logo, alterações nestas regiões podem acarretar problemas de função da ATXN3.

A ATXN3 expandida (ATX3e) interage com esses fatores de transcrição melhor ou mais intensamente do que a ATX3 normal, e, como o esperado, reprime a transcrição mediada por esses fatores. Esta linha de evidências sustenta a hipótese de que a ATXN3 aja como um repressor da transcrição nuclear e que esta função talvez possa sofrer alterações com a estrutura de glutaminas expandidas. A repressão da transcrição relacionada à ATXN3 dá-se via inibição da acetiltransferase das histonas (HAT), afetando aqueles coativadores transcripcionais (cAMP response element-binding protein (CREB) binding protein (CBP), o p300, e o fator p300/CBP-associado, ou PCAF)³⁹. Os coativadores transcripcionais por meio da atividade HAT promovem a acetilação das histonas, com a finalidade de alcançar a ativação da transcrição⁴⁰. Ao contrário, a desacetilação das histonas via deacetilases de histona (HDAC) torna os promotores gênicos inacessíveis aos seus fatores reguladores⁴¹. O equilíbrio entre acetilação e desacetilação de histonas pode ser um processo chave na patogênese das poliQ em geral e a expansão de suas repetições pode alterar este equilíbrio.

Expressões diferenciais de alguns genes já foram documentadas em modelos celulares e em células cerebrais na DMJ⁴². Vários genes ficam subregulados na presença da ATX3n e hiperregulados na presença da ATX3e, sugerindo que a ATXN3 normal seja um repressor transcripcional que se perde nas situações de expansão das poliQs. Nesse modelo de patogênese, perdas e ganhos de função se confundem: pois a perda da função normal da ATX3n associa-se a um ganho de função via expressões alteradas daqueles genes.

É possível, que alguns destes eventos relacionados à função da ATXN3 sejam os principais protagonistas na fisiopatologia da DMJ. Fenômenos como a antecipação e a associação entre CAG expandido e gravidade/idade de início não excluem o mecanismo da perda de função da ATXN3. Desse modo, o tamanho da expansão CAG poderia teoricamente determinar diferentes graus de perda de função da ATXN3.

A respeito das funções da ATXN3 no citoplasma, o conhecimento também é escasso e impreciso, pois não se sabe com certeza qual o papel tóxico da agregação das poliglutaminas. Porém, existem evidências de que ocorram alterações nos mecanismos de controle da qualidade protéica intracelular⁴³.

Vários mecanismos de controle celular devem regular os níveis de proteínas propensas à agregação. As chaperonas moleculares estão entre estas proteínas, incluindo as chaperonas da família das proteínas heat shock HSP40/HSP70. A super-expressão da HSP70 e da HSP40 reduz a agregação e a morte celular em modelos celulares da doença de Huntington e das SCAs⁴⁴. A HSP27, como as anteriores, também suprime a morte celular relacionada às poliQ, mas em contraste com as anteriores HSP40 e HSP70, a HSP27 impede a morte celular por meio da redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio presentes mas sem suprimir a agregação das poliQ.

2.2.3 Manifestações Clínicas e História Natural

A DMJ é uma doença autossômica dominante com penetrância completa e expressividade variável, ou seja, apresenta uma expressão clínica heterogênea intra e interfamiliar, com manifestações clínicas abrangendo múltiplos sistemas neurológicos⁴³. Esta variabilidade fenotípica resultou na classificação em diferentes subtipos clínicos com evoluções clínicas, idade de início e envolvimento de sistemas neurológicos distintos^{45,46}. No entanto, em todos os casos, a doença tem um curso invariavelmente progressivo. Os pacientes evoluem com dependência funcional e com isolamento social. Não há tratamentos curativos para a condição, mas sabe-se que os cuidados paliativos e a medicina de reabilitação contribuem de modo substancial para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Estima-se que a sobrevivência média após o início da doença seja de 21 anos⁴⁷.

Frente à necessidade de graduar a evolução da doença e a progressão dos sintomas, diversos instrumentos de avaliação da gravidade clínica foram desenvolvidos nos últimos anos. Para as manifestações atáxicas, duas escalas clínicas têm se destacado. A primeira publicada foi a International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) avalia o distúrbio de marcha, de postura, a disartria, a ataxia dos membros e distúrbio do movimento ocular⁴⁸. A

Scale for Assessment and Rating of Ataxia (SARA), de mais rápida aplicação, apareceu em 2006 e se utiliza de testes que avaliam o grau da ataxia de marcha, da dismetria, da desdiadococinesia, das alterações posturais e da disartria⁴⁹. Para medir a progressão global das manifestações neurológicas, nosso grupo desenvolveu ainda a escala NESSCA que avalia a ataxia de marcha e de membros, alterações do movimento ocular e da sua musculatura extrínseca, achados piramidais, disartria, disfagia, fasciculações, perdas sensitivas, distonia, rigidez, bradicinesia, atrofia muscular, funções esfinterianas, câimbras e vertigem⁴⁷.

O surgimento de escores validados de acometimento neurológico nas SCAs permitiu o adequado estudo da progressão destas doenças. Com relação a estudos prospectivos, em uma pequena coorte de pacientes com DMJ acompanhados por 13 meses foi demonstrada a piora de 4,7 /100 pontos da escala ICARS ao final de 1 ano de evolução da doença⁵⁰. A progressão de diferentes SCAs foi avaliada por meio da escala SARA e os resultados mostraram que a progressão ocorre em média de 1.38/40 pontos ao ano⁵¹.

Nosso grupo realizou um estudo de coorte para avaliar a evolução da doença. Em 10 anos de seguimento, 105 pacientes foram acompanhados através da escala NESSCA. Nesse estudo, foi mostrada uma piora linear das manifestações neurológicas, da ordem de 1.26/40 pontos da escala NESSCA ao ano⁵². Além disso, foi observado que quanto maior a expansão CAG, maior era o escala NESSCA, logo, mais rápida era a sua progressão. Assim existe uma concordância entre as escalas de modo que ao utilizar qualquer uma destes instrumentos observa-se que a progressão média da DMJ é lentamente progressiva.

Posteriormente, Jacobi e colaboradores⁵³ também estudaram a progressão das Ataxias espinocerebelares 1, 2, 3 e 6. Utilizaram as escalas SARA e o Inventário de Sinais Não Atáxicos (INAS) em 526 pacientes. Observaram que a progressão anual da escala SARA era de 2,11/40 em pacientes com SCA1, 1,49/40 naqueles com SCA2, 1,56/40 nos pacientes com SCA3 e 0,80/40 nos pacientes com SCA6. A idade de início dos sintomas e o tamanho da expansão estavam associados à progressão rápida da escala SARA em SCA1 e 2, respectivamente. Em mulheres com SCA3, a precocidade dos sintomas foi associada com a progressão dos sintomas não atáxicos. Estes achados sugerem um efeito biológico do tamanho da expansão na dinâmica da progressão da doença. Para SCA 3 e 6 não encontraram fatores que afetassem a progressão da escala SARA.

2.2.4 Fatores Modificadores da Doença

Dentre os fatores modificadores que explicam a variada expressão fenotípica da doença, sem dúvida o tamanho da expressão CAG no alelo mutado é o que mais se destaca. E

isto se deve ao fato de, por meio deste parâmetro, ser possível definir o subtipo clínico da doença, a idade de início dos sintomas e a gravidade da doença. Entretanto, a expansão CAG é considerada como responsável por apenas 45-60% da variação da idade de início da DMJ^{54,55,56}. Assim, outros fatores genéticos e/ou ambientais estão devem contribuir de modo importante para a expressão fenotípica da doença.

2.2.4.1 O Papel das Expansões na Determinação do Fenótipo

Está muito estabelecido que as expansões determinam de modo primordial na determinação do fenótipo entre os pacientes com DMJ. Quanto maior for a expansão, mais precoce é o início da doença. Além disso, os alelos expandidos tendem a continuar se expandindo, e, na maioria das doenças causadas por poliQ, isso acontece com mais intensidade quando os alelos atravessam meioses paternas. Os mecanismos moleculares subjacentes às contrações e às expansões permanecem ainda pouco compreendidos. O que se sabe é que o motivo repetitivo em *cis* pode influenciar na instabilidade da expansão^{57,58}.

2.2.4.2 O Papel do Alelo Normal

Há fortes evidências que elementos em *trans* podem afetar a instabilidade da repetição. A identificação desses elementos tem sido difícil. Os candidatos incluem genes de reparo do DNA como o MSH2, um componente da rota de reparo que poderia facilitar expansões ao se ligar e estabilizar a estrutura em *hairpin*⁵⁹. Recombinações meióticas e/ou conversão gênica também poderiam influenciar a instabilidade CAG⁵⁸.

2.2.4.3 A Metilação do Promotor do Gene *ATXN3*

Ao reduzir a expressão do gene em si, a metilação do gene pode modular as manifestações clínicas. Foi observada uma possível associação entre o estado de metilação de uma ilha CpG do promotor do gene *ATXN3* e a idade de início da doença⁶⁰. Quanto mais metilada a ilha CpG, mais tardio foi o início da doença, evidência que vai ao encontro da hipótese predominante do ganho de função tóxica.

2.2.4.4 Genes Modificadores do Fenótipo

Há alguns anos, publicamos o efeito do tamanho da repetição CAG no gene *ATXN2* sobre o fenótipo DMJ⁶¹, de modo que, quanto maior o CAG normal no gene da SCA2, maior a chance de os pacientes com DMJ apresentarem fasciculações. Siebert e colaboradores ao considerar o fato que pacientes com Doença de Gaucher podem cursar com manifestações

associadas à Doença de Parkinson, estudaram nove pacientes com DMJ com sintomas parkinsonianos e encontraram que 33%(3/9) apresentavam variações nas sequências dos genes *GBA1*, mostrando que alterações nestes genes podem contribuir para variações fenotípicas da Doença de Machado Joseph⁶².

Bettencourt e colaboradores baseados na hipótese que a expressão alélica diferencial do gene *ATXN3* poderia contribuir para a explicação das diferentes idades de início em pacientes que apresentam tamanhos CAG repetidas semelhantes, analisaram a extensão da variação de sequência a montante do *ATXN3* códon de iniciação. Variações nas regiões reguladoras 5' do gene *ATXN3* poderiam ter o potencial para influenciar os níveis de expressão e, em última análise, modular o fenótipo DMJ. Foi encontrado um SNP (rs3814834) porém nenhum efeito funcional pode ser previsto para esta variante⁶³.

2.2.5 O Sistema Imune e as Poliglutaminopatias

O estudo do sistema imune nas poliglutaminopatias iniciou na era pré-genômica, quando alterações na resposta celular de linfócitos e na migração celular foram relatadas em pacientes com Doença de Huntington (DH)¹⁴. Poucos estudos subsequentes foram realizados a este respeito. A avaliação do plasma de pacientes com DH evidenciou níveis elevados de interleucina 6 e 8^{64, 16}. A concentração aumentada de IL-6 já estava presente por até 16 anos antes da idade prevista de início dos sintomas da doença⁶⁴. Alterações nos níveis de outras citocinas como IL-4, IL-10, TNF- α e IL-5 também foram identificadas nestes pacientes, ainda que não no início, mas sim em estágios moderados da doença⁶⁴.

Não só na DH, mas também na SCA-6, há evidências de envolvimento do sistema imune com a doença. Diversos polimorfismos do gene da Interleucina 1-B foram considerados como fator modificador da SCA-6, independente do tamanho da CAG⁶⁵. Os homozigotos para o alelo G apresentavam idade de início dos sintomas mais precoces comparados aos homozigotos para o alelo A. Portadores do alelo G são considerados como produtores de menor quantidade de IL1B, enquanto os do alelo A são considerados como altamente produtores desta interleucina⁶⁶.

O polimorfismo (rs16944) da IL1B mostrou um efeito significativo sobre a idade de início da DMJ. Assim como na SCA6, os indivíduos DMJ com genótipo GG (ou seja, de baixa expressão da IL1B) apresentaram idades de início mais precoces dos que os portadores do genótipo AA⁶⁷. Além disso, alterações nesta interleucina já foram identificadas em outras doenças neurodegenerativas, podendo a IL1B exercer tanto efeitos protetores quanto tóxicos no sistema nervoso central.

As alterações imunes na DH e demais poliglutaminopatias, sejam elas eventos centrais ou epifenômenos, não necessariamente seriam danosas. Elas poderiam eventualmente tornar os indivíduos mais saudáveis durante a vida reprodutiva e com menor incidência de neoplasias, atuando contra a seleção natural negativa para a doença⁶⁸.

Além disso, o sistema imune também influencia na patogênese das poliglutaminopatias por intermédio da produção de citocinas. Como exemplo, o TNF- α , é uma citocina conhecida como fator de necrose tumoral α ou caquexina e através de suas propriedades hipoanorexigênica promove alterações nutricionais nestas doenças^{1, 69}.

As citocinas são um grande grupo de pequenos peptídeos solúveis que actuam como moléculas de sinalização a fim de regular a inflamação e modular as actividades celulares tais como o crescimento, sobrevivência, diferenciação e reparo de danos celulares⁷⁰.

No sistema nervoso, as citocinas exercem efeito neuromodulador e regulam o neurodesenvolvimento, a neuroinflamação, e a transmissão sináptica⁷⁰. As microglias são células imunológicas responsáveis por administrar a resposta imune inata nos fluidos cerebrais. Em estados de desequilíbrio ocasionados por inflamação, as microglias são activadas emediamente lesão neuronal. A morte neuronal, em cascata, por fim, ocorre provocada pela ação de citocinas pró-inflamatórias, glutamato e espécies reativas de oxigênio, dentre outros fatores⁷⁰. Em resposta a este status inflamatório, ocorre neurodegeneração concomitante de astrócitos, micróglia e remodelamento da microvasculatura. Embora os astrócitos tentem impedir este desequilíbrio através da liberação de outros fatores, a fim de reestabelecer um ambiente que proporcione o reparo do dano tecidual, isto só resulta em amplificação da resposta inflamatória. Assim, com este microambiente pró-inflamatório resultante, é inevitável a neurodegeneração⁷¹.

3. MARCO TEÓRICO

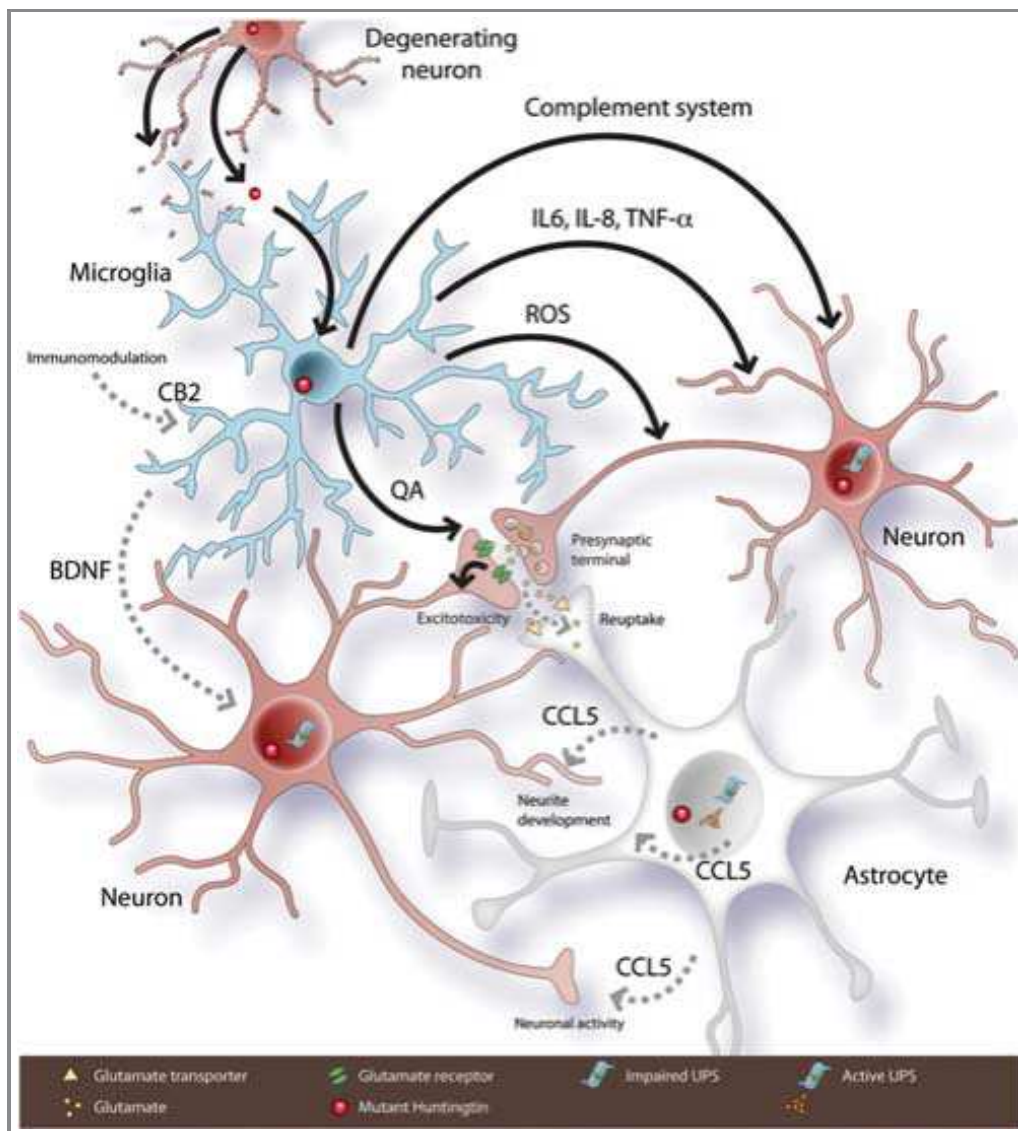


Figura 2 - O papel do Sistema Imune na Doença de Huntington. Adaptado de SOULET D AND CICCETTI(2011)¹⁷.

Frente à escassez de conhecimento da interação do sistema imune e a doença de Machado Joseph, tomamos por base o exemplo da Doença de Huntington (DH). De semelhante modo, trata-se de uma a poliglutaminopatia e partimos daquilo que se tem publicado sobre este assunto relativo à esta doença como referencial para esta pesquisa. Soulet e colaboradores¹⁷ sugeriram que as micróglia sejam fundamentais na patogênese da DH. Foi demonstrado que em meio ao processo inflamatório da DH, a Huntingtina expandida, produto da degeneração e morte neuronal, seja fagocitada pela microglia e a expressão de seus epítomos por estas células seja capaz de ativar o sistema imune. Isto resultaria na ativação

do sistema complemento e secreção de citocinas pro-inflamatórias. O resultado disso, seria a produção de espécies reativas de oxigênio(ROS) e ácido quinólico(QA) prejudiciais às células. Em combinação com os astrócitos, as células da microglia exacerbam a toxicidade celular. Além disso, os astrócitos por ação da huntingtina expandida promovem diminuição da expressão e da secreção de quimiocinas (CCL5) que por sua vez, resultam na diminuição do benefício que estas substâncias têm no desenvolvimento de neurite e atividade neuronal. Microglias reativas são também privadas de promover neuroproteção por meio da liberação constitutiva de seus fatores neutróficos. Além disso, sabe-se que os receptores canabinóides (CB2) na DH modulam a reatividade microglial e a sua expressão pode ser afetada pela expressão de huntingtina expandida.⁶⁵.

Existem várias evidências do envolvimento do sistema imune na DH. Leblhuber e colaboradores⁷², mostraram que pacientes com DH apresentaram níveis séricos aumentados de marcadores inflamatórios neopterin, IgA, TNF α solúvel e o IL-2R. Bjorkqvist, Dalrymple e seus colaboradores¹⁵⁻¹⁶ relataram níveis elevados de interleucinas 6 e 8 em plasma e LCR de pacientes com Doença de Huntington. Alterações nos níveis de IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-5 também foram identificados em pacientes, em estágios iniciais de apresentação da doença. A concentração aumentada de IL-6 já estava presente por até 16 anos antes da idade prevista de início dos sintomas da doença.

Forest e seus colaboradores⁷³ encontraram níveis séricos elevados de IL-23 em pacientes com DH. Observaram que os níveis de IL-23 variavam a depender do estágio de evolução da doença e que a ativação de microglia pela huntingtina expandida levou ao aumento de IL-23 que por sua vez desencadeia aumento nos níveis de IL-6 e 8. Seus estudos foram baseados em estudos anteriores que mostraram que IL-23 está presente em níveis elevados na presença de inflamação e dano cerebral⁷³.

Reflexo desta análise descritiva da patogênese da doença de Huntington e da participação do sistema imune, é que nasce a necessidade de conhecimento das associações do sistema imune na doença de Machado Joseph.

4. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm mostrado o envolvimento de eventos neuroinflamatórios em doenças neurodegenerativas como na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica^{75,76,77,78}. Na Doença de Huntington, uma poliglutaminopatia, há evidências que a ativação do sistema imune ocorre em estágios pre-sintomáticos da doença^{64, 56}.

Anormalidades imunológicas não foram encontradas em modelos de camundongos transgênicos com SCA3/DMJ. No entanto, estes modelos não possuem a parte C-terminal da Ataxina 3. Estes modelos mimetizam uma doença neurodegenerativa que é patologicamente distinta da doença humana, uma vez que esta alteração no gene *ATXN3* dos camundongos modelos não causa um aumento da expansão no gene da Ataxina 3 como é encontrado nos pacientes com Doença de Machado Joseph⁷⁹. Assim, há uma lacuna no conhecimento a respeito dos padrões de citocinas e de anormalidades imunológicas em pacientes com DMJ.

Desta forma, em virtude da falta de conhecimento e da necessidade de maior compreensão sobre as implicações e interações do sistema imunológico na fisiopatologia da DMJ, que delineamos os objetivos deste estudo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivos Gerais

Avaliar o perfil das citocinas de pacientes heterozigotos quanto a presença de alelo mutado no gene *ATXN3*, tanto sintomáticos como pré-sintomáticos, comparando-os com os obtidos em indivíduos controles não relacionados (sem mutações patogênicas).

5.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis séricos de 25 citocinas entre indivíduos com DMJ, indivíduos pré-sintomáticos com mutações patogênicas causadoras de DMJ e indivíduos controles sem mutações patogênicas;
- Correlacionar os níveis das citocinas com a idade de início da doença entre os pacientes com DMJ sintomáticos;
- Correlacionar os níveis das citocinas com o número de repetições de trinucleotídeos nos pacientes com DMJ sintomáticos;
- Correlacionar os níveis das citocinas com a duração da doença nos pacientes com DMJ sintomáticos;
- Descrever a evolução dos níveis das citocinas entre os pacientes com DMJ sintomáticos que apresentarem alterações significativas nos itens anteriores nos dias 1, 90 e 360;
- Correlacionar os níveis das citocinas e o grau de envolvimento neurológico através de escalas clínicas SARA, NESSCA, SCAFI e CCFS dos pacientes com DMJ sintomáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAUTE JAM ET AL. Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *MovDisord*. Mar;26(4):731-5. 2011.
2. JARDIM LB, HAUSER L, KIELING C, SAUTE JA, XAVIER R, RIEDER CR, MONTE TL, CAMEY S, TORMAN VB. Progression Rate of Neurological Deficits in a 10-Year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum*. 2010 May 15.
3. PAULSON HL. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet*. 1999 Feb;64(2):339-45.
4. DÜRR A, STEVANIN G, BRICE A. Spinocerebellar Ataxia 3 and Machado-Joseph Disease: Clinical, Molecular, and Neuropathological Features. *Ann Neurol*. 1996 Apr;39(4):490-9.
5. BETTENCOURT C1, RAPOSO M, KAZACHKOVA N, SANTOS C, KAY T, VASCONCELOS J, MACIEL P, DONIS KC, SARAIVA-PEREIRA ML, JARDIM LB, SEQUEIROS J, BRUGES-ARMAS J, LIMA M. Sequence analysis of 5' regulatory regions of the Machado-Joseph disease gene (*ATXN3*). *Cerebellum*. 2012 Dec;11(4):1045-50. doi: 10.1007/s12311-012-0373-7.
6. SEQUEIROS J, COUTINHO P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol*. 1993;61:139-53.
7. CASTILHOS, R. M. et al. Spinocerebellar ataxias in Brazil-frequencies and modulating effects of related genes. *The Cerebellum*, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2013.
8. CAMARGO G,. Mutação do Gene *ATNX3* da Doença de Machado Joseph no Rio Grande do Sul; Aspectos epidemiológicos e de comportamento Meiótico. UFRGS 2011.
9. TAKIYAMA Y, NISHIZAWA M, TANAKA H. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Gen*1993;4:300-303.
10. KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M ET AL. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 1994;8:221-8.
11. JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML, FERRO A, MOREIRA MC, MENDONÇA P, FERREIRINHA F, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R. A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *Journal of Neurology*, v.248, p.870 - 876, 2001a.
12. TROTT A, JARDIM LB, LUDWIG HT, SAUTE JA, ARTIGALAS O, KIELING C, WANDERLEY HY, RIEDER CR, MONTE TL, SOCIAL M, ALONSO I, FERRO A, CARVALHO T, DO CEU MOREIRA M, MENDONCA P, FERREIRINHA F, SILVEIRA I, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R, SARAIVA-PEREIRA ML. Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet*. 2006;70:173-6.

13. KIELING C, PRESTES PR, SARAIVA-PEREIRA ML, JARDIM LB. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*. 2007. 72: 543-
14. BARKLEY DS, HARDIWIDJAJA SI, TOURTELLOTTE WW, MENKES JH. Cellular immune responses in Huntington disease. Specificity of brain antigenicity detected with Huntington disease lymphocytes. *Neurology*. 1978;28:32-5.
15. BJÖRKQVIST M, WILD EJ, THIELE J, SILVESTRONI A, ANDRE R, LAHIRI N, RAIBON E, LEE RV, BENN CL, SOULET D, MAGNUSSON A, WOODMAN B, LANDLES C, POULADI MA, HAYDEN MR, KHALILI-SHIRAZI A, LOWDELL MW, BRUNDIN P, BATES GP, LEAVITT BR, MÖLLER T, TABRIZI SJ. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med*. 2008;205:1869-77.
16. DALRYMPLE A, WILD EJ, JOUBERT R, SATHASIVAM K, BJÖRKQVIST M, PETERSEN A, JACKSON GS, ISAACS JD, KRISTIANSEN M, BATES GP, LEAVITT BR, KEIR G, WARD M, TABRIZI SJ. Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J Proteome Res*. 2007;6:2833-40.
17. SOULET D, DAND C, CICCHETTI F. The role of immunity in Huntington's disease. *Molecular Psychiatry* (2011) 16, 889–902; doi:10.1038/mp.2011.28; published online 26 April 2011.
18. SCHÖLS L, BAUER P, SCHMIDT T, SCHULTE T, RIESS O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2004 May;3(5):291-304.
19. SILVEIRA I, SEQUEIROS J, 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;46:214-218.
20. WATANABE H, TANAKA F, SOBUE G. Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin Genet* 1998;53:13-19.
21. DÜRR A, STEVANIN G, BRICE A. Spinocerebellar Ataxia 3 and Machado-Joseph Disease: Clinical, Molecular, and Neuropathological Features. *Ann Neurol* 1996;39(4):490-499.
22. JARDIM LB, HAUSER L, KIELING C, SAUTE JA, XAVIER R, RIEDER CR, MONTE TL, CAMEY S, TORMAN VB. Progression Rate of Neurological Deficits in a Year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum*. 2010 May 15.
23. PRESTES PR, SARAIVA-PEREIRA ML, SILVEIRA I, SEQUEIROS J, JARDIM LB. Machado-Joseph disease enhances genetic fitness: a comparison between affected and unaffected women and between MJD and the general population. *Ann Hum Genet*. 2008 Jan;72(Pt 1):57-64. Epub 2007 Aug 7.

24. MACIEL P, GASPAR C, DESTEFANO AL ET AL. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul; 57(1): 54–61.
25. RILEY BE, ORR HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes & Dev* 2006;20:2183-2192.
26. JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML, FERRO A, MOREIRA MC, MENDONÇA P, FERREIRINHA F, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R. A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *Journal of Neurology*, v.248, p.870 - 876, 2001a.
27. MANTO MU. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum*.2005; 4: 2–6.
28. MARIOTTI C, FANCELLU R, DONATO SD. An overview of the patient with ataxia. *J Neurol* (2005) 252: 511–518.
29. BURNETT B, LI F, PITTMAN RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet.* 2003 Dec 1;12(23):3195-205.
30. DONALDSON KM, LI W, CHING KA, BATALOV S, TSAI CC, JOAZEIRO CA. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8892-7.
31. CHAI Y, BERKE SS, COHEN RE, PAULSON HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3605-11.
32. AMERIK AY, HOCHSTRASSER M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *BiochimBiophysActa.* 2004 Nov 29;1695(1-3):189-207.
33. MAO Y, SENIC-MATUGLIA F, DI FIORE PP, POLO S, HODSDON ME, DE CAMILLI P (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl AcadSci USA* 102: 12700–12705.
34. NICASTRO G, MENON RP, MASINO L, KNOWLES PP, MCDONALD NQ, PASTORE A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl AcadSci USA.* 2005 Jul 26;102(30):10493-8. Epub 2005 Jul 14.
35. DOSS-PEPE EW, STENROOS ES, JOHNSON WG, MADURA K (2003) 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* 23:6469-6483.
36. BERKE SS, COHEN RE, PAULSON HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3605-11.

37. Burnett BG, Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005 Mar. 2005 Mar 22;102(12):4330-5. Epub 2005 Mar 14.
38. WARRICK JM, MORABITO LM, BILEN J, GORDESKY-GOLD B, FAUST LZ, PAULSON HL, BONINI NM. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell*. 2005 Apr 1;18(1):37-48.
39. LI F, MACFARLAN T, PITTMAN RN, CHAKRAVARTI D. Ataxin-3 is a Histone-binding Protein with Independent Transcriptional Corepressor Activities. *The Jour Bio Chem* 2002;47:45004-45012
40. TORCHIA J, ROSE DW, INOSTROZA J, KAMEI Y, WESTIN S, GLASS CK, ROSENFELD MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. 1997 Jun12;387(6634):677-84.
41. CHAI Y, BERKE SS, COHEN RE, PAULSON HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3605-11. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*. 1997 May 2;89(3):373-80.
42. EVERT BO, VOGT IR, VIEIRA-SAECKER AM, OZIMEK L, DE VOS RA, BRUNTER, KLOCKGETHER T, WÜLLNER U. Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. "*J Neuropathol Exp Neurol*". Vol. 62. n.º 10 (2003). p. 1006-18.
43. SOONG B, PAULSON HL (2007). Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 20:438-446.
44. WYTTENBACH, A., SAUVAGEOT, O., CARMICHAEL, J., DIAZ-LATOUD, C., ARRIGO, A.-P., RUBINSZTEIN, D. C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1137–1151.
45. SEQUEIROS J, COUTINHO P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol*. 1993;61:139-53.
46. JARDIM LB, PEREIRA ML, SILVEIRA I, FERRO A, SEQUEIROS J, GIUGLIANI R. Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand* 2001b;104:224-231.
47. KIELING C, RIEDER CR, SILVA AC, SAUTE JA, CECCHIN CR, MONTE TL, JARDIM LB. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol*. 2008 Apr;15(4):371-6.
48. TROUILLAS P, TAKAYANAGI T, HALLETT M, CURRIER RD, SUBRAMONY SH, WESSEL K, BRYER A, DIENER HC, MASSAQUOI S, GOMEZ CM, COUTINHO P, BEN

HAMIDA M, CAMPANELLA G, FILLA A, SCHUT L, TIMANN D, HONNORAT J, NIGHOGHOSSIAN N, MANYAM B. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci.* 1997 Feb 12;145(2):205-11.

49. Schmitz-HÜBSCH T, DU MONTCEL ST, BALIKO L, BERCIANO J, BOESCH S, DEPOND T, GIUNTI P, GLOBAS C, INFANTE J, KANG JS, KREMER B, MARIOTTI C, MELEGH B, PANDOLFO M, RAKOWICZ M, RIBAI P, ROLA R, SCHÖLS L, SZYMANSKI S, VAN DE WARRENBURG BP, DÜRR A, Klockgether T, Fancellu R. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology.* 2006. 13;66:1717-20.

50. FRANÇA MC JR, D'ABREU A, NUCCI A, CENDES F, LOPES-CENDES I. Progression of ataxia in patients with Machado-Joseph disease. *Mov Disord.* 2009 May 13;24(9):1387-1390.

51. SCHMITZ-HÜBSCH T, FIMMERS R, RAKOWICZ M, ROLA R, ZDZIENICKA E, FANCELLU R, MARIOTTI C, LINNEMANN C, SCHÖLS L, TIMMANN D, FILLA A, SALVATORE E, INFANTE J, GIUNTI P, LABRUM R, KREMER B, VAN DE WARRENBURG BP, BALIKO L, MELEGH B, DEPOND T, SCHULZ J, DU MONTCEL ST, KLOCKGETHER T. Responsiveness of different rating instruments in spinocerebellar ataxia patients. *Neurology.* 2010 23;74:678-84.

52. JARDIM LB, HAUSER L, KIELING C, SAUTE JA, XAVIER R, RIEDER CR, MONTE TL, CAMEY S, TORMAN VB. Progression Rate of Neurological Deficits in a 10-Year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum.* 2010 Sep;9(3):419-28. doi:10.1007/s12311-010-0179-4.

53. JACOBI H, DU MONTCEL ST, BAUER P, GIUNTI P, COOK A, LABRUM R, PARKINSON MH, DURR A, BRICE A, CHARLES P, MARELLI C, MARIOTTI C, NANETTI L, PANZERI M, RAKOWICZ M, SULEK A, SOBANSKA A, SCHMITZ-HÜBSCH T, SCHÖLS L, HENGEL H, BALIKO L, MELEGH B, FILLA A, ANTENORA A, INFANTE J, BERCIANO J, VAN DE WARRENBURG BP, TIMMANN D, SZYMANSKI S, BOESCH S, KANG JS, PANDOLFO M, SCHULZ JB, MOLHO S, DIALLO A, KLOCKGETHER T. Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* Nov;14(11):1101-8. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00202-1. Epub 2015 Sep 13.

54. MARUYAMA H, NAKAMURA S, MATSUYAMA Z ET AL. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (5): 807–812.

55. 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. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado- Joseph disease. *Am J Hum Genet.* 1995;57:54–61.

56. VAN DE WARRENBURG BP, SINKE RJ, VERSCHUUREN-BEMELMANS CC ET AL. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002; 58: 702–708.

57. MOSELEY ML, SCHUT LJ, BIRD TD, KOOB MD, DAY JW, RANUM LP. SCA8 CTG repeat: en masse contractions in sperm and intergenerational sequence changes may play a role in reduced penetrance. *Hum Mol Genet.* 2000 Sep 1;9(14):2125-30.
58. MARTINS S, COUTINHO P, SILVEIRA I, GIUNTI P, JARDIM LB, CALAFELL F, SEQUEIROS J, AMORIM A. Cis-acting factors promoting the CAG intergenerational instability in Machado-Joseph disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Jun 5;147B(4):439-46.
59. ROLFSMEIER ML, DIXON MJ, LAHUE RS. Mismatch repair blocks expansions of interrupted trinucleotide repeats in yeast. *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1501-7.
60. EMMEL VE, ALONSO, JARDIM LB, SARAIVA-PEREIRA ML, SEQUEIROS J. Does DNA methylation in the promoter region of the *ATXN3* gene modify age-at-onset in Machado-Joseph (MJD/SCA3) patients? *Clin Genet.* 2011 Jan; 79(1):100-2.doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01508.x.
61. JARDIM LB, SILVEIRA I, PEREIRA ML ET AL. Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand* 2003 107 (3): 211-214.
62. SIEBERT M1, DONIS KC, SOCAL M, RIEDER CR, EMMEL VE, VAIRO F, MICHELIN-TIRELLI K, FRANÇA M JR, D'ABREU AC, BETTENCOURT C, LIMA M, LOPES CENDES I, SARAIVA-PEREIRA ML, JARDIM LB. Glucocerebrosidase gene variants in parkinsonian patients with Machado Joseph/spinocerebellar ataxia 3.Parkinsonism RelatDiscord. 2012 Feb;18(2):185-90. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.09.024. Epub 2011 Oct.
63. BETTENCOURT C1, RAPOSO M, KAZACHKOVA N, SANTOS C, KAY T, VASCONCELOS J, MACIEL P, DONIS KC, SARAIVA-PEREIRA ML, JARDIM LB, SEQUEIROS J, BRUGES-ARMAS J, LIMA M.Sequence analysis of 5' regulatory regions of the Machado-Joseph disease gene (*ATXN3*). *Cerebellum.* 2012 Dec;11(4):1045-50. doi: 10.1007/s12311-012-0373-7.
64. BJÖRKQVIST M, WILD EJ, THIELE J, SILVESTRONI A, ANDRE R, LAHIRI N, RAIBON E, LEE RV, BENN CL, SOULET D, MAGNUSSON A, WOODMAN B, LANDLES C, POULADI MA, HAYDEN MR, KHALILI-SHIRAZI A, LOWDELL MW, BRUNDIN P, BATES GP, LEAVITT BR, MÖLLER T, TABRIZI SJ. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med.* 2008;205:1869-77.
65. NISHIMURA M, KAWAKAMI H, MARUYAMA H ET AL. Influence of interleukin-1beta gene polymorphism on age-at-onset of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6) in Japanese patients.*NeurosciLett* 2001: 307: 128-30.
66. EL-OMAR EM, CARRINGTON M, CHOW WH, MCCOLL KE, BREM JH, YOUNG HA, HERRERA J, LISSOWSKA J, YUAN CC, ROTHMAN N, LANYON G, MARTIN M, FRAUMENI JF JR, RABKIN CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000 Mar 23;404(6776):398-402.

67. EMMEL VE., Análise de modificadores genéticos do fenótipo da ataxia espinocerebelar tipo 3. UFRGS 2010.
68. ESKENAZI BR, WILSON-RICH NS, STARKS PT. A Darwinian approach to Huntington's disease: subtle health benefits of a neurological disorder. *Med Hypotheses*. 2007;69(6):1183-9. Epub 2007 Aug 8.
69. DUAN W, GUO Z, JIANG H, WARE M, LI XJ, MATTSON MP. Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival rates in huntington mutant mice. *Proc Natl AcadSci U S A* 2003; 100: 2911-6.
70. RAMESH G, MACLEAN AG, PHILIPP MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:480739.
71. KETTENMANN H, HANISCH UK, NODA M, VERKHRATSKY A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461–553.
72. LEBLHUBER F., WALLI J., JELLINGER K., TILZ G. P., WIDNER B., LACCONE F. AND, FUCHS D. (1998) Activated immune system in patients with Huntington's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 747–750.
73. FORREST, C. M., MACKAY, G. M., STOY, N., SPIDEN, S. L., TAYLOR, R., STONE, T. W., AND DARLINGTON, L.G. Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *JNeurochem* 2010; 112: 112–22.
74. CROTTI A, GLASS CK. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol*. 2015 Jun;36(6):364-73. doi: 10.1016/j.it.2015.04.007.
- 75 HARRY GJ, KRAFT AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Oct;4(10):1265-77. doi: 10.1517/17425255.4.10.1265 .
76. HIRSCH EC, HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 2009;8(4):382–97.
77. LOBSIGER CS, CLEVELAND DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1355–60.
78. HOFMANN KW1, SCHUH AF, SAUTE J, TOWNSEND R, FRICKE D, LEKE R, SOUZA DO, PORTELA LV, CHAVES ML, RIEDER CR. Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2009;34(8):1401–4.
79. HÜBENER J, CASADEI N, TEISMANN P, SEELIGER MW, BJÖrkqvist M, von HÖRSTEN S, ET AL. Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapped mouse model. *J Genet Genom*.

7. ARTIGO

Cerebellum
DOI 10.1007/s12311-015-0719-z



ORIGINAL PAPER

Cytokines in Machado Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia 3

Gerson da Silva Carvalho¹ · Jonas Alex Morales Saute^{1,7} · Clarissa Branco Haas² · Vitor Rocco Torrez² · Andressa Wigner Brochier² · Gabriele Nunes Souza¹ · Gabriel Vasata Furtado² · Tailise Gheno² · Aline Russo¹ · Thais Lampert Monte^{1,8} · Artur Schumacher-Schuh⁸ · Rui D'Avila⁷ · Karina Carvalho Donis⁷ · Raphael Machado Castilhos² · Diogo Onofre Souza^{2,4,10} · Maria Luiza Saraiva-Pereira^{2,4,7,9} · Vanessa Leotti Torman^{3,5} · Suzi Camey^{3,5} · Luis Valmor Portela^{2,4,10} · Laura Bannach Jardim^{1,2,6,7,9}

© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The aim of the present study is to describe the serum concentrations of a broad spectrum of cytokines in symptomatic and asymptomatic carriers of Machado Joseph disease (SCA3/MJD) CAG expansions. Molecularly confirmed carriers and controls were studied. Age at onset, disease duration, and clinical scales Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA), Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxias (NESSCA), SCA Functional Index (SCAFI), and Composite Cerebellar Functional Score (CCFS) were obtained from the symptomatic carriers. Serum was obtained from all individuals and a cytokine panel “consisted of” eotaxin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- α , IFN- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, interferon gamma-induced protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, monokine induced by gamma interferon (MIG), macrophage inflammatory protein (MIP)-a, MIP-b, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and tumor necrosis fac-

tor (TNF)- α was analyzed. In a subgroup of symptomatic carriers, the cytokine panel was repeated after 360 days. Cytokine distribution among groups was studied by discriminant analysis; changes in serum levels after 360 days were studied by generalized estimation equation. Sixty-six symptomatic carriers, 13 asymptomatic carriers, and 43 controls were studied. No differences in cytokine patterns were found between controls and carriers of the CAG expansions or between controls and symptomatic carriers only. In contrast, eotaxin concentrations were significantly higher in asymptomatic than in symptomatic carriers or in controls ($p=0.001$, ANCOVA). Eotaxin did not correlate with age, disease duration, CAG expansion, NESSCA score, and SARA score. Among symptomatic carriers, eotaxin dropped after 360 days ($p=0.039$, GEE). SCA3/MJD patients presented a benign pattern of serum cytokines. In contrast, levels of eotaxin, a peptide secreted by astrocytes, were elevated in the asymptomatic carriers, suggesting that a specific response of these cells can be related to symptom progression, in SCA3/MJD.

✉ Laura Bannach Jardim
ljardim@hcpa.edu.br

¹ Post-Graduate Programme in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Post-Graduate Programme in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Department of Epidemiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Department of Statistics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶ Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁷ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

⁸ Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

⁹ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil

¹⁰ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN), Porto Alegre, Brazil

Keywords Cytokines · Discriminant analysis · Eotaxin · Machado Joseph disease · Neuroprotection · Spinocerebellar ataxia type 3

Background

Machado Joseph disease, also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD), is an autosomal dominant, untreatable polyglutamine (polyQ) disorder caused by a CAG repeat expansion (CAGexp) at *ATXN3* gene. SCA3/MJD usually starts around 32–40 years [1, 2]. Gait ataxia is the main neurological deficit, but ataxia later affects speech, swallowing, and limb coordination. Pyramidal, extrapyramidal, and peripheral nerve findings also occur during disease course. After some years, patients become bedridden. The median survival time after onset is 21 years [3]. Expansion of the polyQ tract in *ATXN3* is thought to promote an altered conformation in the protein ataxin-3, leading to changes in interactions with native partners and to the formation of insoluble aggregates. The principal disease mechanisms remain unclear [4]. Mutant ataxin-3 might trigger multiple, interconnected pathogenic cascades, and an inflammatory response might be among them.

Cytokines are a large group of small soluble peptides that act as signaling molecules to regulate inflammation and modulate cellular activities such as growth, survival, and differentiation [5, 6]. In the nervous system, cytokines work as neuromodulators and regulate neurodevelopment, neuroinflammation, and synaptic transmission [6]. Microglia are the brain immune cells, responsible for orchestrating the brain innate immune response. In the disease state, activated microglia mediate neuronal and glial cell injury and death through production and release of proinflammatory cytokines, glutamate, and reactive oxygen species among others [6]. Neurodegeneration is concomitant with astrogliosis, microgliosis, and microvasculature remodeling. Though the trophic factors released initially by astrocytes during astrogliosis aid in tissue repair, these factors might amplify the inflammatory response, and a balance between repair and proinflammatory factors might modify the outcome of a neurodegenerative process [7] (Kettenmann et al. 2011).

Several studies already demonstrated an involvement of neuroinflammation in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or amyotrophic lateral sclerosis [8–11]. In Huntington disease (HD), a polyQ disorder, there is evidence that activation of the immune system starts in the presymptomatic stage of the disease [12, 13].

Immune abnormalities were not seen in a transgenic mice model of SCA3/MJD that lacks the C-terminal part of ataxin 3 and, therefore, the polyQ stretch. However, this model mimics a neurodegenerative disorder that is pathologically distinct from human SCA3/MJD [14]. Therefore, immune abnormalities and cytokine patterns related to SCA3/MJD patients are currently unknown.

In the present exploratory study, we aimed to determine the serum concentrations of cytokines, found among presymptomatic and symptomatic individuals carrying a CAGexp at *ATXN3*.

Methods

Population and Clinical Evaluations

Individuals were invited to participate in this study either if they were symptomatic and previously diagnosed with SCA3/MJD or if they were asymptomatic, at 50 % risk subjects looking for presymptomatic testing in our outpatient clinics from May, 2011, to July, 2013. Molecular characterization of the CAG repeats at *ATXN3* in both symptomatic SCA3 and asymptomatic SCA3 groups was performed by amplifying region of interest using fluorescent-labeled primers. Following amplification, products were separated on an ABI3130xl Genetic Analyzer and length of CAGexp allele was determined against size standard 500 LIZ as well as positive and negative controls.

The symptomatic individuals comprised the symptomatic SCA3 group. After consent, their data was collected during baseline assessments of a randomized controlled trial where disease duration [DD] of more than 10 years was exclusion criteria [15]. At-risk individuals proved to carry a CAGexp at *ATXN3* and whose neurological examination was normally comprised the asymptomatic SCA3 group. The control group consisted of those at-risk individuals who do not carry CAGexp, plus healthy, unrelated individuals with age, gender, and environmental characteristics similar to the symptomatic individuals. Individuals with chronic or acute inflammatory, infectious, or allergic diseases were excluded.

Age at onset (AO) of the first symptoms and DD of the symptomatic individuals were noted. The clinical scales Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxias (NESSCA) [16], Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) [17], SCA Functional Index (SCAFI) [18], and Composite Cerebellar Functional Score (CCFS) [19] were applied.

This study was approved by the Ethics in Research Committee of our institution (register number 10-512).

Sample Collections

After consent, blood was collected to study peripheral cytokines. All subjects were under fasting conditions: collections were done between 8 a.m. and 4 p.m., and processing was done within 4 h. Serum was obtained by blood centrifugation at 6000g for 5 min, frozen immediately, and stored at -80°C until analyses [20].

As already mentioned, the symptomatic SCA3 individuals were included in a recent phase 2 clinical trial in SCA3/MJD [15]. Due to the design of that study, other serum samples were

obtained 90 and 360 days after the first blood collection. The present cytokine panel was repeated in the samples collected at 90 and 360 days from the placebo group. Since we considered that the placebo intervention would not produce any biological effect, the placebo group of that trial comprised the prospective subgroup of symptomatic individuals of the present study.

Cytokine Measurements

We performed cytokine assessment in serum samples with the commercial kit Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel (Reference # LHC0009M, Invitrogen, USA). This is a solid-phase protein immunoassay that uses spectrally encoded antibody-conjugated beads as the solid support. Each bead is given a unique identification number, or bead region, allowing differentiation of one bead from another. The assay is performed in a 96-well plate format and analyzed with a Luminex[®] instrument, which captures beads while simultaneously measuring the quantity of associated fluorophore.

The 25-Plex Panel “consisted of” eotaxin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- α , IFN- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, interferon gamma-induced protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, monokine induced by gamma interferon (MIG), macrophage inflammatory protein (MIP)-a, MIP-b, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), and tumor necrosis factor (TNF)- α (all measured in pg/ml).

This panel represents different functional cytokine profiles such as “cytotoxic cellular cytokines” (e.g., IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-15, IL-17, IFN- α , IFN- γ , and TNF- α), “humoural cytokines” (e.g., IL-4, IL-1RA, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13), “growth factors” (e.g., GM-CSF, IL-7), “chemokines” [e.g., CXCL8 (IL-8), MCP-1, CCL3 (MIP-1a), IP-10, CCL4 (MIP-1b), MIG, CCL11 (eotaxin), and CCL5 (RANTES)] and “death receptors” (e.g., IL-2R) [21].

Statistical Analyses

Since the distribution of all 25 cytokines under study was highly skewed, the obtained measurements were \log_{10} normalized.

Since this is an exploratory study without an a priori hypothesis, functional groups of cytokines were not chosen to be studied. Each cytokine was treated as a unique variable. However, some cytokines covaried with others and could be excluded from the analysis. In accordance, only those cytokines that did not present collinearity (variance impact factor = VIF < 0.2) were picked up for further analysis.

The distribution of the selected cytokines among groups was then compared by discriminant analysis. This analysis was performed in three settings, in order to predict whether an individual was as follows: (1) a CAGexp-carrying (symptomatic SCA3

plus asymptomatic SCA3 groups) or a CAGexp-non-carrying individual (control group), to explore the possible patterns related to the presence of a CAGexp per se; (2) a symptomatic SCA3 or an unaffected individual (control group), to explore the possible patterns related to the disease status of SCA3/MJD individuals; and (3) a symptomatic SCA3 or an asymptomatic SCA3, to explore the possible patterns related to the appearance of symptoms per se and not to the presence of a CAGexp.

A stepwise analysis (using Wilk’s lambda method and with p -in=0.05, p -out=0.10) was done in order to identify the best or most useful cytokines for distinguishing between groups.

The cross-validated classification accuracy rate of the discriminant analyses shows the proportion of the original grouped cases that would be correctly classified by the cytokine panel. Cross-validated classification accuracy rates $\geq 20\%$ higher than the proportional by chance accuracy rate were considered good. The proportion by chance of the accuracy rate was computed by squaring and summing the proportion of cases in each group.

If a given cytokine was associated to any status under study (carrying a CAGexp at *ATXN3* gene or being symptomatic), its serum levels along 90 and 360 days after baseline evaluation were studied by generalized estimation equation (GEE), in the prospective symptomatic subgroup.

Results

Sixty-six individuals comprised the symptomatic SCA3 group; 13, the asymptomatic SCA3 group; and 43, the control group (9 related and 34 unrelated to SCA3/MJD individuals). Clinical and demographic characteristics are described in Table 1.

Twenty-seven out of 63 symptomatic individuals were followed for 360 days. Their gender proportion, age, AO, DD, CAGexp, NESSCA, SARA, and ataxia severity scores were similar to the overall group of symptomatic individuals (data not shown).

The cytokines that did not present collinearity (VIF < 0.2) and that were selected for further analysis were the \log_{10} of eotaxin, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, IP-10, TNF- α , and RANTES, all reported as picogram per milliliter.

Comparisons Between the CAGexp-Carrying and CAGexp-Non-Carrying Individuals

Seventy-nine individuals (66 symptomatic SCA3 plus 13 asymptomatic SCA3) comprised the CAGexp-carrying group, whereas the 43 controls comprised the non-carrying group.

The 19 identified cytokines were not significantly different between groups. The panel was able to correctly classify 61.5 % of individuals.

Table 1 Clinical and molecular characteristics of the three subgroups under study

	Asymptomatic	Symptomatic (those with 360-day follow-up)	Controls
<i>N</i>	13	66 (27)	43
Females	8	33 (15)	25
Age	33.15±8.2*	40.7±9.5* (40.3±9)	40.9±14
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
Age at onset		34.8±9 (32.2±8.9)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
CAG expanded repeats	73.3±3	74.91±3.1 (75.5±2.8)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
Disease duration		5.9±2.5 (6.13±2.5)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
NESSCA baseline		14.3±4.8 (15±5.1)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
SARA baseline		10.7±4 (11.6±4)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			
Ataxia severity at baseline		2.17±0.75 (2.2±0.6)	
<i>M</i> ± <i>SD</i>			

Only significant differences between comparisons were described

M±*SD* mean±standard deviation

* $p < 0.05$, *t* test

The discriminant function did not reveal a significant association between groups and any predictors (the cytokines under study), accounting for 17.1 % of between-group variability. The cross-validated classification showed that, overall, 52.1 % were correctly classified, which is lower than 66.0 % (the proportional by chance accuracy rate times 1.20 or $(0.355^2 + 0.645^2) * 1.20$).

Comparisons Between Symptomatic SCA3 and the Unaffected Individuals

The 66 symptomatic SCA3 individuals were compared against the 43 controls.

Again, the 19 identified cytokines were not significantly different between groups. The panel was only able to correctly classify 63.3 % of individuals.

The discriminant function did not reveal a significant association between groups and any predictors, accounting for 16.2 % of between-group variability. The cross-validated classification showed that, overall, 42.2 % were correctly classified, which is lower than 65.3 % (the proportional by chance accuracy rate times 1.20 or $(0.394^2 + 0.606^2) * 1.20$).

Comparisons Between the Symptomatic and the Asymptomatic Carriers of CAGexp: Eotaxin as a Biomarker of Disease Status

The 66 symptomatic SCA3 individuals were compared against the 13 asymptomatic carriers of CAGexp. Since both

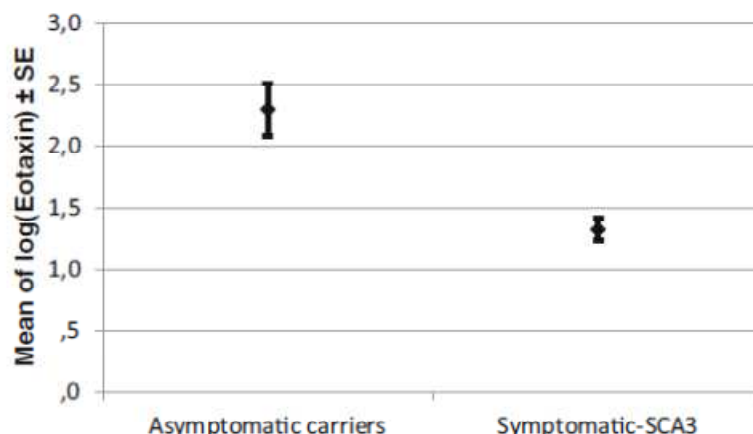
groups showed significant differences between their age, age was included in the discriminant function.

Although the discriminant function revealed a significant association between groups and all predictors, it accounted for 47.0 % of between-group variability. The cross-validated classification showed that, overall, 85.9 % were correctly classified, which is lower than 88.7 % (the proportional by chance accuracy rate times 1.20 or $(0.154^2 + 0.846^2) * 1.20$).

The stepwise analysis identified eotaxin, IFN- γ , and age as the most important predictors. The discriminant function revealed a significant association between groups and eotaxin, but it accounted for 31.1 % of between-group variability. The cross-validated classification showed that, overall, 91.0 % were correctly classified using those three variables, which is higher than 88.7 %, the proportional by chance accuracy rate times 1.20.

Age differences between these groups were expected, however, and could act as a confounder. To study eotaxin and IFN- γ individually, ANCOVA was done, using age as covariate. Means of log IFN- γ in asymptomatic ($M = -0.9$, standard error (SE) = 0.2) and in symptomatic SCA3 ($M = -0.5$, SE = 0.1) groups were not significantly different ($p = 0.152$). In contrast, mean of log eotaxin in asymptomatic carriers ($M = 2.3$, SE = 0.2) was significantly larger than the value obtained in symptomatic SCA3 group ($M = 1.3$, SE = 0.1, $p < 0.001$). In other words, the higher values of eotaxin among asymptomatic SCA3 individuals were not explained by differences in ages between groups (Table 1). Serum concentrations of log eotaxin are depicted in Fig. 1.

Fig. 1 Comparison of serum concentrations of eotaxin in asymptomatic carriers of *ATXN3* CAG expansions with those found in symptomatic individuals and in controls



Serum log eotaxin levels of SCA3 symptomatic individuals were very similar to control values, whereas levels in SCA3 asymptomatic individuals were higher than SCA3 symptomatic and control groups.

Among the asymptomatic carriers, no correlation was found between eotaxin levels and one of its main peripheral sources, number of peripheral eosinophils ($\rho = -0.07$, $p = 0.8$, Spearman test).

A post hoc analysis was done in order to clarify if any of the cytokines excluded from the analysis covaried with eotaxin. None of them (GM-CSF, IL-1RA, IL-2R, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, MCP-1, MIG, MIP1a, MIP1b) presented a relevant correlation with eotaxin (rhos between 0.2 and 0.3).

Possible Associations of Eotaxin with Age, Disease Severity and Duration, and CAGexp: Eotaxin Progression During Time

Log eotaxin did not correlate with age or with any of the parameters of disease severity: DD, CAGexp, NESSCA, SARA, SCAFI, and CCFS (data not shown). Log eotaxin means obtained in subgroups of gait ataxia severity were compared, and no differences were found (data not shown). Although not a good candidate for a SCA3/MJD biomarker, the same analyses were done for log IFN- γ : no significant associations were observed (data not shown).

Clinical and molecular characteristics of the prospective symptomatic subgroup were similar to the other symptomatic SCA3 individuals (Table 1). In this subgroup, GEE was used to analyze if there was a change of log eotaxin along time. Log eotaxin presented a significant reduction in a 360-day interval ($p = 0.039$), but not in 90 days ($p = 0.398$) (Fig. 2). The same analysis was done for log IFN- γ : no significant changes were observed (data not shown).

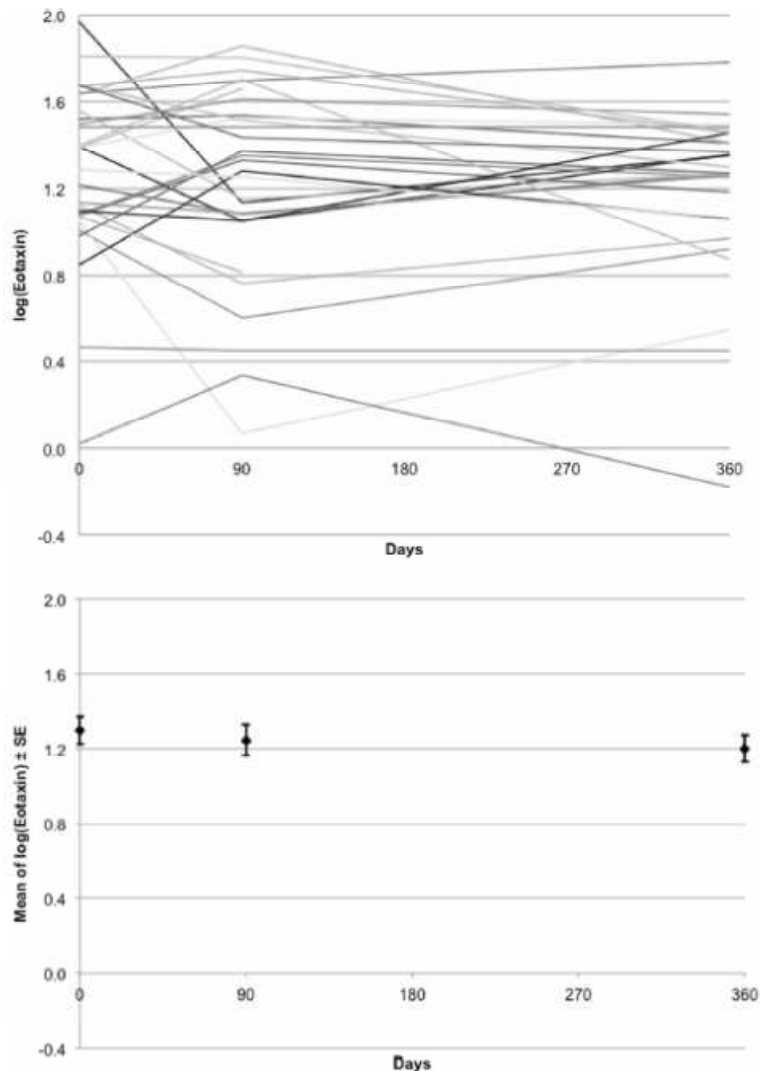
Discussion

Our study did not disclose an altered pattern of cytokines in SCA3/MJD, as occurs in diseases related to microglia activation. In contrast, the asymptomatic status of SCA3/MJD was associated with increased levels of only one cytokine, eotaxin, a peptide secreted by astrocytes to repel circulating immune cells and also on peripheral tissues mainly by T lymphocytes (Th2) [6, 22].

Few studies have been done on the role of microglia and astrocytes, cells that secrete cytokines in response to the disease processes, in SCA3/MJD and other polyQ SCAs [23–28]. A transgenic mouse expressing the expanded human ataxin-3 with 94 CAGs showed astrogliosis but not microglial activation [23]. In a conditional Tet-Off mouse model using the full-length human ataxin-3 cDNA with 77 CAGs, ataxin-3 was predominantly detected in glial cells of the cerebellum—not in neurons. This model showed that glial cells expressing expanded ataxin-3 can secondarily alter Purkinje cell function [24]. Pathological studies in humans disclosed that microglial cells might be activated in degenerated brainstem nuclei of SCA3/MJD patients, an effect that might be related to late stages of the disease [25, 26]. Distribution of reactive astrocytes is quite interesting. While present in affected and in preserved, nondegenerated gray matter regions such as thalamic and vestibular nuclei, reactive astrocytes were absent from some severely degenerated nuclei, such as lateral and interstitial vestibular nuclei, and pulvinar and reticular nuclei, in thalamus [27, 28]. Similar findings were obtained in other polyQ SCAs [25]. The possible astrocyte and microglial activation on cytokines was never studied, in SCA3/MJD.

We have chosen to perform a large exploratory study covering 25 cytokines belonging to different functional groups, in order to detect those that could be related to this disease. Unfortunately, only 13 asymptomatic carriers with normal neurological examination accepted to participate in this study. The low acceptance of presymptomatic testing among

Fig. 2 Eotaxin progression during a 360-day interval in 27 SCA3 symptomatic individuals. **a** Log eotaxin changes: each *line* represents one individual. **b** Mean of log eotaxin changes in the overall group of symptomatic individuals



Brazilians might explain these numbers [29]. Even so, an unbiased analysis was able to show that eotaxin serum levels in asymptomatic carriers of the mutation were significantly higher than those measured in symptomatic patients and higher than those found in controls. Moreover, eotaxin serum levels seemed to progressively drop among symptomatic individuals. If that is true, one would expect an association between eotaxin levels and DD among the symptomatic individuals. The lack of association in the present study may have been due to the low DD (up to 10 years) of the symptomatic subjects recruited.

Many different cell types can produce eotaxin: in CNS, astrocytes and, peripherally, lymphocytes, endothelial cells, and others [6, 22, 30]. On periphery, eotaxin is strongly chemotactic for eosinophils, as well as for basophils and Th2 cells [31]. As we measured serum eotaxin levels in SCA3/MJD, the

first question would be if eotaxin crosses the blood-brain barrier (BBB) from periphery and/or if there is a brain efflux of eotaxin that may reflect CNS immune changes. Studies performed in vitro showed that eotaxin can cross the BBB in both directions [20]. Since SCA3/MJD was never related to any allergic cascade, we decided to not discuss the possible relationship of peripheral sources of eotaxin with our findings.

Eotaxin is secreted by astrocytes in an attempt to keep away circulating immune cells [6, 32]. Astrocytes are the primary cell type found in glia scar formation. They help the resolution of inflammation by reducing the secretion of pro-inflammatory cytokines and increasing anti-inflammatory processes [6]. Increased numbers of reactive astrocytes and activated microglial cells are present in SCA3/MJD [25, 26]. In polyQ SCAs, including SCA3/MJD, reactive astrocytes are often seen in affected and apparently preserved gray areas. In

contrast, astrocytes are frequently absent from some of the totally degenerated gray matter areas. If these astrocyte losses reflect that functional capacities are exhausted or that they could be targets of the disease processes and could ultimately degenerate similarly to neurons remains to be tested [26].

The present data shows that serum concentrations of eotaxin are higher in asymptomatic than in symptomatic carriers of a CAGexp at *ATXN3* and in controls. Since there is no evidence in the literature in favor of a peripheral activation of the immune system in SCA3/MJD, a possible interpretation is that eotaxin is highly secreted by astrocytes during the presymptomatic period. Among the anatomical structures studied in detail, there is evidence that unaffected regions show astrogliosis [27, 28]. Maybe, astrogliosis might start during the presymptomatic period. These concentrations drop as time passes, maybe when astrocytes get exhausted or degenerated and undergone cell death. This might roughly coincide with the symptomatic period. If the eotaxin measured in peripheral serum is portraying the eotaxin secreted by astrocytes, then our preliminary data matches with the theory that the progressive loss of astrocytes would be related to the disease process, in SCA3/MJD and other polyQ disorders, and to the start of symptoms. The astrocyte vanishing from the destroyed brain grays, in polyQ SCAs, suggests that after their functional capacities are exhausted, the progression of symptoms would appear [26]. In this context, eotaxin either might play a direct protective role in the presymptomatic phase of the disease or might only be a biomarker of astrocyte dysfunction.

These are very speculative hypotheses. Understanding the role of cytokines in neurodegenerative diseases is complicated by several factors. The first is the distance between the serum and the central nervous system. The second is the cytokine dual roles in neuroprotection and neurodegeneration. The example of IL-6, a neurotrophin that promotes neuronal survival in some cases and brain diseases in others [33], should refrain us to attribute a clear neuroprotective role to eotaxin, with the present evidence.

Conclusion

The study of cytokines in neurodegenerative diseases such as SCA3/MJD might enlighten the understanding of the disease process of this and other polyQ disorders. Moreover, changes in cytokine patterns could be used as a biomarker of disease state/progression. This exploratory study raised significant new information about cytokines in SCA3/MJD. There is no evidence of a generalized cytokine change associated with the disease. In contrast, serum levels of eotaxin, a cytokine secreted by astrocytes, were shown to be elevated in asymptomatic carriers; these levels decreased among symptomatic individuals in a progressive way. Eotaxin might be a good candidate biomarker of the presymptomatic state. In order to confirm

this, further prospective studies, especially those measuring eotaxin in cerebrospinal fluid and those relating eotaxin with brainstem atrophy, are needed.

Acknowledgments We thank the patients who participated in the study. We thank HCPA and its Postgraduate Research Group (GPPG).

Compliance with Ethical Standards

Funding This study was supported by FAPERGS (09/0078-5), CNPq (47888/2010-4), and FIPE-HCPA (09-418; 10-512). DOS, LVP, MLSP, and LBJ were supported by CNPq.

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical Approval All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Authors' Contributions GSC conceived the study, recruited subjects, organized the data bank, and reviewed the manuscript. JAMS participated in the recruitment of subjects, performed neurological examinations and clinical scales, organized the data and the sample banks, reviewed the statistical analysis, and helped to draft the manuscript. CBH, VRT, and AWB carried out the cytokine assays and reviewed the manuscript. GNS, AR, TLM, ASS, RDA, KCD, and RMC performed neurological evaluations and clinical scales and reviewed the manuscript. GVF, TCG, and MLSP carried out the molecular genetic studies, helped organizing the sample bank, and reviewed the manuscript. VLT and SC performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. DOS participated in the design of the study, helped in obtaining funding, and reviewed the manuscript. LVP participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. LBJ conceived and coordinated the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Bettencourt C, Lima M. Machado-Joseph disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:35.
2. de Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, et al. Rede Neumogenética. Spinocerebellar ataxias in Brazil—frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum*. 2014;13(1):17–28.
3. Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*. 2007;72(6):543–5.
4. Costa MC, Paulson HL. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*. 2012;97(2):239–57.
5. Devi LA. G-protein-coupled receptor dimers in the lime light. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(9):324–6.
6. Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:480739.
7. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461–553.

8. Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Exp Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(10):1265–77.
9. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009;8(4):382–97.
10. Lobsiger CS, Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1355–60.
11. Hofmann KW, Schuh AF, Saute J, Townsend R, Fricke D, Leke R, et al. Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2009;34(8):1401–4.
12. Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med.* 2008;205(8):1869–77.
13. van der Burg JM, Björkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 2009;8(8):765–74.
14. Hübener J, Casadei N, Teismann P, Seeliger MW, Björkqvist M, von Hörsten S, et al. Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapp mouse model. *J Genet Genom.* 2012;39(6):287–99.
15. Saute JA, de Castilhos RM, Monte TL, Schumacher-Schuh AF, Donis KC, D'Ávila R, et al. A randomized, phase 2 clinical trial of lithium carbonate in Machado-Joseph disease. *Mov Disord.* 2014;29(4):568–73.
16. Kielling C, Rieder CR, Silva AC, Saute JA, Cecchin CR, Monte TL, et al. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol.* 2008;15:371–6.
17. Schmitz-Hübisch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology.* 2006;66:1717–20.
18. Schmitz-Hübisch T, Giunti P, Stephenson DA, Globas C, Baliko L, Saccà F, et al. SCA Functional Index: a useful compound performance measure for spinocerebellar ataxia. *Neurology.* 2008;71:486–92.
19. du Montcel ST, Charles P, Ribai P, Goizet C, Le Bayon A, Labauge P, et al. Composite cerebellar functional severity score: validation of a quantitative score of cerebellar impairment. *Brain.* 2008;131:1352–61.
20. Erickson MA, Morofuji Y, Owen JB, Banks WA. Rapid transport of CCL11 across the blood-brain barrier: regional variation and importance of blood cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;349(3):497–507.
21. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjögren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol.* 2004;59(6):592–9.
22. Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deezkowska A, Shifrut E, Ndi fon W, et al. CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):2264–9.
23. Silva-Fernandes A, Costa Mdo C, Duarte-Silva S, Oliveira P, Botelho CM, Martins L, et al. Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis.* 2010;40:163–76.
24. Boy J, Schmidt T, Wolburg H, Mack A, Nuber S, Botcher M, et al. Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet.* 2009;18:4282–95.
25. Evert BO, Vogt IR, Kindermann C, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, et al. Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci.* 2001;21:5389–96.
26. Rüb U, Schöls L, Paulson H, Auburger G, Kermer P, Jen JC, et al. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol.* 2013;104:38–66.
27. Rüb U, de Vos RA, Brunt ER, Schultz C, Paulson H, Del Tredici K, et al. Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res.* 2002;953(1–2):126–34.
28. Rüb U, Brunt ER, de Vos RA, Del Turco D, Del Tredici K, Gierga K, et al. Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30(4):402–14.
29. Rodrigues CS, de Oliveira VZ, Camargo G, Osório CM, de Castilhos RM, Saraiva-Pereira ML, et al. Presymptomatic testing for neurogenetic diseases in Brazil: assessing who seeks and who follows through with testing. *J Genet Couns.* 2012;21(1):101–12. doi:10.1007/s10897-011-9383-8.
30. Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K, Donovan B, Rothenberg ME, Munitz A, et al. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6C(high) CCR2(+) inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11. *J Immunol.* 2011;186(10):5993–6003.
31. van Dooren FH, Duijvis NW, te Velde AA. Analysis of cytokines and chemokines produced by whole blood, peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *J Immunol Methods.* 2013;396(1–2):128–33.
32. Cardona AE, Gonzalez PA, Teale JM. Chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of $\gamma\delta$ T cells in amplification of the host immune response. *Infect Immun.* 2003;71(5):2634–42.
33. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6 a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci.* 2012;8:1254–66.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas doenças neurodegenerativas como na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica, diversos estudos mostraram o envolvimento de eventos neuroinflamatórios na fisiopatogenia^{75, 76, 77, 78}. Na Doença de Huntington existem evidências que a ativação do sistema imune ocorre em estágios iniciais da doença¹⁵.

Neste trabalho foi avaliada a relação do sistema imune na patogênese da Doença de Machado Joseph, em específico, no que diz respeito a imunidade humoral. Nós estudamos os níveis séricos das citrinas em 66 pacientes sintomáticos, 13 assintomáticos e 43 controles. Foi analisada a associação destes níveis com a idade de início dos sintomas, com a gravidade da doença, com o tamanho das repetições CAG e buscado correlação com a gradação das escalas SARA, NESSCA, SCAFI e CCSF.

Nossos resultados não apontam para resultados similares a aqueles achados encontrados na DH, não houve diferença estatística entre os níveis séricos de citocinas entre os pacientes estudados com Doença de Machado Joseph e seus controles pré-sintomáticos e não portadores. Apesar disto, foi possível mostrar que nos pacientes pré-sintomáticos, os níveis de Eotaxina estavam elevados e que tendem a diminuir ao longo da evolução da doença. No entanto, estudos com um número mais robusto de participantes são necessários para fortalecer estes achados.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos estudos mostraram níveis elevados de Eotaxina em fases iniciais da doença. Assim, não é possível excluir a participação do sistema imune na fisiopatologia da Doença de Machado Joseph. No entanto, novos estudos são necessários no objetivo de confirmar estes achados e expandir a avaliação para outros aspectos não humorais como a imunidade celular. A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das doenças neurodegenerativas é muito importante no conhecimento de diversos aspectos e inclusive, para darmos resposta a diversos questionamentos que possam estar relacionados aos fatores modificadores de fenótipo da doença. Além disso, há necessidade de novos estudos sobre a presença de biomarcadores que possam se correlacionar com a idade de início, gravidade e evolução da Doença de Machado Joseph. A Eotaxina se mostrou um candidato, em potencial, como marcador de fases pré-sintomáticos na evolução da doença.

É importante que este estudo seja ampliado com um número maior de participantes. Nós sugerimos que Eotaxina seja dosada em outros líquidos corporais como o líquido cefalorraquidiano como também seus níveis sejam correlacionados com outros achados como a atrofia cerebral.

ANEXOS

TERMOS DE CONSENTIMENTO I

PROJETO: CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA A DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH.

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONVIDADOS A PARTICIPAR DO ESTUDO (CASOS SINTOMÁTICOS).

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar se substâncias naturais e circulantes no sangue e nos tecidos das pessoas, as interleucinas, estão alteradas nos pacientes com a Doença de Machado-Joseph. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos dessa doença e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde. Serão dosadas várias interleucinas no seu sangue ou plasma, além dos níveis séricos de Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicerídeos, Glicose, Creatinina, Bilirrubinas e Tempo de Protrombina. Essas substâncias serão dosadas em três grupos de pessoas: nos doentes portadores da Doença de Machado-Joseph, em seus parentes de sangue assintomáticos e em pessoas não relacionadas, que servirão de comparação. É necessário estudar um grupo de pessoas que não possuam a doença para comparar seus resultados com os do grupo de pacientes portadores da Doença de Machado-Joseph.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa, por ser portador da Doença de Machado-Joseph. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá (1) uma entrevista clínica; (2) o preenchimento de um questionário para avaliar se você tem manifestações depressivas; (3) a realização de exames físicos neurológicos padronizados; e (4) a coleta de 20 mL de sangue. Entretanto, tudo isso somente será feito, depois de você autorizar a sua participação nesse estudo, entregando um documento assinado por si ou por seu representante legal.

O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar seu material armazenado. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro, para os quais eventualmente solicitarmos sua aprovação para o aproveitamento do seu material estocado, também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de GPPG) e da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP).

Os riscos envolvidos nessa pesquisa são: mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue e cansaço. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Os resultados definitivos não terão prazo para sua liberação, pois dependem de análises bioquímicas em implementação no laboratório. Esses resultados também não terão uma interpretação direta: ou seja, não serão “bons” ou “maus”. Mesmo assim, se você o desejar, podemos entregá-los assim que ficarem prontos. Nossa estimativa é a de que isso aconteça no final do estudo, em 2012. Se assim o desejar, por favor, assinale na folha do Termo de Consentimento.

Os resultados dos exames realizados no seu material ficarão guardados em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros. São considerados dados sigilosos, e estarão apenas à sua disposição ou de seu representante legal.

Pesquisador Responsável: Dr^a Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Gerson da Silva Carvalho

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim,

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

TERMOS DE CONSENTIMENTO II

PROJETO: CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA A DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH.

**INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONVIDADOS A PARTICIPAR DO ESTUDO,
COMO CONTROLES SAUDÁVEIS.**

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar se substâncias naturais e circulantes no sangue e nos tecidos das pessoas, as interleucinas, estão alteradas nos pacientes com a Doença de Machado-Joseph. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos dessa doença e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde. Serão dosadas várias interleucinas no seu sangue ou plasma, além dos níveis séricos de Colesterol Total, Colesterol HDL, Triglicérides, Glicose, Creatinina, Bilirrubinas e Tempo de Protrombina. Essas substâncias serão dosadas em dois grupos de pessoas: nos doentes portadores da Doença de Machado-Joseph e em pessoas saudáveis, que servirão de comparação. É necessário estudar um grupo de pessoas que não possuam a doença para comparar seus resultados com os do grupo de pacientes portadores da Doença de Machado-Joseph.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa, por não ter a Doença de Machado-Joseph e ser um possível “controle”, ou seja, saudável. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá (1) uma entrevista clínica; (2) o preenchimento de um questionário para avaliar se você tem manifestações depressivas; e (3) a coleta de 20 mL de sangue. Entretanto, tudo isso somente será feito, depois de você autorizar a sua participação nesse estudo, entregando um documento assinado por si ou por seu representante legal.

O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar seu material armazenado. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro, para os quais eventualmente solicitarmos sua aprovação para o aproveitamento do seu material estocado, também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de GPPG) e da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP).

Os riscos envolvidos nessa pesquisa são: mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue e cansaço. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Os resultados definitivos não terão prazo para sua liberação, pois dependem de análises bioquímicas em implementação no laboratório. Esses resultados também não terão uma interpretação direta: ou seja, não serão “bons” ou “maus”. Mesmo assim, se você o desejar, podemos entregá-los assim que ficarem prontos. Nossa estimativa é a de que isso aconteça no final do estudo, em 2012. Se assim o desejar, por favor, assinale na folha do Termo de Consentimento.

Os resultados dos exames realizados no seu material ficarão guardados em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros. São considerados dados sigilosos, e estarão apenas à sua disposição ou de seu representante legal.

Pesquisador Responsável: Dr^a Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Gerson da Silva Carvalho

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim,

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

TERMOS DE CONSENTIMENTO III
PROJETO: CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA A
DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH.
INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS CONVIDADOS A PARTICIPAR DO ESTUDO A
PARTIR DE SUA BUSCA POR TESTES PRÉ-SINTOMÁTICOS

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar como substâncias naturais e circulantes no sangue e nos tecidos das pessoas se comportam nos filhos de portadores da doença de Machado Joseph, sejam eles portadores ou não portadores. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos da Doença de Machado Joseph e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite um futuro tratamento eficaz para os pacientes afetados por esse problema de saúde. Serão dosadas várias interleucinas substâncias no seu sangue ou plasma.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa, por ser filho de um(a) afetado(a) pela Doença de Machado-Joseph. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá (1) uma entrevista clínica; (2) o preenchimento de um questionário para avaliar se você tem manifestações depressivas; e (3) a coleta de 20 mL de sangue. Entretanto, tudo isso somente será feito, depois de você autorizar a sua participação nesse estudo, entregando um documento assinado por si ou por seu representante legal.

O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar seu material armazenado. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro, para os quais eventualmente solicitarmos sua aprovação para o aproveitamento do seu material estocado, também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de GPPG) e da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP).

Os riscos envolvidos nessa pesquisa são: mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue e cansaço. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Os resultados definitivos não terão prazo para sua liberação, pois dependem de análises bioquímicas em implementação no laboratório. Esses resultados também não terão uma interpretação direta: ou seja, não serão “bons” ou “maus”. Mesmo assim, se você o desejar, podemos entregá-los assim que ficarem prontos. Nossa estimativa é a de que isso

aconteça no final do estudo, em 2012. Se assim o desejar, por favor, assinale na folha do Termo de Consentimento.

Os resultados dos exames realizados no seu material ficarão guardados em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros. São considerados dados sigilosos, e estarão apenas à sua disposição ou de seu representante legal.

Pesquisador Responsável: Dr^a Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Gerson da Silva Carvalho

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim,

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

TERMOS DE CONSENTIMENTO IV**PROJETO: CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA A
DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH.**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(uma cópia para o Serviço Executor e outra para o indivíduo)

Responsável: Professora Laura Bannach Jardim
Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
e Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Marque a sua resposta a cada um desses itens:

1. Você teve acesso às informações dadas pelo laboratório que vai realizar a pesquisa? Ficou com essas informações?

Sim Não

2. Você pôde fazer perguntas a respeito do teste?

Sim Não

3. As respostas que lhe deram foram satisfatórias?

Sim Não

4. Você entendeu que o resultado será sigiloso e somente entregue a você ou a seu representante legal?

Sim Não

5. Você entendeu que não há prazo para a entrega dos resultados de seus exames, pois os testes serão feitos como pesquisa?

Sim Não

6. Você concorda que a sua amostra seja aproveitada em outras pesquisas, futuras, e para isso seja guardada no laboratório que vai fazer a pesquisa?

Sim Não

7. Você entendeu que você está livre para sair do estudo a qualquer momento? Sem precisar dar qualquer explicação? Sem que isso afete o seu atendimento médico aqui?

Sim Não

8. Você deseja receber os resultados das análises, quando ficarem prontos?

Sim Não

Se for sim como você prefere recebê-los?

Em consulta a ser agendada

Por carta

9. Você concorda em participar desse estudo?

Sim Não

10. Quais médicos e estudantes conversaram com você sobre esses testes e estudos?

Assinatura Data

Nome por extenso

Paciente ou Responsável legal

Endereço: _____

Telefone: _____

Médico:

Assinatura

Nome por extenso

O médico preenche: caso controle não relacionado teste preditivo

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

Data:

ESCALA I

Escore 9-Hole Pegboard Test

Paciente:			
Data:			
Examinador:			
Avaliação:	Baseline?	90 dias	360 dias

Instruções: O paciente, que está sentado, segura nove cilindros (9mm de diâmetro e 32mm de comprimento) em uma das mãos e os coloca arbitrariamente, um por um, com a mão contrária em uma prancha de madeira com 9 buracos. O cronômetro deve ser iniciado quando o primeiro cilindro é colocado corretamente em um buraco e termina quando o último cilindro tiver sido colocado. O examinador deve segurar firmemente a prancha durante o teste. Uma tentativa é desempenhada para cada mão. Se o paciente deixar cair um cilindro o examinador pára o cronômetro e o paciente reinicia o teste desde o seu início.

9-Hole Pegboard	Tempo (s)
Mão dominante	
Mão não-dominante	

(anotar esquerda ou direita para todos e especificar se ambidestro)

ESCALA II

SCALE FOR THE ASSESSMENT AND RATING OF ATAXIA (SARA)

Paciente:			
Data:			
Examinador:			
Avaliação:	Baseline?	6 meses?	12 meses?

<p>1) Gait</p> <p>Proband is asked (1) to walk at a safe distance parallel to a wall including a half-turn (turn around to face the opposite direction of gait) and (2) to walk in tandem (heels to toes) without support.</p> <p>1. Normal, no difficulties in walking, turning and walking tandem (up to one misstep allowed)</p> <p>1 Slight difficulties, only visible when walking 10 consecutive steps in tandem</p> <p>2 Clearly abnormal, tandem walking >10 steps not possible</p> <p>3 Considerable staggering, difficulties in half-turn, but without support</p> <p>4 Marked staggering, intermittent support of the wall required</p> <p>5 Severe staggering, permanent support of one stick or light support by one arm required</p> <p>6. Walking > 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</p> <p>7. Walking < 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</p> <p>8 Unable to walk, even supported</p>	<p>2) Stance</p> <p>Proband is asked to stand (1) in natural position, (2) with feet together in parallel (big toes touching each other) and (3) in tandem (both feet on one line, no space between heel and toe). Proband does not wear shoes, eyes are open. For each condition, three trials are allowed. Best trial is rated.</p> <p>0 Normal, able to stand in tandem for > 10 s</p> <p>1 Able to stand with feet together without sway, but not in tandem for > 10s</p> <p>2 Able to stand with feet together for > 10 s, but only with sway</p> <p>3 Able to stand for > 10 s without support in natural position, but not with feet together</p> <p>4 Able to stand for >10 s in natural position only with intermittent support</p> <p>5 Able to stand >10 s in natural position only with constant support of one arm</p> <p>6 Unable to stand for >10 s even with constant support of one arm</p>		
Score		Score	

<p>3) Sitting Proband is asked to sit on an examination bed without support of feet, eyes open and arms outstretched to the front.</p> <p>0 Normal, no difficulties sitting >10 sec 1 Slight difficulties, intermittent sway 2. Constant sway, but able to sit > 10 s without support 3 Able to sit for > 10 s only with intermittent support 4 Unable to sit for >10 s without continuous support</p>			<p>4) Speech disturbance Speech is assessed during normal conversation.</p> <p>0 Normal 1 Suggestion of speech disturbance 2 Impaired speech, but easy to understand 3 Occasional words difficult to understand 4 Many words difficult to understand 5 Only single words understandable 6 Speech unintelligible / anarthria</p>		
Score			Score		
<p>5) Finger chase Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Examiner sits in front of proband and performs 5 consecutive sudden and fast pointing movements in unpredictable directions in a frontal plane, at about 50 % of proband's reach. Movements have an amplitude of 30 cm and a frequency of 1 movement every 2 s. Proband is asked to follow the movements with his index finger, as fast and precisely as possible. Average performance of last 3 movements is rated.</p> <p>0 No dysmetria 1 Dysmetria, under/ overshooting target <5 cm 2 Dysmetria, under/ overshooting target < 15 cm 3 Dysmetria, under/ overshooting target > 15 cm 4 Unable to perform 5 pointing movements</p>			<p>6) Nose-finger test Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to point repeatedly with his index finger from his nose to examiner's finger which is in front of the proband at about 90 % of proband's reach. Movements are performed at moderate speed. Average performance of movements is rated according to the amplitude of the kinetic tremor.</p> <p>0 No tremor 1 Tremor with an amplitude < 2 cm 2 Tremor with an amplitude < 5 cm 3 Tremor with an amplitude > 5 cm 4 Unable to perform 5 pointing movements</p>		
Score	Right	Left	Score	Right	Left
mean of both sides (R+L)/2			mean of both sides (R+L)/2		


<p>7) Fast alternating hand movements Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to perform 10 cycles of repetitive alternation of pro- and supinations of the hand on his/her thigh as fast and as precise as possible. Movement is demonstrated by examiner at a speed of approx. 10 cycles within 7 s. Exact times for movement execution have to be taken.</p> <p>0 Normal, no irregularities (performs <10s) 1 Slightly irregular (performs <10s) 2 Clearly irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, but performs <10s 3 Very irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, performs >10s 4 Unable to complete 10 cycles</p>			<p>8) Heel-shin slide Rated separately for each side Proband lies on examination bed, without sight of his legs. Proband is asked to lift one leg, point with the heel to the opposite knee, slide down along the shin to the ankle, and lay the leg back on the examination bed. The task is performed 3 times. Slide-down movements should be performed within 1 s. If proband slides down without contact to shin in all three trials, rate 4.</p> <p>0 Normal 1 Slightly abnormal, contact to shin maintained 2. Clearly abnormal, goes off shin up to 3 times during 3 cycles 3. Severely abnormal, goes off shin 4 or more times during 3 cycles 4 Unable to perform the task</p>		
Score	Right	Left	Score	Right	Left
mean of both sides (R+L)/2			mean of both sides (R+L) / 2		

ESCALA III

**NEUROLOGICAL EXAMINATION SCORE FOR SPINOCEREBELLAR ATAXIAS
(NESSCA)**

Name:	Date:	Baseline	90 dias	360 dias	
Item	Proofs	Severity			Score
Gait ataxia	- Walking spontaneously, ten steps, parallel to a wall, and including a half-turn - Walking on toes, on heels, and in tandem	Absent			0
		Minimal: only while walking on toes, heels, or in tandem			1
		Moderate: gait autonomy preserved			2
		Inability to walk without help			3
		Wheelchair bound or bedridden			4
Limb ataxia (bilateral)	- Finger-to-nose test - Test for dysdiadochokinesia (fast alternating pronation and supination of hands, elbows fixed to his/her sides) - Rebound test of Gordon-Holmes	Absent			0
		Minimal: one single altered proof			1
		Moderate: two altered proofs			2
		Important: three altered proofs			3
		Proofs: (a) dysmetria, (b) fast alternating hand movements, and (c) upper limb rebound. Positive findings can be uni or bilateral.			
Nistagmus	Absent			0	
	On extreme gaze; or circular, after saccades			1	
	Permanent			2	
Progressive external ophthalmoplegia	Absent			0	
	Supranuclear: medial longitudinal fasciculus syndrome; or limitation in upward gaze or convergence			1	
	Nuclear ophthalmoplegia, with strabismus			2	
Pyramidal findings	- Limb reflexes, including patellar and ankle clonus test - Plantar reflex - Muscle tone examination - Motor strength proofs: extended arms and Mingazzini test (60 sec each)	Absent			0
		Few brisk reflexes			1
		General hyperreflexia; or clonus; or Babinski sign			2
		Three findings: (a) general hyperreflexia, (b) spasticity, (c) clonus, (d) Babinski sign; (e) paresis			3
		Four or five of the above mentioned signs			4
Dysarthria	Absent			0	
	Mild: Impaired speech, but easy to understand			1	
	Moderate: speech understandable, but with difficulty			2	
	Severe: speech hardly understandable			3	

		Anarthria	4
Dysfagia		Absent	0
		Mild	1
		Important: occurring every day	2
Fasciculations		Absent	0
		Contraction fasciculation in the face	1
		Diffuse, or in other parts of the body	2
Sensory loss	(a) Vibratory sense in the first toes; normal: >11 sec. (b) Discrimination between tactile and algescic stimuli using a needle; 10 trials per foot (tpf). (c) Discrimination between cold (10°C) and warm (40-60°C) water; 10 tpf	Absent	0
		One altered proof: Reduction in (a) or (b) or (c): two to four mistakes, on average of both feet	1
		Two altered proofs	2
		Total loss of vibratory sense in toes; or 5 or more mistakes in one of discriminating proofs; or three altered proofs	3
Dystonia		Absent	0
		Mild, triggered by voluntary movements	1
		Moderate, impairing, in some degree, voluntary movements (vm)	2
		Almost constant, severely impairing vm	3
Rigidity		Absent	0
		Moderate: does not prevent total, passive mobilization	1
		Important: prevent total, passive mobilization	2
Bradykinesia	- Patient is asked to perform 10 cycles of repetitive opposition (extension and flexion) of the second finger against the thumb	Absent	0
		Slow movements, with reduction in amplitude	1
		Movements can hardly be done	2
Eyelid retraction		Absent	0
		Present	1
Blepharospasm		Absent	0
		Present	1
Distal amyotrophies	- Inspection of the interossei, tenar and hypotenar muscles	Absent	0
		Present	1
Sphincter function		Normal	0
		Urgency	1
		Incontinence	2
Cramps		Absent	0

	Present	1
Vertigo	Absent	0
	Present	1
Total score		
		

ESCALA IV

Composite Cerebellar Functional Severity Score (CCFS)



Nine-hole pegboard test

The patient is seated and holds nine dowels (5mm in diameter and 38mm long) in one hand and places them randomly, one by one, with the other hand in a board with nine holes. Timing begins when the first peg is placed in a hole and ends when the last peg is placed. The examiner holds the board steady on the table during the test. The trial is performed with the dominant hand. If the patient drops a peg the examiner stops the timer and the patient starts the test again once from the beginning.

Timing Dominant hand: _____ sec



Click test

The patient is seated facing the examiner across a table on which is placed a device composed of two mechanical counters fixed on a wooden board 39 cm apart. The patient uses his index finger to press the buttons on the counters alternately 10 times. Timing begins when the first button is pressed and stops when the second counter reaches 10. The trial is performed once with the dominant hand.

Timing Dominant hand: _____ sec

$$\text{CCFS} = \log_{10} (7 + Z \text{ pegboard dominant hand} / 10 + 4 * Z \text{ click dominant hand} / 10) = \underline{\hspace{2cm}}$$

where $Z \text{ pegboard dominant hand} = \text{Pegboard dominant hand} - (13.4 - 0.16 * \text{age} + 0.002 * \text{age}^2)$
 and $Z \text{ click dominant hand} = \text{Click dominant hand} - (8 + 0.05 * \text{age})$

(Mean normal values 0.85 ± 0.05 (0.64 – 0.94))