

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

Origem Ancestral da doença de Machado Joseph: Abordagem Molecular.

Gabriel Vasata Furtado

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

Orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira

Porto Alegre, março de 2013.

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética, no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com apoio financeiro parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Primeiramente a minha orientadora, Prof^a. Doutora Maria Luiza Saraiva-Pereira, a qual, além de todo o conhecimento e a orientação no papel de pesquisador, também me fez evoluir como pessoa e teve compreensão comigo durante as dificuldades que passei neste mestrado.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Identificação Genética, onde tive momentos de discussões científicas e também alguns momentos de diversão. Em especial a Tailise Gheno a quem foi uma colega e uma grande amiga durante todo o mestrado.

A todo o grupo de neurogenética, especialmente a Prof^a Laura Jardim.

Ao pessoal do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a quem sempre é muito bom trabalhar.

Aos meus amigos, tanto aos que conheci durante o mestrado quanto os que sempre estiveram presentes. Em especial a Flávia Romariz, Antonette El Husny, Henrique Galvão, Tássia Tonon, Eduardo Mattos, entre outros, se não o citei aqui foi apenas um lapso momentâneo, se és meu amigo sabes que agradeço sua amizade sempre.

E por fim, mas muito fundamental para mim, a minha família, a minha mãe Marília e a meu pai José, que sempre me apóiam e me dão suporte para que eu possa seguir meu caminho, amo vocês. Aos meus irmãos Daniel e Flávia, que apesar das brigas de irmãos são queridos por mim. E a todos os meus parentes que fazem parte da minha vida.

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

| | |
|---------|--|
| DRPLA | Ataxia dentatorubropallidoluisiana |
| DUB | Enzima de deubiquitinação |
| EPO | Oftalmoplegia externa progressiva |
| ICARS | International Cooperative Ataxia Rating Scale |
| MJD | Machado Joseph Disease (Doença de Machado Joseph) |
| NESSCA | Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia |
| NII | Inclusões intranucleares neuronais |
| OS | Outros estados |
| RS | Rio Grande do Sul |
| SARA | Scale for the assessment and rating ataxia |
| SCA | Spinocerebellar Ataxia (Ataxia Espinocerebelar) |
| SCA “N” | Spinocerebellar Ataxia Type “N” (Ataxia Espinocerebelar do Tipo “N”) |
| SNP | Polimorfismos de nucleotídeos únicos |
| STR | Repetição pequena em tandem |

Resumo

A doença de Machado-Joseph ou ataxia espinocerebelar do tipo 3 (MJD/SCA3) é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica dominante, causada por expansões de repetições nucleotídicas CAG no gene *ATXN3*. A MJD/SCA3 é responsável por 69% dos casos de SCAs no Brasil e 84% no estado do Rio Grande do Sul (RS). Estudos prévios indicaram a presença de dois eventos mutacionais responsáveis pela origem ancestral do alelo mutante, um ligado ao haplótipo ACA e outro ao haplótipo GGC. O objetivo deste estudo foi compreender a presença e origem da MJD/SCA3 no Brasil, especialmente no estado do RS, onde há um alto número de pacientes diagnosticados. As análises foram realizadas em 262 indivíduos com diagnóstico molecular [220 do RS e 42 de outros estados do Brasil (1-MG, 9-PA, 1-PB, 13-RJ, 1-RN e 17-SP)] e em 50 indivíduos normais. Foram incluídos no trabalho a análise de 3 SNP intragênicos: (G669A, G987C e A1118C) e 4 STR extragênicos [(TAT)_n, (CA)_n, (AC)_n e (GT)_n]. A linhagem mais frequente nos alelos expandidos dos pacientes foi ACA (92% de todos os casos e 97% dos casos do RS), mas as linhagens GGC e AGA também foram encontradas. Nos controles, a linhagem GGC foi encontrada em 80% dos alelos normais, diferenciando-os dos alelos expandidos ($p < 0,05$, teste χ^2). A análise dos STR mostrou que 85% dos pacientes da linhagem ACA compartilham um mesmo haplótipo (11-21-14-15), cujos pacientes eram provenientes dos estados do PA, PB, RJ, RS e SP. A linhagem GGC teve 54% dos pacientes compartilhando um haplótipo comum no grupo (16-22-18-19), provenientes dos estados de MG, PA, RJ e SP. A presença da MJD/SCA3 no Brasil é associada historicamente com a colonização portuguesa, principalmente com a colonização açoriana. A análise realizada nesse trabalho, com o uso dos marcadores moleculares, confirma a presença do mesmo haplótipo encontrado em pacientes portugueses, reforçando a ligação da presença da MJD/SCA3 com a colonização portuguesa. A alta frequência de um único haplótipo no RS confirma a hipótese de um efeito fundador no estado.

Palavras Chaves: MJD, SCA3, origem ancestral, efeito fundador, Brasil.

Abstract

The Machado-Joseph disease or spinocerebellar ataxia type 3 (MJD/SCA3) is a neurodegenerative disorder with autosomal dominant inheritance, caused by CAG repeats expansions in the ATXN3 gene. MJD/SCA3 is responsible for 69% of cases of SCAs in Brazil and 84% of cases from Rio Grande do Sul (RS) state. Previous studies indicated that two mutational events are responsible for ancestral origin of the mutant allele, one linked to ACA haplotype and other to GGC haplotype. The aim of this study was to understand the presence and origin of MJD/SCA3 in Brazil, especially in the state of Rio Grande do Sul. Analyses were performed in 262 patients with molecular diagnosis [220 from RS and 42 from other states in Brazil (1-MG, 9-PA, 1-PB, RJ-13, 1-RN, and 17-SP)] and 50 normal individuals. The study included the analysis of three intragenic SNPs (G669A, G987C and A1118C) and four STR outside the gene [(TAT)_n, (CA)_n (CA)_n and (GT)_n]. The most common lineage in patients' mutant alleles was ACA (92% of all cases and 97% of RS cases), but lineages GGC and AGA were also found. In controls, the GGC lineage was found in 80% of normal alleles, being different from expanded alleles ($p < 0.05$, X^2 test). STR analysis showed that 85% of patients from ACA lineage share the same haplotype (11-21-14-15), and those patients were from the following states: PA, PB, RJ, RS and SP. GGC lineage had 54% of patients sharing a comun haplotype (16-22-18-19) and patients were from MG, PA, RJ and SP states. The presence of MJD/SCA3 in Brazil is historically associated to the Portuguese colonization, especially from Azorean background. The analysis performed in this work using molecular markers confirms the presence of the same haplotype found in Portuguese patients, confirming the link to the Portuguese colonization. The high frequency of a single haplotype in RS confirms the hypothesis of a founder effect in the state.

Key words: MJD, SCA3 ancestral origin, founder effect, Brazil.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Instituições e Fontes Financiadoras..... | I |
| Agradecimentos..... | II |
| Lista de abreviaturas, símbolos e unidades..... | III |
| Resumo..... | IV |
| Abstract..... | V |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 Ataxias Espinocerebelares..... | 1 |
| 1.2 Ataxia Espinocerebelar do Tipo 3..... | 3 |
| 1.2.1 Aspectos Clínicos..... | 3 |
| 1.2.2 Aspectos Moleculares..... | 5 |
| 1.2.3 Aspectos Genéticos | 7 |
| 1.2.4 Epidemiologia..... | 8 |
| 1.2.5 Origens Ancestrais de SCA3..... | 8 |
| 2. Justificativa..... | 12 |
| 3. Objetivos..... | 13 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 13 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 13 |
| 4.Resultados..... | 14 |
| 5. Discussão..... | 36 |
| 7. Referências..... | 38 |

1.Introdução

1.1. Ataxias Espinocerebelares

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

Os sintomas citados acima se fazem presentes no grupo como um todo, sendo que cada uma delas pode apresentar algum sintoma específico não encontrado em outras. Um exemplo é a perda visual com retinopatia encontrada em pacientes com SCA7. Pelo fato de serem doenças progressivas, os sintomas que as diferenciariam podem aparecer alguns anos após surgirem os primeiros sintomas, tornando muitas vezes difícil o diagnóstico baseado apenas na história clínica. A análise molecular dos genes associados as SCAs possibilitou a confirmação das suspeitas clínicas e a correto diagnóstico dos pacientes.

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

A prevalência internacional estimada para as SCAs varia de 0,3 a 3 para cada 100.000 indivíduos (van de Warrenburg et al, 2002). As SCA mais comuns são as causadas por expansões CAG em éxons, sendo que

Tabela 1 – Genética moleculcar das ataxias espinocerebelares (adaptado de Bird, 2012).

| Doença | Gene ou locus cromossômico | Mutação | Referência |
|--------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|
| SCA1 | <i>ATXN1</i> | Repetições CAG | Subramony & Ashizawa |
| SCA2 | <i>ATXN2</i> | Repetições CAG | Pulst 2010 |
| SCA3 | <i>ATXN3</i> | Repetições CAG | Paulson, 2011 |
| SCA4 | <i>16q22.1</i> | --- | Edener et al, 2011. |
| SCA5 | <i>SPTBN2</i> | Mutação sem sentido, e deleção | Ikeda et al, 2006 |
| SCA6 | <i>CACNA1A</i> | Repetições CAG | Gomez, 2008 |
| SCA7 | <i>ATXN7</i> | Repetições CAG | Garden, 2012 |
| SCA8 | <i>ATXN8/ATXN80S</i> | Repetições CAG-CTG | Ikeda et al, 2007 |
| SCA9 ¹ | ----- | --- | |
| SCA10 | <i>ATXN10</i> | Repetições ATTCT | Matsuura & Ashizawa, 2012 |
| SCA11 | <i>TTBK2</i> | Mudança no quadro de leitura | Houlden, 2008 |
| SCA12 | <i>PPP2R2B</i> | Repetições CAG | Margolis et al, 2011 |
| SCA13 | <i>KCNC3</i> | Mutação de não repetição | Pulst, 2012 |
| SCA14 | <i>PRKCG</i> | Mutação de não repetição | Chen et al, 2010 |
| SCA15 ² | <i>ITPR1</i> | Mutação sem sentido, deleção da região 5' do gene | Storey, 2011 |
| SCA16 ² | <i>ITPR1</i> | --- | Gardner, 2008 |
| SCA17 | <i>TBP</i> | Repetições CAG-CAA | Toyoshima et al, 2012 |
| SCA18 | <i>IFRD1</i> | Mutação de não repetição | Brkanac et al, 2009 |
| SCA19 ³ | <i>KCND3</i> | Mutação de não repetição | Duarri et al, 2012 |
| SCA20 | <i>11q12.2-11q12.3</i> | Duplicação de 260kb | Storey, 2012 |
| SCA21 | <i>SCA21</i> | --- | Vuillaume et al, 2002 |
| SCA22 ³ | <i>1p21-q21</i> | --- | Chung et al, 2003. |
| SCA23 | <i>PDYN</i> | Mutações de não repetição | Bakalkin et al, 2010 |
| SCA25 | <i>2p</i> | --- | Stevanin et al, 2005 |
| SCA26 | <i>19q13.3</i> | --- | Yu et al, 2005 |
| SCA27 | <i>FGF14</i> | Mutação sem sentido, mudança no quadro de leitura | Van Swieten et al, 2003 |
| SCA28 | <i>AFG3L2</i> | Mutação sem sentido | Mariotti et al, 2008 |
| SCA29 | <i>3p26</i> | --- | Dudding et al, 2004 |
| SCA30 | <i>4q34.3-q35.1</i> | --- | Storey et al, 2009 |
| SCA31 | <i>BEAN1</i> | Repetições TGGAA | Sato et al, 2009 |
| SCA35 | <i>TGM6</i> | Mutação de sentido trocado | Wang et al, 2010 |
| SCA36 | <i>NOP56</i> | Repetições GGCCTG | Kobayashi et al, 2011 |
| DRPLA | <i>ATN1</i> | Repetições CAG | Tsuji, 2010 |

¹SCA9 foi reservado, no entanto não existe nenhum dado clínico ou molecular da doença. ²SCA16 e SCA15 são as mesmas. ³SCA19 e SCA22 são prováveis formas alélicas no mesmo locus.

as SCA1, SCA2 e SCA3 correspondem de 40% a 80% de todas as SCAs, dependendo da população. Apesar disso, em torno de 45% dos pacientes com quadro clínico de ataxia espinocerebelar ainda permanecem sem diagnóstico (Durr, 2010; Marelli et al, 2011).

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

A doença de Machado-Joseph (Machado-Joseph Disease – MJD), também conhecida como Ataxia Espinocerebelar tipo 3 (SCA3), foi primeiramente descrita em descendentes de famílias de origem açoriana que moravam nos Estados Unidos: a família Machado (Nakano et al, 1972), proveniente da ilha de São Miguel, e a família Joseph, proveniente da ilha de Flores (Rosenberg et al, 1976). Quando foram realizados os estudos para identificar o gene causador da doença foi descoberto que o gene causador de MJD estava localizado no cromossomo 14, sendo que essa região estava associada à SCA3, que até então seria uma ataxia não relacionada com MJD. Após identificarem a causa específica das duas doenças, ficou comprovado que a mesma mutação causava MJD e SCA3, sendo assim definidas como a mesma doença.

1.2.1. Aspectos Clínicos

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

Por pertencer ao grupo das SCAs, a MJD/SCA3 sintomas semelhantes as demais doenças pertencente a esse grupo. Os sintomas começam com

instabilidade ao virar, seguido por desequilíbrio de marcha. Em poucos anos, este progride para um andar de base alargada acompanhada por incoordenação sutil dos membros superiores e a fala intercortada e mal articulada (disartria). Eventualmente, ataxia da marcha torna-se tão severa que o paciente precisa usar muletas, culminando com o uso de cadeira de rodas. Muitos pacientes também desenvolvem distúrbios oculomotores (nistagmo), espasticidade dos membros inferiores e em alguns casos sinais parkinsonianos. Esses sinais neurológicos não refletem um envolvimento cerebelar, mas sim correspondem a alterações neuropatológicas que ocorrem nos gânglios da base, tronco cerebral, medula espinhal e no sistema nervoso periférico, os quais também podem estar afetados (Paulson, 2007).

A ataxia de marcha é o primeiro sintoma a ser descrito na grande maioria dos pacientes. Uma divisão clínica foi proposta a partir dos cursos clínicos que os pacientes apresentavam (Costa & Paulson, 2012):

- Tipo 1 ("tipo Joseph") – sendo caracterizado por início precoce (média de 24,3 anos) e rápida progressão dos sintomas, que, juntamente com ataxia cerebelar e oftalmoplegia externa progressiva (EPO), incluem achados de sinais piramidais e extrapiramidais (como distonia);
- Tipo 2 ("tipo Thomas") – apresenta um início intermediário (média de 40,5 anos), ataxia cerebelar e EPO, com ou sem sinais piramidais. Quando presente, os sinais extrapiramidais e periféricos são tênues;
- Tipo 3 ("tipo Machado") – tem um início tardio (média de 46,8 anos) e é caracterizado por ataxia cerebelar e EPO, associado com alterações periféricas, com ou sem leves sinais piramidais e extrapiramidais;
- Tipo 4 – apresenta simultaneamente características de parkinsonismo, com moderados déficits cerebelares;
- Tipo 5 – foi proposto para raros casos de MJD que apresentem paraplegia espástica pura.

Escalas foram criadas para possibilitar uma melhor avaliação neurológica e assim conseguir uma medida para a gravidade das SCAs. As mais utilizadas são a ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e a SARA (*Scale for the*

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

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

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

1.2.2. Aspectos Moleculares

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

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

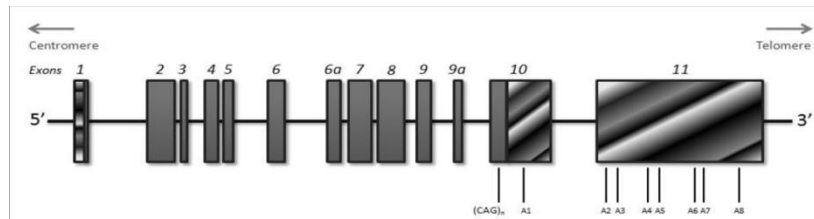


Figura 1. Esquema do gene *ATXN3* com a localização das repetições CAG (Bettencourt & Lima, 2011).

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

O gene *ATXN3* codifica a proteína ataxina-3, a qual é composta por 339 aminoácidos mais o número variável de glutaminas. A forma selvagem da proteína apresenta funções de uma enzima de deubiquitinação (DUB) que atua na via ubiquitina proteossomo. Também foi proposto o seu envolvimento na regulação da transcrição de proteínas (Ries et al, 2008). O gene *ATXN3* mutante não apresenta alteração na sua transcrição ou tradução, mas a presença anormal de poliglutaminas na proteína ataxina-3 altera a localização da mesma. A ataxina-3 é normalmente uma proteína predominantemente citoplasmática em neurônios (Pozzi et al, 2008). Entretanto, no caso da presença de um maior número de glutaminas na proteína, a mesma é encontrada concentrada no núcleo dos neurônios na forma de inclusões neuronais. Essas inclusões neuronais, que também são encontrados em outras doenças causadas por poliglutamínicas, são fortemente ubiquitinados e contêm chaperonas moleculares de choque de calor e subunidades proteossômicas, sugerindo que eles são repositórios de proteínas malformadas e agregadas (Schmidt et al, 2002). A presença de inclusões intranucleares neuronais ubiquitinadas (NInIs) tem sido reconhecida como uma característica neuropatológica destas doenças, embora sua função na patogênese continua a ser um motivo de controvérsia (Yamada et al, 2005). Alguns estudos sugerem que as inclusões não são diretamente as estruturas

responsáveis pela patogenicidade da doença e, sim, um meio da célula combater as proteínas anormais tornando-as não tóxicas através da agregação (Evert et al, 2006; Rub et al, 2006).

1.2.3 - Aspectos Genéticos

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

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

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

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

1.2.4 – Epidemiologia

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

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

A primeira publicação da MJD/SCA3 no Brasil foi a descrição de cinco pacientes de uma mesma família (Teive et al, 1991). Relatos mais recentes apontam para uma frequência de 69% de MJD/SCA3 dentre os casos de SCA no Brasil (Teive et al, 2008). No entanto, no estado do Rio Grande do Sul, a frequência de MJD/SCA3 é estimada em 84% dos casos de ataxias (Trott et al, 2006). Baseado nessa estimativa, a frequência estimada de indivíduos afetados seria de 1,8:100.000 casos, refletindo um possível efeito fundador açoriano (Jardim et al, 2001).

1.2.5 – Origens Ancestrais

Os indivíduos com MJD/SCA3 que se encontram nos Açores se concentram principalmente na ilha de Flores e na ilha de São Miguel, onde a prevalência estimada é de 835,2:100.000 e 27,1:100.000 (Coutinho et al, 1994), respectivamente. Acredita-se que essa presença elevada de pacientes com

MJD/SCA3 nestas ilhas pode ser explicada por um efeito fundador que teve início com o começo da colonização destas ilhas pelos portugueses em 1432 (Sequeiros, 1993). E a existência desta doença em alta frequência em países do orientais, tais como Índia e Japão, e no Brasil pode ser explicado pelas grandes navegações feitas pelos portugueses nos séculos XV e XVI.

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

Os estudos moleculares sobre a origem ancestral contribuiu para a elucidação de alguns detalhes sobre a origem da mutação causadora da doença. O primeiro estudo utilizou marcadores internos no gene *ATXN3* localizados nas seguintes posições: G669A, G987C e A1118C. Nesse estudo foi sugerido a existência de dois eventos mutacionais na população portuguesa responsáveis por dois haplótipos distintos nas Ilhas de São Miguel e de Flores. O haplótipo GGC foi associado com os indivíduos originários da ilha de São Miguel e por isso também ficando conhecido como o haplótipo Machado. E o haplótipo ACA foi associado com os indivíduos originários da ilha de Flores e por isso ficou conhecido como haplótipo Joseph. Sendo que os dois haplótipos foram encontrados em pacientes de Portugal continental (Gaspar et al, 2001).

No mesmo estudo, os mesmos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP – *single nucleotide polymorfism*) foram analisados em indivíduos de outros países e, no total, oito haplótipos foram identificados a partir da combinação destes polimorfismos em indivíduos controle (sem expansão CAG), sendo que os mais frequentes eram os haplótipos GGC (38%) e GCC (19%). Porém, nos indivíduos que apresentam expansão CAG, somente quatro haplótipos foram encontrados com a seguinte distribuição: ACA (72%), GGC (22%), AGA (3%) e GGA (1%). Analisando esses resultados, pode-se observar que os haplótipos ACA e GGC são os mesmos presentes nos Açores e que os haplótipos AGA e GGA poderiam ter surgido a partir do haplótipo GGC, através de recombinação, ou o alelo AGA poderia ter surgido de ser uma única mutação de nucleotídeo a partir do haplótipo ACA (Gaspar et al, 2001).

Mais recentemente, outros marcadores foram adicionados para formar um haplótipo mais abrangente. Estudos posteriores adicionaram 3 novos SNP a serem utilizados (IVS6-30G>T, GTT⁵²⁷/GTC⁵²⁷ e C¹¹⁷⁸/A¹¹⁷⁸) e 4 STR adjacentes ao gene *ATXN3* [(TAT)_n, (CA)_n, (AC)_n e (GT)_n]. Com a análise dos 6 SNP e dos 4 STR em um estudo utilizando controles dos continentes europeu, asiático e africano. A partir desse estudo, onze haplótipos foram encontrados no gene *ATXN3*, sendo sete deles raros, e os mais frequentemente encontrados foram GTGGCA, TTAGAC, TTACAC e GCGGCA, sendo este último o mais comum em vários lugares no mundo (Tabela 2) (Martins et al, 2006).

Tabela 2 – Frequência haplotípica em porcentagem (adaptado de Martins et al, 2006).

| Haplótipo | Europa | Ásia | África |
|---------------|--------|------|--------|
| GCGGCA | 51,3 | 40,0 | 40,7 |
| GTGGCA | 20,9 | 3,0 | 5,5 |
| TTAGAC | 0,4 | 6,0 | 37,0 |
| TTACAC | 24,9 | 49,0 | 14,8 |
| Outros | 2,5 | 2,0 | 2,0 |

Quando analisado os mesmos 10 marcadores em famílias com diagnóstico de MJD/SCA3 de 20 países, foram encontrados apenas três haplótipos levando-se em conta apenas os SNP: 1) O haplótipo TTACAC foi encontrado em alta frequência em famílias com diagnóstico de MJD/SCA3 de 19 do total das 20 populações estudadas. 2) O haplótipo GTGGCA foi encontrado em famílias com diagnóstico de MJD/SCA3 principalmente em Portugal, outras sete populações apresentaram o haplótipo, no entanto em baixa frequência. 3) O haplótipo GTGCCA foi encontrado somente em 3 famílias portuguesas da ilha de São Miguel. A partir da análise dos STR, duas possíveis origens para MJD/SCA3 foram sugeridas, conforme descrito a seguir. A primeira delas sendo a mais antiga, do haplótipo TTACAC, o qual teria surgido em torno de sete mil anos atrás, e onde a MJD/SCA3 seria oriunda da Ásia, provavelmente do Japão, e teria se introduzido por toda a Europa, e não primeiramente em Portugal e depois se espalhado pela Europa. No entanto se viu que a existência de MJD/SCA3 no

Brasil possivelmente foi introduzida pelos portugueses. E a do haplótipo GTGGCA que tem sua origem mais recente, tendo surgido em torno de dois mil anos atrás, onde a SCA3 seria oriunda de Portugal, no entanto a baixa diversidade de haplótipo dos portugueses quando comparados aos não portugueses, poderia induzir a crer em uma origem não portuguesa, mas baixa presença deste haplótipo fora de Portugal e por serem de localidades isoladas poderia levar a uma subestimação da sua idade (Martins et al, 2007).

2. Justificativa

A MJD/SCA3 é a ataxia mais frequente no Brasil (69%) e principalmente no Rio Grande do Sul (84%) onde a frequência estimada é de 1,8:100.000. Por isso a identificação de haplótipos ligados ao gene *ATXN3* é de extrema importância para tentar se correlacionar um haplótipo com a doença, assim podendo fornecer meios para entender a presença de alelos expandidos no Brasil ao tentar se determinar uma possível origem da doença nesta população e a alta frequência no estado do Rio Grande do Sul

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Estudar os haplótipos ligados ao gene *ATXN3* na população do Brasil e tentar determinar a possível origem dessa doença no país.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de polimorfismos do tipo SNP no gene *ATXN3*.
- Identificar haplótipos de STR em regiões adjacentes ao gene *ATXN3* e estimar suas frequências.
- Comparar os haplótipos dos pacientes do Brasil com os de outros países.

4.Resultados

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de um artigo, o qual será submetido para publicação no European Journal of Human Genetics.

Ancestral origins of Machado-Joseph Disease: a comprehensive study in Brazilian patients.

Gabriel Vasata Furtado^{1,2,3}; Tailise Conte Genho^{1,2,3}; Laura Bannach Jardim^{3,4} MD, PhD,
Maria Luiza Saraiva Pereira^{1,3,5}, MD, PhD.

¹Laboratório de Identificação Genética, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil;

²Departamento de Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil;

³Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil;

⁴Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil;

⁵Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Correspondence to:

Maria Luiza Saraiva Pereira, PhD

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 – Porto Alegre – RS

Brazil

Tel: + 55 51 33168011

Fax: + 55 51 33168010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Machado-Joseph disease or spinocerebellar ataxia type 3 (MJD/SCA3) is a late onset autosomal dominant disorder characterized mainly by progressive cerebellar ataxia and pyramidal signs due to an expansion of a CAG tract in exon 10 of ATXN3 gene. High prevalence of the mutant gene is observed in Brazil and haplotype analyses in Brazilian MJD/SCA3 patients are relevant to define the origin disease of lineages in our population. The study included 262 Brazilian MJD/SCA3 patients and 50 controls. Three intragenic single-nucleotide polymorphism were used for determine MJD/SCA3 lineage, and four flanking short tandem repeats were used to determine a population background. The most prevalent lineage in both subpopulations of patients with the disease is ACA. The GGC lineage was found in one patient only in Rio Grande do Sul, but was present in twelve families in the group of patients from other states and in several controls. The AGA haplotype was also present in both subpopulations at low frequency. The analysis of flanking short tandem repeats show that the majority of patients from the same lineage share the same haplotype. Data reported here shows clearly that the most frequently found haplotype in the ACA lineage of MJD/SCA3 patients in Brazil is the same found in Portugal and other European populations, following an Asian migration through North America. Moreover, this study brings a more comprehensive view on the ancestral origin of mutant ATXN3 alleles in the Brazilian population and adds new information to historical events.

Introduction

Machado-Joseph disease or spinocerebellar ataxia type 3 (MJD/SCA3) is a late onset autosomal dominant disorder characterized mainly by progressive cerebellar ataxia and pyramidal signs¹. The molecular basis of the disease is an expansion of a CAG tract in exon 10 of ATXN3 gene that can be found with 52 or more repeats in the affected individuals while this repeat contains up to 44 units in healthy subjects².

MJD/SCA3 was first described in three American families of Azorean origin³⁻⁵, and high frequency of this disease was later also seen in two Azorean islands, namely Flores and São Miguel. Further reports demonstrated that this form of ataxia is the most common in several countries worldwide⁶ with variable frequencies, as follows: 58% in Portugal⁷, 49% in China⁸, 42% in Germany⁹, 28% in Japan¹⁰, 21% in the United States of America¹¹, and 20% in France¹².

Studies concerning the origin of the disease showed the presence of intragenic haplotypes ACA and GGC in 94% of SCA3 patients, where the ACA variant corresponded to 72% of genotypes of patients¹³. The existence of two mutational events was later proposed with evaluations of extended haplotypes. The first is represented by TTACAA haplotype, which would have been originated in Asia six thousand years ago and spread over the world, being found today in many countries. The second proposed mutational event is represented by GTGGCA haplotype and present only in a few nations, especially in the Portuguese island of São Miguel; this genotype was estimated to be just two thousand years old¹⁴.

In Brazil, the first reports of families carrying MJD/SCA3 dated to the beginning of the 1990's¹⁵. With the onset of molecular diagnosis, a high prevalence of the mutant gene was also observed in this country. Different prevalence has been reported by different groups among SCAs

in general, for instance 44%¹⁶, 69%¹⁷, and 84%¹⁸. The latter was observed in the Southern state of Rio Grande do Sul (RS) where the frequency of the disease was estimated to be 1.8:100,000¹⁹. Based on these data, haplotype analyses in Brazilian MJD/SCA3 patients are relevant to define the origin disease of lineages in our population.

Methods

Samples

A total of 262 MJD/SCA3 patients were selected and CAG expansions were previously confirmed by molecular analysis. Diseased samples were divided into two groups: (1) 220 patients from Rio Grande do Sul (RS group) State; (2) 42 individuals from other Brazilian States (OS group) including Minas Gerais, Pará, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte and São Paulo States. All patients were diagnosed by the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Samples from this second group were obtained through the Brazilian Neurogenetics Network. Additionally, 50 control samples without history of SCA3 from an anonymous genetic bank were included in the analyses. All subjects participating on the study were informed of the proceedings and signed an informed consent form.

SNP genotyping

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) included in this study were as follows: G⁶⁶⁹TG/A⁶⁶⁹TG (rs1048755), G⁹⁸⁷GG/C⁹⁸⁷GG (rs12895357), and TAC¹¹¹⁸/TAA¹¹¹⁸ (rs7158733). The SNP at position 669 was determined by qualitative real time polymerase chain reaction (qPCR) using the TaqMan[®] PCR Assay (Applied Biosystems), based on DNA minor groove-binding fluorescent probes. Amplifications were performed in a final volume of 8 µL, containing 4 ng of DNA, 0.2 µL of specific TaqMan[®] assay, and 4 µL of 2X PCR Genotyping Master Mix (Applied Biosystems). Following amplification, products were analyzed by the Sequence Detection System software version 1.2.1 (Applied Biosystems) in the ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) through allelic discrimination plot. The other two SNPs (G⁹⁸⁷GG/C⁹⁸⁷GG and TAC¹¹¹⁸/TAA¹¹¹⁸) were

identified by the amplification refractory mutation system (ARMS), as previously described¹³. Amplicons were then resolved onto 2% (w/v) agarose gel electrophoresis. Phase of these two polymorphisms ($G^{987}GG/C^{987}GG$ and TAC^{1118}/TAA^{1118}), to be close to the region of CAG, were defined by the applied methodology, while phase of SNP $G^{669}TG/A^{669}TG$ was reconstructed by PHASE software version 2.0 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>).

STR analysis

Short tandem repeats (STRs) analyzed comprehended $(TAT)_n$ (rs60264948), $(CA)_n$ (rs72265156), $(AC)_n$ (rs10664277) and $(GT)_n$ (rs35641569), and were identified by a multiplex assay using fluorescent primers. Four pair of primers were placed in the same reaction, being one pair for each STR: TATF (5'-6FAM-cacaagtggtgctagcctttg), TATR (5'-cagtgagctgagatcgtgcc), CAF (5'-gagcttgggaggttgaggc), CAR (5'-VIC-cctcaggccccataggttgg), ACF (5'-gatgtgatgtcttgatgtgc), ACR (5'-NED-cctgacaattcttgtttcacc), GTF (5'-PET-cctggcctactacctacgtc) and GTR (5'-gcactgcaaaccagtagcac). PCR reaction were performed using 200 ng of genomic DNA with 500 mol/L dNTPs, 2,5 mmol/L $MgCl_2$, 0,8 mol/L DMSO, 2 U of TaqGold in 1X TaqGold buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the presence of 0,2 pmol of primers TATF, TATR, CAF, CAR, ACF and ACR and 0,08 pmol of primers GTF and GTR. PCR cycling parameters were as follows: initial denaturation step of 10 minutes at 94°C, 30 cycles of 30 seconds at 94°C, 45 seconds at 62°C, 90 seconds at 72°C, and 5 minutes of final extension at 72°C. After amplification, an aliquot of PCR products were mixed with formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems) and GeneScan™ 500 LIZ (Applied Biosystems), and capillary electrophoresis was performed in an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Amplicon lengths were estimated using GeneMapper version 3.2 software (Applied Biosystems). Haplotypes were constructed by PHASE software version 2.0 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>). Allelic frequencies of

each SNP and STR and haplotype frequencies from overall cohort of patients and controls were evaluated using Pearson chi-square test and chi-square test with Yates's correction.

Results

SNP Analyses

Distribution of alleles after SNP analyses is demonstrated in table 1. In part A, SNP frequencies were shown regardless whether linked to normal or mutant allele within patients group. When comparing alleles distribution in the group of patients to alleles distribution in the controls, statistically difference was observed ($p < 0.05$ – Pearson χ^2). In part B, allele distribution is presented according to linkage to normal or mutant allele.

When analyzing alleles linked to CAG expansions, an inversion in the proportions was observed when compared to normal alleles in all three subpopulations, with alleles A669 (RS = 0.995; OS = 0.71), C987 (RS = 0.97; OS = 0.64), and A1118 (RS = 0.995; OS = 0.71) being the most prevalent in both subpopulations.

SNP haplotype

Haplotype distribution in our cohort is demonstrated in table 2. Four haplotypes (GGC, ACA, AGA, and GGA) was found among normal alleles from patients and controls. GGC lineage was the most common, followed by ACA, while the remaining two haplotypes were responsible for no more than 5% of the population. No statistically significant difference was observed in the three subset of individual ($p > 0.05$).

In the mutant alleles, ACA was the most common lineage (96.7% of cases in RS and 64.3% of cases from other states of Brazil) and lineage GGC was identified in 28.6% of expanded alleles in patients from other states of Brazil.

STR Analysis

STR (TAT)_n analysis identified 10 alleles ranging from 10 to 19 repeats and alleles with 10, 11, and 16 repeats were the most frequent ones. These frequent alleles together account to 71% to 94% of all alleles. The allele with 10 (TAT) repeats was shown to be linked in greater proportion to normal alleles, while presence of alleles with 11 repeats is more commonly found in expanded alleles. Variants with 16 repeats had similar frequencies in all subpopulations, except for expanded alleles in RS (Figure 1A).

Fourteen different alleles were defined in the analysis of (CA)_n repeats, and more common alleles were those with 21 to 26 repeats (83% to 100% of subpopulations). (CA)₂₁ alleles were present almost exclusively linked to expanded alleles, while in controls alleles with 22 to 26 repeats were common among samples in this group. Profile of (CA)₂₂ variant was similar to (TAT)₁₆, being found at low frequency among expanded alleles from RS only (Figure 1B).

In the case of (AC)_n, 8 alleles were defined ranging from 12 to 19 repeats. Alleles with 13 and 14 repeats were responsible for 69% to 94% of variants in all subpopulations. Moreover, presence of (AC)₁₃ was almost exclusively linked to normal alleles. (AC)₁₄ was more frequently linked to the expanded allele although it was found in all extracts. (AC)₁₈ represented 21% of the OS expanded alleles being almost non existent in other groups (Figure 1C).

The (GT)_n repeats comprehended 7 different alleles and alleles with 15 repeats were prevalent in both RS and OS subpopulations, with similar frequencies within cohorts of normal or expanded alleles. Most prevalent alleles in the controls were (GT)₁₉ (39%) and (GT)₁₅ (37%).

STR haplotypes in expanded alleles

ACA lineage was characterized by low genetic diversity for both populations of expanding alleles (gene diversity +/- SD, 0.10 +/- 0.10). This observation was mainly due to haplotype H1 (11-21-14-15) considering that this was the most prevalent haplotype in all subpopulations, shared by 85% of individuals (Table 3). We can also speculate that this haplotype is probably the mean by which the mutated gene was introduced in the country. Other common haplotypes from the same lineage were also identified, especially two forms derived from H1 – H2 (11-21-15-15) in RS and H3 (10-21-14-15) in OS.

Greater genetic diversity (gene diversity +/- SD, 0.47 +/- 0.32) was seen at GGC lineage even though this lineage was less represented. Haplotype H.2 (16-22-18-19) was the major variant linked to the expanded allele. Moreover, (AC)₁₈ was only found in this population, where it is associated to the expanded allele ($p < 0,05$). Among alleles from AGA lineage, haplotype H'1 (17-22-14-19) was the most common.

Discussion

The work presented here is the most comprehensive accomplished with Brazilian MJD/SCA patients. SNP haplotype distribution in controls was similar to that described previously in Europe²⁰, with a high prevalence of GGC lineage, and STR haplotype in the same group was shown to be very diverse. This outcome was different from results in groups of patients.

ACA lineage

This lineage was the most prevalent in the present study characterized in 240 from a total of 262 patients. In Brazil, inheritance of this variant is similar to what is observed in the population worldwide¹³; however, presence of this lineage was found in more than 95% of expanded alleles in individuals from RS. STRs linked to ACA lineage showed high prevalence of H1 haplotype and its derivatives (H2 and H3). This data is in agreement with historical aspects of the disease in Brazil, where a large number of families are from Portuguese-Azorean origin¹⁹. This indicates that MJD/SCA3 introduction in Brazil was due to migration of Portuguese subjects of Azorean background, a similar haplotypically population¹⁴. Therefore, a founder effect from this same population explains the high number of MJD/SCA3 cases reported in RS (84% of all SCA subtypes)¹⁸.

GGC lineage

The presence of this lineage in Brazil is also probably due to Portuguese migration, more specifically from São Miguel Island. This theory is based on the findings that the most common STR found in Brazil – H.2 – is the second most frequent in patients worldwide, especially in Azores¹⁴.

AGA lineage

Alleles represented by this lineage are more related to those identified in the GGC lineage than those observed in the ACA lineage. This observation raises the hypothesis of a single nucleotide mutation of haplotype ACA in a recent event¹³. However, the AGA variant was described in only few patients up to date, but it is one of the most frequent among normal alleles in the African population²⁰, where information on MJD/SCA3 cases is not available. Hence, it could also be argued whether the AGA haplotype came from the African continent.

Final remarks

Brazil was colonized by Portugal in the XVI century and this fact is seen as the main reason for the high prevalence of MJD/SCA3 in this country. Cases of this condition are reported all over Brazil, but the high prevalence of reported cases in RS is associated to a founder effect by late arrival of inhabitants from Azores. Data reported here shows clearly that the most frequently found haplotype in the ACA lineage of MJD/SCA3 patients in Brazil is the same found in Portugal and other European populations, following an Asian migration through North America. Moreover, this study brings a more comprehensive view of the ancestral origin of mutant ATXN3 alleles in the Brazilian population and adds new information to historical events.

References

1. Lima L, Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology*. 1980; 30(3):319-322.
2. Maciel P, Costa MC, Ferro A, *et al*. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2001; 58(11):1821-1827.
3. Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*. 1972; 22(1):49-55.
4. Woods BT, Schaumburg HH. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinicopathological entity. *J Neurol Sci* 1972; 17(2):149-166.
5. Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*. 1976; 26(8):703-714.
6. Sequeiros J, Martins S, Silveira I. Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. *Handb Clin Neurol*. 2012; 103: 227-251.
7. Vale J, Bugalho P, Silveira I, Sequeiros J, Guimaraes J, Coutinho P: Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol*. 2010; 17(1):124-128.
8. Jiang H, Tang BS, Xu B, *et al*. Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in mainland Chinese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118(10):837-843.

9. Schols L, Amoiridis G, Buttner T, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol.* 1997; 42(6):924-932.
10. Maruyama H, Izumi Y, Morino H, *et al.* Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet.* 2002; 114(5):578-583.
11. Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, *et al.* Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology.* 1998; 51(6):1666-1671.
12. Durr A, Forlani S, Cazeneuve C, *et al.* Conventional mutations are associated with a different phenotype than polyglutamine expansions in spinocerebellar ataxias. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17 (suppl 2): 335.
13. Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, *et al.* Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(2):523-528.
14. Martins S, Calafell F, Gaspar C, *et al.* Asian origin for the worldwidespread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.* 2007; 64(10):1502-1508.
15. Teive HAG, Arruda W, Trevisol-Bittencourt PC. Machado-Joseph disease: description of 5 members of a family. *Arq Neuropsiquiatr.* 1991; 49: 172-179.
16. Lopes-Cendes I, Teive HGA, Calcagnotto, *et al.* Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 1997; 55: 519-529
17. Teive HA, Munhoz RP, Raskin S, Werneck LC. Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008; 66(3B):691-694.

18. Trott A, Jardim LB, Ludwig HT, *et al.* Spinocerebellar ataxias in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet.* 2006; 70: 173-6.
19. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, *et al.* A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil: 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol.* 2001; 248(10):870-876.
20. Martins S, Calafell F, Wong VC, Sequeiros J, Amorim A. A multistep mutation mechanism drives the evolution of the CAG repeat at MJD/SCA3 locus. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(8):932-940.

Table 1 - Distribution of alleles in the studied cohort.

| SNP | Allele | Alleles of patients from RS (n=440) | Alleles of patients from OS (n=84) | Alleles of all patients (n=524) | Alleles of controls (n=100) |
|---------------|--------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| G669A | G | 0.425 | 0.536 | 0.443 | 0.740 |
| | A | 0.575 | 0.464 | 0.557 | 0.260 |
| G987C | G | 0.445 | 0.583 | 0.467 | 0.790 |
| | C | 0.555 | 0.427 | 0.533 | 0.210 |
| C1118A | C | 0.423 | 0.524 | 0.439 | 0.740 |
| | A | 0.577 | 0.476 | 0.561 | 0.260 |

| SNP | Allele | Alleles of patients from RS (n=440) | | Alleles of patients from OS (n=84) | |
|---------------|--------|-------------------------------------|----------------|------------------------------------|---------------|
| | | Mutant (n=220) | Normal (n=220) | Mutant (n=42) | Normal (n=42) |
| G669A | G | 0,005 | 0.845 | 0.286 | 0.786 |
| | A | 0.995 | 0.155 | 0.714 | 0.214 |
| G987C | G | 0.032 | 0.859 | 0.357 | 0.809 |
| | C | 0.968 | 0.141 | 0.643 | 0.191 |
| C1118A | C | 0.005 | 0.841 | 0.286 | 0.762 |
| | A | 0.995 | 0.159 | 0.714 | 0.238 |

Table 2. SNP haplotype distribution in our cohort.

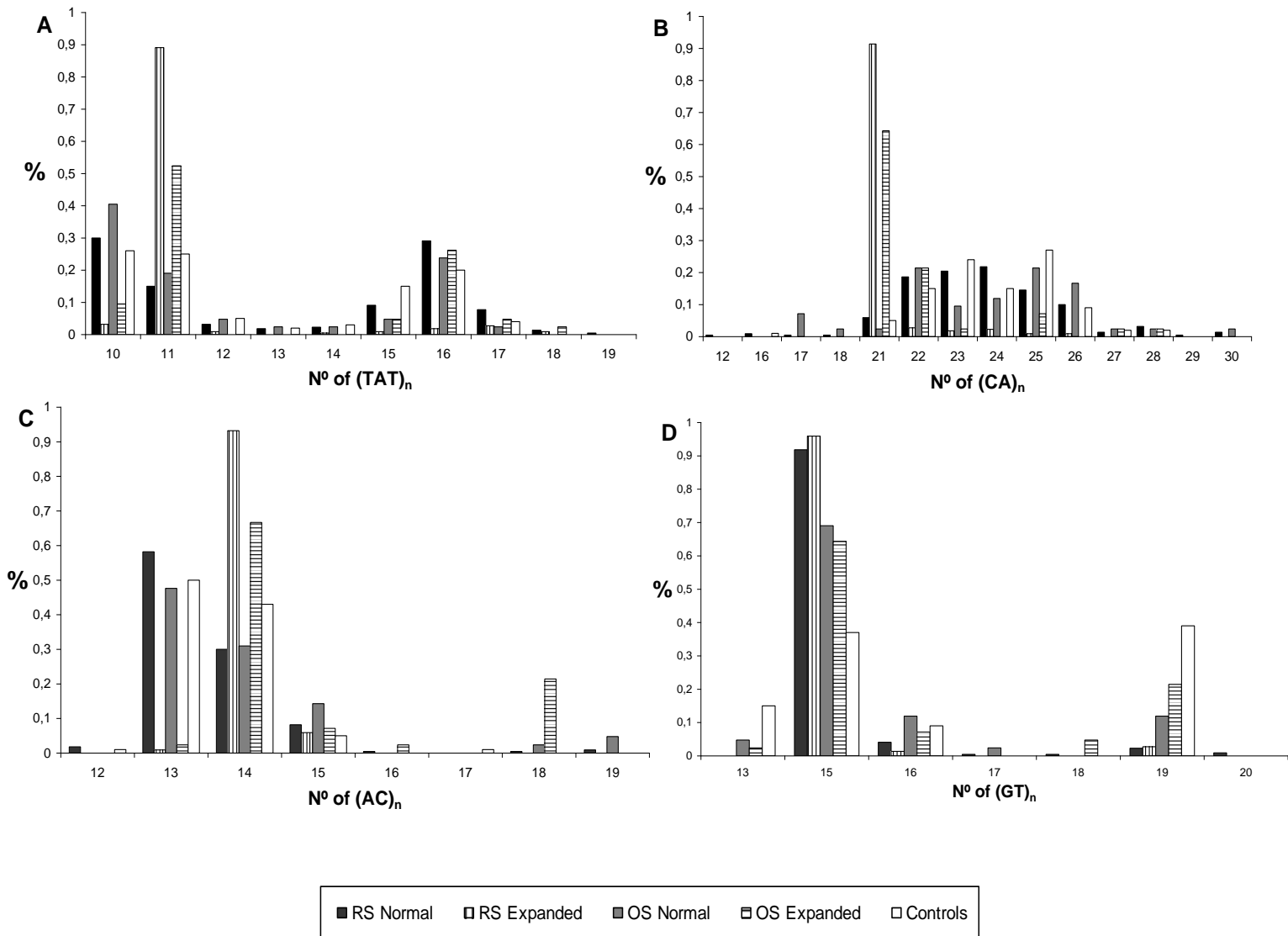
| Haplotypes | Patients from RS State (n=220) | | Patients from other States of Brazil (n=42) | | Controls (n=50) |
|------------|-----------------------------------|------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|
| | Normal alleles (n=220) | Mutant alleles (n=220) | Normal alleles (n=42) | Mutant alleles (n=42) | Normal alleles (n=100) |
| GGC | 184 (83.6%) | 1 (0.5%) | 32 (76.2%) | 12 (28.6%) | 74 (74.0%) |
| ACA | 32 (14.5%) | 213 (96.7%) | 8 (19.0%) | 27 (64.3%) | 21 (21.0%) |
| AGA | 3 (1.4%) | 6 (2.8%) | 1 (2.4%) | 3 (7.1%) | 5 (5.0%) |
| GGA | 1 (0.5%) | – | 1 (2.4%) | – | – |

Table 3. Haplotype distribution in MJD/SCA3 lineage.

| Lineage | Origin | Haplotype ^a | Families (n) |
|------------|---------------------|------------------------|--------------|
| ACA | RS | H1: 11 21 14 15 | 182 |
| | | H2: 11 21 15 15 | 10 |
| | | H3: 10 21 14 15 | 3 |
| | | H4: 10 24 14 15 | 2 |
| | | H5: 18 23 14 15 | 2 |
| | Other 14 haplotypes | 1 ^b | |
| | OS | H1: 11 21 14 15 | 21 |
| | | H3: 10 21 14 15 | 4 |
| | | H2: 11 21 15 15 | 1 |
| | | H6: 15 21 14 15 | 1 |
| GGC | RS | H.1: 16 24 13 16 | 1 |
| | OS | H.2: 16 22 18 19 | 7 |
| | | H.3: 17 22 18 19 | 2 |
| | | H.4: 16 25 14 16 | 1 |
| | | H.5: 16 27 14 13 | 1 |
| | | H.6: 16 28 15 18 | 1 |
| AGA | RS | H'1: 17 22 14 19 | 4 |
| | | H'2: 17 22 14 16 | 1 |
| | | H'3: 16 25 15 16 | 1 |
| | OS | H'4: 10 17 14 16 | 1 |
| | | H'5: 15 23 15 18 | 1 |
| | | H'6: 16 25 16 16 | 1 |

RS represents patients from Rio Grande do Sul State, OS represents patients from other states from Brazil; ^aall haplotypes were reconstructed by the Bayesian method in PHASE software version 2.0; ^bone family by haplotype.

Figure 1. Distribution of STR in all subpopulations.



Legends

Figure 1. STR distribution in subpopulations. Black bars represent RS normal allele; black with white stripes bars represent RS expanded allele; gray bars represent OS normal allele; white with black stripes bars represent OS expanded allele; white bars represent controls.

a) (TAT)_n; b) (CA)_n; c) (AC)_n and d) (GT)_n.

5. Discussão

Os dados desse trabalho são os mais abrangentes em pacientes brasileiros com MJD/SCA3. A distribuição de SNP nos haplótipos dos controles foi semelhante ao descrito anteriormente na Europa, com uma elevada prevalência da linhagem GGC e o haplótipo dos STR no mesmo grupo mostrou ser muito diferente. Este resultado foi diferente dos resultados dos grupos de pacientes.

A linhagem ACA foi a mais prevalente no presente estudo e foi identificada em 240 de um total de 262 pacientes. No Brasil, a herança desta variante é semelhante ao que é observado na população mundial. No entanto, a presença desta linhagem foi encontrada em mais de 95% dos alelos expandidos em indivíduos de RS. STR ligados à linhagem ACA mostrou alta prevalência do haplótipo H1 e dos seus derivados (H2 e H3). Esta informação está em concordância com os aspectos históricos da doença no Brasil, onde um grande número de famílias de origem portuguesa e, em geral, açoriana. Isso indica que introdução da MJD/SCA3 no Brasil foi devido à migração de portugueses oriundos dos Açores, uma população com haplótipos semelhantes. Portanto, um efeito fundador desta mesma população explica o número elevado de casos de MJD/SCA3 descritos no RS (84% de todos os subtipos de SCA).

A presença da linhagem GGC no Brasil é também, provavelmente, devido à imigração portuguesa, mais especificamente da Ilha de São Miguel. Esta teoria é baseada nos resultados que o haplótipo mais comumente encontrado no Brasil - H.2 - é o segundo mais frequente em pacientes no mundo, especialmente nos Açores.

Alelos representados pela linhagem AGA estão mais relacionados com os identificados na linhagem GGC do que as observadas na linhagem ACA. Esta observação levanta a hipótese de uma mutação de ponto no haplótipo ACA em um evento recente. No entanto, a variante AGA foi descrita em poucos pacientes com MJD/SCA3 até o momento, mas é uma das mais frequentes entre alelos

normais na população africana, onde as informações sobre casos de MJD/SCA3 não estão disponíveis. Por isso, é possível argumentar que o haplótipo AGA não poderia ser oriundo do continente Africano.

O Brasil foi colonizado por Portugal no século XVI e este fato é visto como a principal razão para a alta prevalência de MJD/SCA3 no país. Casos desta doença são relatados em todo o Brasil, mas a alta prevalência de casos notificados no RS esta associada a um efeito fundador pela chegada tardia dos habitantes dos Açores. Os dados descritos nesse trabalho demonstram claramente que o haplótipo mais frequentemente encontrado na linhagem ACA de pacientes com MJD/SCA3 no Brasil é o mesmo encontrado em Portugal e outras populações europeias, após uma migração a partir da Ásia através da América do Norte. Além disso, este estudo traz uma visão mais abrangente da origem ancestral de alelos mutantes no gene ATXN3 na população brasileira e acrescenta prova biológica aos eventos históricos.

6. Referências

- Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, et al (2007). Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord* 22:1050-1053.
- Bakalkin G, Watanabe H, Jeziarska J, et al (2010). Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Am J Hum Genet* 87:593–603.
- Bettencourt C, Lima M (2011). Machado-Joseph Disease: From first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 6:35.
- Bettencourt C, Santos C, Montiel R, et al (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics* 11:193-202.
- Brkanac Z, Fernandez M, Matsushita M, et al (2002). Autosomal dominant sensory/motor neuropathy with Ataxia (SMNA): Linkage to chromosome 7q22-q32. *Am J Med Genet* 114:450–457.
- Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, et al (2004). Mutation Analysis of Spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 255 Italian families. *Arch Neurol* 61:727-733.
- Bryer A, Krause A, Bill P, et al (2003). The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216:47-54.
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, et al (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 38:296-299.
- Chen DH, Bird TD, Raskind WH. Spinocerebellar Ataxia Type 14. 2005 Jan 28 [Updated 2010 Mar 23]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1399/>

- Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW (2003). A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain* 126:1293–1299.
- Costa Mdo C, Paulson H (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol* 97:239-257.
- Coutinho P, Silva MC, Gonçalves AF, et al (1994). Epidemiologia da doença de Machado-Joseph em Portugal. *Rev Port Neurol* 3:69-76.
- Dudding TE, Friend K, Schofield PW, et al (2004). Autosomal dominant congenital non-progressive ataxia overlaps with the SCA15 locus. *Neurology* 63:2288–2292.
- Durr A (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 9:885-894.
- Duarri A, Jezierska J, Fokkens M, et al (2012). Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Ann Neurol* 72:870-880.
- Edener U, Bernard V, Hellenbroich Y, et al (2011). Two dominantly inherited ataxias linked to chromosome 16q22.1: SCA4 and SCA31 are not allelic. *J Neurol* 258:1223–1227
- Emmel VE, Alonso I, Jardim LB, et al (2011). Does DNA methylation in the promoter region of the *ATXN3* gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients?. *Clin Genet* 79:100-102.
- Evert BO, Schelhaas J, Fleischer H, et al (2006). Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* 25:272–281.
- Faruq M, Scaria V, Singh I, et al (2009). SCA-LSD: a repeat-oriented locus-specific variation database for genotype to phenotype correlations in spinocerebellar ataxias. *Hum Mutat* 30:1037-1042.

- Garden G. Spinocerebellar Ataxia Type 7. 1998 Aug 27 [Updated 2012 Dec 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/>
- Gardner RJ (2008). "SCA16' is really SCA15. *J Med Genet* 45:192.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, et al (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet* 68:523-528.
- Gomez CM. Spinocerebellar Ataxia Type 6. 1998 Oct 23 [Updated 2008 Jun 16]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1140/>
- Houlden H. Spinocerebellar Ataxia Type 11. 2008 Jul 22 [Updated 2013 Mar 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1757/>
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38:184–190.
- Ikeda Y, Dalton JC, Day JW, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 8. 2001 Nov 27 [Updated 2007 Feb 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1268/>
- Iughetti P, Otto PA, Zatz M, Passos-Bueno MR (1998). Different behavior in the paternally vs maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet* 77: 246-248.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, et al (2001a). A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248:870-876.

- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, et al (2001b). Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. *Acta Neurol Scand* 104:224-231.
- Jardim LB, Hauser L, Kieling C, et al (2010). Progression Rate of Neurological Deficits in a 10-year Cohort of SCA3 Patients. *Cerebellum* 9:419-428.
- Jiang H, Tang B, Xia K, et al (2005). Spinocerebellar ataxia type 6 in mainland China: Molecular and clinical features in four families. *J Neurol Sci* 236:25-29.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-227.
- Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72:543-545.
- Kieling C, Rieder CR, Silva AC, et al (2008). A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol* 15:371-376.
- Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al (2011). Expansion of Intronic GGCCTG Hexanucleotide Repeat in NOP56 Causes SCA36, a Type of Spinocerebellar Ataxia Accompanied by Motor Neuron Involvement. *Am J Hum Genet* 89:121–130.
- Kraft S, Furtado S, Ranaway R, et al (2005). Adult onset spinocerebellar ataxia in a Canadian movement disorders clinic. *Can J Neurol Sci* 32:450-458.
- Lopes-Cendes I, Teive HGA, Calcagnotto MA, et al (1997). Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 55:519-529.
- Manto M, Marmolino D (2009). Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol* 22:419-429.
- Marelli C, Cazeneuve C, Brice A, et al (2011). Autosomal dominant cerebellar ataxias. *Rev Neurol* 167:385-400.

- Margolis RL, O'Hearn E, Holmes SE, et al. Spinocerebellar Ataxia Type 12. 2004 Oct 1 [Updated 2011 Nov 17]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1202/>
- Mariotti C, Brusco A, Di Bella D, et al (2008). Spinocerebellar ataxia type 28: A novel autosomal dominant cerebellar ataxia characterized by slow progression and ophthalmoparesis. *Cerebellum* 7:184–188.
- Martins S, Calafell F, Wong VC, et al (2006). A multistep mutation mechanism drives the evolution of the CAG repeat at MJD/SCA3 locus. *Eur J Hum Genet* 14:932-940.
- Martins S, Calafell F, Gaspar C, et al (2007). Asian origin for the worldwidespread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.* 64:1502-1508.
- Matsuura T, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 10. 2002 Apr 23 [Updated 2012 Sep 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1175/>
- Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, et al (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* 51: 1666–1671.
- Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972). Machado Disease: A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22: 49-55.
- Paulson HL (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27:133-142.
- Paulson H. Spinocerebellar Ataxia Type 3. 1998 Oct 10 [Updated 2011 Mar 17]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196/>

- Pozzi C, Valtorta M, Tedeschi G, et al (2008). Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 30:190-200.
- Prestes PR, Saraiva-Pereira ML, Silveira I, et al (2008). Machado-Joseph disease enhances genetic fitness: a comparison between affected and unaffected women and between MJD and the general population. *Ann Hum Genet* 72:57-64.
- Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 2. 1998 Oct 23 [Updated 2010 Oct 5]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1275/>
- Pulst SM. Spinocerebellar Ataxia Type 13. 2006 Nov 9 [Updated 2012 Mar 1]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1225/>
- Richards RI (2001). Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic diseases. *Hum Mol Genet* 10:2187-2194.
- Riess O, Rüb U, Pastore A, et al (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7:125–137.
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26:703-714.
- Rüb U, de Vos RA, Brunt ER, et al (2006). Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. *Brain Pathol* 16:218–227.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, et al (2002). Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51:302–310.

- Schmitt-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, et al (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of new clinical scale. *Neurology* 66:1717-1720.
- Schöls L, Amoiridis G, Buttner T, et al (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Neurology* 42:924-932.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3:291-304.
- Sequeiros J (1993). Machado-Joseph disease - Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. In: R Lechtenberg (ed): *Handbook of Cerebellar diseases*, Chap. 21. Marcel Decker Publ, New York, NY, pp. 345-351.
- Sequeiros J, Coutinho P (1993). Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease. In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds). *Hereditary Ataxias*. *Adv Neurol*, vol 61. New York: Raven Press, pp. 139-153.
- Soong BW, Paulson HL (2007). Spinocerebellar ataxias: na update. *Curr Opin Neurol* 20:438-446.
- Stevanin G, Broussolle E, Streichenberger N, et al (2005). Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25). *The Cerebellum* 4:58-61.
- Storey E. Spinocerebellar Ataxia Type 15. 2006 May 30 [Updated 2011 Apr 21]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1362/>
- Storey E. Spinocerebellar Ataxia Type 20. 2007 Feb 27 [Updated 2012 Jun 7]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1471/>

- Storey E, du Sart D, Shaw JH, et al (2000). Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am J Med Genet* 95:351-357.
- Storey E, Bahlo M, Fahey M, et al (2009). A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:408–411.
- Subramony SH, Ashizawa T. Spinocerebellar Ataxia Type 1. 1998 Oct 1 [Updated 2011 Oct 20]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1184/>
- Teive HA, Arruda WO, Trevisol-Bittencourt PC (1991). Machado-Joseph disease: description of 5 members of a family. *Arq Neuropsiquiatr* 49:172-179.
- Teive HA, Munhoz RP, Raskin S, Werneck LC (2008). Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 66: 691–694.
- Trott A, Jardim LB, Saraiva-Pereira ML, et al (2006), Spinocerebellar ataxia in 114 Brazilian families: clinical and molecular findings. *Clin Genet* 70:173-176.
- Trouillas P, Takayanagi T, Hallet M, et al (1997). International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *Journal of the Neurological Sciences* 145:205-211.
- Tsuji S. DRPLA. 1999 Aug 6 [Updated 2010 Jun 1]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1491/>
- Vale J, Bugalho P, Silveira I, et al (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 17:124-128.

- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58:702–708.
- van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, et al (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebral ataxia. *Am J Hum Genet* 72:191–199.
- Vuillaume I, Devos D, Schraen-Maschke S, et al (2002). A new locus for spinocerebellar ataxia (SCA21) maps to chromosome 7p21.3-p15.1. *Ann Neurol* 52:666–670.
- Wang JL, Yang X, Xia K, et al (2010). TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain* 133:3510–3518.
- Yamada S, Nishimiya J, Nakajima T, Taketazu F (2005). Linear high intensity area along the medial margin of the internal segment of the globus pallidus in Machado-Joseph disease patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:573–575.
- Yu GY, Howell MJ, Roller MJ, et al (2005). Spinocerebellar ataxia type 26 maps to chromosome 19p13.3 adjacent to SCA6. *Ann Neurol* 57:349–354.
- Zhao Y, Tan EK, Law HY, et al (2002). Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 62:478-481.