

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

**ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS INTRAGÊNICOS
AO GENE MJD1 EM PACIENTES
COM DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH**

TATIANA AZEVEDO BASTIAN BRESSEL

Orientadora: MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA

Co-orientadora: LAVÍNIA SCHÜLER-FACCINI

Janeiro de 2003

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Luiza S. Pereira, pela orientação, sabedoria e a oportunidade para a realização deste estudo junto ao grupo de trabalho sob sua orientação.

A Dra. Lavínia Schüler-Faccini, pela orientação e pelo incentivo demonstrado ao longo do meu mestrado.

A Dra. Laura B. Jardim, por todos os muitos ensinamentos e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jorge Sequeiros e sua equipe, pela acolhedora recepção e oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo.

A Dra. Mara Hutz, pelas sugestões dadas ao meu projeto, que possibilitaram a concretização deste estudo.

A doutoranda Carla Streit que, prestativamente, me ensinou algumas técnicas; ao companheirismo e amizade demonstrados ao longo do meu mestrado.

Aos demais colegas de laboratório por toda a amizade, incentivo e colaboração dispensada durante este tempo.

A doutoranda Silvana de Almeida que prestativamente me auxiliou com os programas de derivação de haplótipos e de análises estatísticas.

Aos meus amigos por todo o apoio e incentivo e pelos momentos de descontração que me proporcionaram.

A minha família pelos genes e ambiente, por toda a amizade, incentivo e apoio dispensados até hoje.

Ao meu irmão Mathias pela amizade e paciência e pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

Ao meu irmão Michael pela amizade e por todo o apoio nos momentos difíceis.

A minha mãe, pelo apoio, companheirismo, amizade e compreensão durante estes anos todos.

Ao meu querido marido, Rafael, que compartilha os meus sonhos e torna a minha vida mais alegre e feliz.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Histórico da doença de Machado-Joseph	1
1.2 - Aspectos clínicos e patológicos	3
1.3 - Aspectos genéticos da doença de Machado-Joseph	4
1.4 - Mutações dinâmicas	5
1.5 - As expansões CAG	6
1.6 - A proteína codificada pelo gene <i>MJD1</i>	7
1.7 - Os haplótipos e a etnia da DMJ	8
1.8 - História da colonização açoriana no sul do Brasil	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
4. RESULTADOS	13
4.1 - Artigo	14
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS	46
9. ANEXOS	47
9.1 - Extração de DNA genômico	47
9.2 - Amplificação das regiões de interesse por PCR	49
9.3 - Análise dos produtos amplificados em gel de agarose	51
9.4 - Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP)	52
9.5 - Sequenciamento direto	53
9.6 - Derivação dos haplótipos	54
9.7 - Análise estatística	55

RESUMO

A doença de Machado-Joseph (DMJ), ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3), é uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante, originalmente descrita em famílias de ancestralidade portuguesa-açoriana. Incordenação generalizada da marcha, dos membros e da fala podem estar presentes nos pacientes afetados por essa doença. O início das manifestações clínicas ocorre, em geral, entre os 30 e os 40 anos, apresentando uma progressão bastante lenta. O tempo médio de sobrevivência depois do início da doença é de 14 a 17 anos. O gene associado à doença, denominado *MJD1*, foi identificado em 1994 e localiza-se no cromossomo 14. Este gene se caracteriza por apresentar uma repetição nucleotídica CAG na região 5' do exon 2. O número destas repetições é polimórfico na população, sendo que indivíduos normais apresentam de 12 a 37 repetições CAG, enquanto os afetados pela DMJ podem apresentar de 61 a 84 repetições.

Um recente estudo mundial de haplótipos demonstrou a presença de dois diferentes haplótipos em famílias de origem açoriana, que são específicos à ilha de origem. Em famílias da porção continental de Portugal, os dois haplótipos foram encontrados. A maioria das famílias não portuguesas também compartilha o mesmo haplótipo encontrado em famílias originárias da ilha de Flores, mas três outros haplótipos foram encontrados nessas famílias. Até o momento, a hipótese mais forte declara que a difusão da mutação original está diretamente ligada à imigração portuguesa-açoriana.

No presente estudo, esta hipótese foi testada através da análise de desequilíbrio de ligação de três polimorfismos intragênicos (A⁶⁶⁹TG/C⁶⁶⁹TG, C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG, TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸). O polimorfismo na posição 669 foi identificado por PCR seguido de SSCP e confirmado por sequenciamento direto. Os polimorfismos nas posições 987 e 1118 foram detectados por PCR alelo-específico.

Os resultados obtidos indicaram que o haplótipo intragênico A-C-A estava associado ao alelo com a expansão na maioria dos pacientes (92%). Estes resultados confirmam achados em outros estudos. Isto indica que uma única mutação na DMJ foi introduzida em várias populações, seguida de um efeito fundador local, e indicando também que provavelmente esta mutação é muito antiga. E, para finalizar, baseado neste estudo e comparando com dados gerados no estudo mundial de haplótipos, pode-se especular que a origem da mutação associada a DMJ nos pacientes do sul do Brasil é proveniente da ilha de Flores.

ABSTRACT

Machado-Joseph disease (MJD), or spinocerebellar ataxia type 3 (SCA-3), is an autosomal dominant neurodegenerative disorder originally described in families of Portuguese-Azorean ancestries. Generalized incoordination of gait, speech and limb movements can be present in affected MJD patients. The disease onset occurs in general between 30 and 40 years of age, and symptoms progress slowly. Survival after onset is between 14 to 17 years. The disease-associated gene, named MJD1, was identified in 1994 and is located on chromosome 14. This gene is characterized by a CAG nucleotide repeat in the 5' end of exon 2. Number of repeats is polymorphic in the population; normal alleles vary from 12 to 37 CAG repeats, while expanded alleles vary between 61 to 84 repeats.

A recent worldwide haplotype study demonstrated two different haplotypes in families of Azorean background which are specific to the island of origin. In families from the mainland of Portugal, both Azorean haplotypes can be found. The majority of the non-Portuguese families also share the same intragenic haplotype carried by families coming from Flores Island, but at least three others haplotypes can be determined. So far, the strongest hypothesis states that the spread of an original founder mutation is directly linked to the Portuguese-Azorean immigration.

In the present study, we tested this hypothesis by linkage-disequilibrium analysis of three intragenic single-base-pair polymorphisms (A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG, C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG, TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸). Detection of the 669 polymorphism was carried out by PCR, followed by SSCP analysis and the confirmation of sequence variation was obtained by direct sequencing analysis. Detection of both 987 polymorphism and 1118 polymorphism was performed by allele-specific PCR.

The results obtained indicated that the A-C-A intragenic haplotype was associated to the disease allele in the majority of patients (92%). These results are in agreement to previous studies. This indicates that a single MJD mutation was introduced in various populations, followed by a local founder effect; and this mutational event is probably very old. Based on findings presented here and comparing to data generated by the worldwide haplotype study, we can speculate that the origin of MJD associated-mutation in patients from South Brazil comes from Flores Island.

1. INTRODUÇÃO

As ataxias espinocerebelares (SCAs) autossômicas dominantes constituem um grupo de doenças neurodegenerativas muito debilitantes, com grande heterogeneidade clínica, caracterizadas por uma incordenação generalizada da marcha, dos membros e da fala (Harding, 1993; Rosenberg, 1995). Nas gerações sucessivas, observa-se que a doença se inicia mais precocemente e que a sua progressão torna-se mais rápida, fenômeno conhecido como “antecipação” (Rosenberg, 1995).

A doença de Machado-Joseph (DMJ) é uma das mais freqüentes ataxias espinocerebelares (SCAs). Ela foi descrita inicialmente em famílias norte-americanas com ascendência açoriana (Nakano *et al*, 1972; Woods e Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al*, 1976). Além de ser a SCA mais freqüentemente diagnosticada entre descendentes de portugueses, a DMJ também já foi descrita no Japão, China, Índia, Austrália, França e Alemanha, sendo considerada a mais comum das SCAs (Sequeiros e Coutinho, 1993). O início das manifestações clínicas ocorre, em geral, entre os 38 e os 40 anos, entre pacientes portugueses ou de ascendência portuguesa, mas ela tende a ser mais precoce, em torno dos 24 anos, entre indianos, japoneses e afro-americanos (Barbeau *et al*, 1984; Sequeiros e Coutinho, 1993; Coutinho, 1994). Estudos realizados na população brasileira também indicaram uma idade de início mais precoce (Lopes-Cendes *et al*, 1997; Jardim *et al*, 2001b). O tempo médio de sobrevivência depois do início da doença é de 14 a 17 anos (Sequeiros, 1993).

1.1 - Histórico da doença de Machado-Joseph

Nos anos 70, três famílias foram descritas e todas elas apresentavam substancial variabilidade clínica (Nakano *et al*, 1972; Woods e Schaumburg, 1972; Rosenberg *et al*, 1976).

A família descrita por Nakano era descendente de William Machado, um habitante da ilha de São Miguel, nos Açores. Este paciente apresentava uma ataxia progressiva, nistagmo, hiporreflexia, variados graus de amiotrofia e sinais de lesão no cordão posterior da medula. O autor denominou o distúrbio de doença de Machado. A maioria dos descendentes dessa linhagem ainda morava na ilha de São Miguel na época da descrição desta família (Nakano *et al*, 1972).

Também em 1972, Woods e Schaumburg descreveram doentes provenientes dessa mesma ilha, vivendo em Massachusetts, identificando-os como a “família Thomas” (Woods e Schaumburg, 1972).

Uma terceira família açoriana, denominada Joseph, foi descrita por Rosenberg nos Estados Unidos em 1976. Nesta família, em sete gerações, havia a ocorrência de ataxia progressiva, disartria, nistagmo, bradicinesia, fasciculações de língua e de face, posturas distônicas, hiperreflexia e sinal de Babinski positivo. Esses doentes viviam na Califórnia e eram descendentes de um ancestral açoriano que emigrou da ilha de Flores para a costa oeste americana em 1844. Desde então, tentou-se reunir todas estas doenças descritas isoladamente sob o termo “doença dos Açores” ou “doença de Machado-Joseph” (DMJ) (Coutinho e Andrade, 1978).

A partir de 1976, mais e mais doentes afetados pela DMJ foram descritos entre açorianos, portugueses, brasileiros e americanos de origem açoriana (Coutinho e Andrade, 1978; Lima e Coutinho, 1980; Barbeau *et al*, 1984). Embora até 1994 a ausência de um marcador biológico tornasse difícil o seu diagnóstico, alguns autores o fizeram com base apenas nas manifestações clínicas, em doentes de outras origens étnicas como japoneses (Sakai *et al*, 1983), indianos (Bharucha *et al*, 1986), aborígenes australianos (Burt *et al*, 1993) e judeus iemenitas (Goldberg-Stern *et al*, 1994).

Os primeiros relatos sobre famílias brasileiras com o diagnóstico clínico de DMJ foram apresentados na década de oitenta e no início dos anos noventa (Teive *et al*, 1991). Depois deles, dois estudos de casos, baseados em achados moleculares, apresentaram estimativas sobre as frequências relativas de algumas SCAs, incluindo a DMJ, em famílias afetadas, provenientes de diversas regiões brasileiras (Lopes-Cendes *et al*, 1997a; Lopes-Cendes *et al*, 1997b; Iughetti *et al*, 1998). Nesses estudos, a mutação no gene *MJD1* foi encontrada em 44% e 68% dos doentes com história familiar positiva, respectivamente.

Algumas famílias foram identificadas no Rio Grande do Sul, com base apenas em suas manifestações clínicas desde 1989 e com base em seu diagnóstico molecular desde 1997 (Jardim, comunicação pessoal). O seu reconhecimento motivou a realização de diversos estudos de séries de casos e de casos-controle, no nosso meio (Jardim *et al*, 2001a, Jardim *et al*, 2001b, Jardim *et al*, 2001c, Jardim *et al*, 2002; Zandoná *et al*, 2002). Estes estudos permitiram determinar que a DMJ é responsável por 84% dos casos de SCAs no nosso estado e que essa condição apresenta uma prevalência estimada em 1:50.000 no nosso meio.

1.2 - Aspectos clínicos e patológicos

A expressão “ataxia espinocerebelar” designa as doenças genéticas do cerebelo e de suas conexões. Existem diversas ataxias geneticamente determinadas, sendo algumas dominantes e outras recessivas.

A ataxia geralmente apresenta-se através de um tremor de ação e de movimentos dismétricos e decompostos em seus subgrupos articulares. Frequentemente ocorre dificuldade de um movimento ser sucedido por seu antagonista (disdiadococinesia). Quando a ataxia envolve a musculatura fonatória, a consequência é um defeito na articulação da palavra (fala disártrica). Quando a ataxia envolve a musculatura axial do corpo, o resultado é um desequilíbrio tanto durante a postura estática quanto durante a marcha. O indivíduo afetado oscila e tende a cair e, para evitá-lo, afasta seus pés, aumentando o assim chamado polígono de sustentação (Jardim, 2000).

Desde as primeiras descrições, a DMJ foi considerada uma doença bastante pleiomórfica. Parte disso se explica pela variação na idade de início e por três tipos de evolução relacionados a ela. Quanto mais precoce, mais graves e menos periféricos são os sintomas, e vice-versa.

Entre os pacientes portugueses e os pacientes açorianos primeiramente descritos, a idade média de início da doença foi determinada entre 39 e 40 anos, sendo observada uma faixa de variação do início da doença entre 12 a 73 anos (Sequeiros e Coutinho, 1993). Entretanto, entre os pacientes brasileiros, a idade média de início da doença é mais precoce, ficando entre os 32 e os 34 anos (Lopes-Cendes *et al*, 1997; Jardim *et al*, 2001b). Um dos fatores determinantes da idade de início é o tamanho da expansão CAG, sendo mais precoce o início da doença quanto maior for o tamanho da expansão. Outro fator é a origem étnica e geográfica dessa condição. É bem conhecida a diferença entre os açorianos provenientes da ilha de Flores e os provenientes da ilha de São Miguel (Sequeiros e Coutinho, 1993). Os pacientes provenientes da ilha de Flores tem uma idade média de início 8 anos mais precoce do que os pacientes provenientes da ilha de São Miguel. Como essa foi exatamente a diferença encontrada entre a idade de início da doença na população portuguesa e açoriana (40 anos) e a na população gaúcha (32 anos), uma das hipóteses para explicar essa diferença seria a da origem de nossa população ser, preferencialmente, dos açorianos provenientes da ilha de Flores. Infelizmente, os registros históricos não puderam confirmar essa hipótese e mesmo a contradisseram (Jardim *et al*, 2001b). Entre os documentos históricos, diz-se que a maioria dos açorianos que imigraram para o sul do Brasil era proveniente das ilhas centrais do

arquipélago, 4% eram provenientes da ilha de São Miguel e que nenhum era proveniente da ilha de Flores (Piazza, 1992).

A observação de três cursos clínicos diversos substanciou a seguinte classificação clínica (Coutinho e Andrade, 1978):

- Tipo 1 – de início precoce (em torno da terceira década de vida) e curso mais rápido, sendo também o tipo menos comum. Caracteriza-se por sinais piramidais e extrapiramidais intensos, além dos achados cerebelares e oftalmoplégicos.
- Tipo 2 – forma intermediária, sendo que o início da doença ocorre ao redor dos 40 anos e se caracteriza pela presença de incoordenação, com ou sem achados piramidais e oftalmoplegia progressiva. Os achados periféricos e extrapiramidais são leves ou ausentes.
- Tipo 3 – de início mais tardio (no final da quinta década de vida). Os pacientes de tipo 3 apresentam, além da ataxia e da oftalmoplegia, sinais periféricos importantes e poucos achados piramidais ou extrapiramidais.

A partir de achados neuro-patológicos encontrados entre os poucos estudos *post mortem* realizados em pacientes com DMJ, pode-se dizer que a doença envolve vias cerebelares aferentes, vias cerebelares eferentes, estruturas extrapiramidais como a substância nigra, o *locus coeruleus* e o complexo *pallidolusiano*, neurônios motores inferiores e nervos periféricos (Sequeiros e Coutinho, 1993; Barbeau *et al*, 1984). Pode-se dizer também que a doença poupa o córtex cerebral, o *striatum* e os tratos corticoespinais. Até pouco tempo se pensava que o córtex cerebelar e as olivas inferiores estavam sempre livres de envolvimento na DMJ. Porém, ambas encontravam-se atróficas em dois pacientes nos estudos anátomo-patológicos (Lopes-Cendes *et al*, 1996).

1.3 – Aspectos genéticos da doença de Machado-Joseph

A DMJ é transmitida de modo autossômico dominante. A penetrância é muito elevada, mas é incompleta, sendo estimada em 98% (Sequeiros, 1993). Assim, a distinção entre penetrância incompleta e expressividade variável depende da sobrevivência dos heterozigotos, pois existiram registros de casos em que a doença se iniciou aos 73 anos (Sequeiros, 1986).

Nas doenças autossômicas dominantes, se estima em 50% o risco de transmissão à prole. Entretanto, a observação clínica sugere que os gametas que trazem a mutação são favorecidos de alguma maneira, possivelmente aumentando este risco (Ikeuchi *et al*, 1996;

Iughetti *et al*, 1998). Não há como se explicar que ao redor de 68% dos irmãos de um caso índice também sejam afetados, e não os esperados 50%, a não ser através da transmissão preferencial do gameta mutante (Ikeuchi *et al*, 1996; Iughetti *et al*, 1998; Jardim *et al*, 2001b).

Não existem diferenças importantes entre os sexos nessa doença, como esperado em doenças autossômicas. Homens e mulheres tendem a serem afetados nas mesmas proporções, com a mesma gravidade e com distribuições de idade muito semelhantes (Dürr *et al*, 1995; DeStefano *et al*, 1995).

Em 1993, o *locus* da doença foi mapeado no cromossomo 14q32.1 em famílias japonesas (Takiyama *et al*, 1993). Para identificar o gene candidato, foi utilizada uma sonda de oligonucleotídeos contendo treze repetições CAGs em uma biblioteca de cDNA de cérebro humano (Kawaguchi *et al*, 1994). Em 1994, o gene foi então identificado e denominado *MJD1*, sendo observado que este gene continha uma repetição nucleotídica CAG na região 5' do exon 2, região esta que estava expandida em pacientes com DMJ (Kawaguchi *et al*, 1994). O mapeamento do gene também foi confirmado em famílias de portugueses, norte-americanos e brasileiros (Sequeiros *et al*, 1994; Twist *et al*, 1995).

1.4 – Mutações dinâmicas

O tipo de mutação associada a DMJ, expansão de uma repetição trinucleotídica, faz parte de um grupo de mutações descoberto nos últimos 10 anos, tendo sido identificada inicialmente na doença de Huntington (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Esse tipo de mutação foi denominado mutação dinâmica pelo fato de ser instável durante as divisões celulares, sejam elas mitóticas ou meióticas. A instabilidade meiótica foi observada em inúmeras transmissões de genitor-para-filho e isto explica, em parte, tanto a antecipação quanto a expressividade variável (Harper *et al*, 1997).

Atualmente, várias doenças humanas são conhecidas associadas a uma expansão em grande escala de repetições de trinucleotídeos instáveis. Estas expansões nunca são, na prática, transmitidas sem modificações do genitor para a criança. As expansões e as contrações podem ocorrer, mas existe uma tendência em direção à expansão (Strachan e Read, 1999). Na DMJ, pode-se observar, o fenômeno de expansão do número de repetições CAG na transmissão genitor-filho.

Uma outra característica destas doenças causadas por expansões é a antecipação, isto é, o início é mais precoce e/ou a gravidade é maior em gerações sucessivas (Strachan e Read, 1999).

1.5 – As expansões CAG

Em todas as doenças neurodegenerativas com expansões CAG, conhecidas até o momento, o tamanho dos alelos normais é constituído por repetições que não ultrapassam a faixa dos 35 a 40 repetições trinucleotídicas. Portanto, acredita-se que acima de um determinado número de trinucleotídeos pode ocorrer uma alteração na estrutura secundária da molécula de DNA, gerando uma estrutura de grampo (*hairpin*). Desta forma, durante a replicação do DNA, a cadeia recém-sintetizada por causar o mecanismo de deslize (*slippage*), gerando fragmentos com uma adição de outras unidades de repetições, em uma escala maior e, portanto, uma expansão (Gacy *et al*, 1995; Wells, 1996; Leeflang *et al*, 1999).

Ultrapassando o limiar e uma vez ocorrida uma expansão, observa-se uma instabilidade mitótica, com variações no tamanho das expansões nos diferentes tecidos de um mesmo indivíduo (Reddy e Mousman, 1997).

Nas transmissões maternas de alelos na faixa entre 40 e 100 repetições observam-se nos filhos uma distribuição cujo tamanho do alelo transmitido situa-se em uma faixa similar à média materna. Por outro lado, nas transmissões paternas essa distribuição se mostra com valores superiores aos observados no pai (Bruner *et al*, 1993; Trottier *et al*, 1994). Em análises de amostra de esperma, foi observado um aumento significativo do tamanho das expansões de trinucleotídeos, quando comparado às de seus pais (Leeflang *et al*, 1999; Takiyama *et al*, 1999). Além disso, estes autores observaram a ocorrência de expansões maiores quanto maior a idade paterna, possivelmente, por uma tendência dos alelos se expandirem durante o processo de replicação do DNA, nas células germinativas primárias paternas ou por uma falha na seleção das células germinativas ou do esperma maduro, que pudessem evitar a ocorrência de grandes expansões.

O fato das doenças com expansões CAG apresentarem como único fator comum uma cadeia de poliglutaminas, apresentando outras características bem diferentes, como características clínico-patológicas, relação do tamanho da cadeia poliglutamínica e idade de início ou gravidade dos sintomas, motivou estudos em camundongos transgênicos para analisar a instabilidade destes trinucleotídeos. Os resultados obtidos demonstraram que uma

cadeia contendo 79 glutaminas acarretava má função neuronal e morte, mas nada causava quando inserida no produto gênico da DMJ. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que o importante para a estabilidade era o contexto ou o significado da seqüência de trinucleotídeos instável e a sua atividade transcricional (Ikaeda *et al*, 1996; Mangiarini *et al*, 1997).

O número de repetições do trinucleotídeo CAG é polimórfico na população geral, mas, acima de um certo número de expansões, o processo de neurodegeneração pode ser observado. Indivíduos normais apresentam de 12 a 44 repetições CAG, enquanto os afetados pela DMJ podem apresentar de 61 a 87 repetições (Maciel *et al*, 2001). Em centenas de casos já estudados, nunca foi demonstrada a existência de pré-mutações ou segmentos (CAG)_n de tamanho intermediário entre a faixa normal e a patogênica. A penetrância é alta, mas incompleta, pois existem raros portadores da mutação ainda assintomáticos aos 90 anos (Sequeiros, 1989).

Como citado anteriormente, existe uma correlação negativa entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início da doença. Entretanto, essa variação das idades de início entre diferentes amostras estudadas explica apenas 47% dos casos (Maciel *et al*, 1995; Maruyama *et al*, 1995). Portanto, essa associação parcial, indica a existência de outros fatores modificadores, pois essa associação não conseguiu explicar toda a variação fenotípica da DMJ.

1.6 – A proteína codificada pelo gene *MJD1*

O gene *MJD1* codifica uma proteína intracelular de função desconhecida denominada ataxina-3. Esta proteína localiza-se no citoplasma, expressando-se de forma generalizada, isto é, em todo o cérebro (Paulson *et al*, 1997). Estudos recentes correlacionando os agregados intranucleares observados na DMJ com apoptose celular motivaram análises *in vitro*. Estes ensaios demonstraram, em linhagens celulares dopaminérgicas de mesencéfalo de camundongos, que as células expressando a proteína ataxina-3 desenvolviam corpúsculos de inclusões nucleares e apresentavam morte celular espontânea não apoptótica, indicando a inexistência de uma correlação entre a formação de inclusões intranucleares e a morte por apoptose celular (Evert *et al*, 1999).

1.7 – Os haplótipos e a etnia da DMJ

Um haplótipo pode ser definido como conjunto de alelos situados no mesmo segmento cromossômico, os quais tendem a ser transmitido em bloco na genealogia (Strachan e Read, 1999). Portanto, os haplótipos marcam segmentos cromossômicos reconhecíveis, que podem ser seguidos através de genealogias e de populações, enquanto não desfeitos por recombinação.

A análise de haplótipos em pacientes com DMJ pode ajudar na identificação da origem da mutação. Conforme mencionado anteriormente, a maioria dos pacientes com DMJ é de origem açoriana e sua história acompanha a história da colonização daquelas ilhas. Os primeiros habitantes dos Açores chegaram depois da descoberta destas ilhas pelos portugueses em 1432. Os colonizadores do arquipélago originaram-se principalmente do norte de Portugal, das regiões conhecidas como Trás-os-Montes e Beiras. Muito possivelmente, a mutação no gene *MJDI* entrou nos Açores a partir dessa onda migratória, e tornou-se muito mais freqüente no arquipélago por um efeito fundador (Sequeiros, 1993).

Duas linhas de evidência tornaram esse suposto efeito fundador um pouco mais complexo. A primeira linha refere-se às diferenças na idade de início da doença, de acordo com a ilha de origem. Os indivíduos afetados originários da ilha de São Miguel, assim como seus descendentes recentes (da costa leste norte-americana, por exemplo) têm uma idade média de início da doença que é oito anos mais tardia do que a dos doentes originários da ilha de Flores, o que sugere a introdução de um modificador em uma das subpopulações (Sequeiros e Coutinho, 1993; Sequeiros, 1993).

A segunda linha de evidência decore da demonstração que os pacientes descendentes de açorianos apresentam pelo menos três haplótipos intragênicos diferentes e, portanto, três origens distintas (Stevanin *et al*, 1997).

Os estudos sobre a origem molecular dos genes que contêm a expansão CAG demonstram evidências contrárias à hipótese da origem açoriana única e a favor de 4 ou 5 origens biológicas independentes. Esses estudos se baseiam na análise dos haplótipos adjacentes e internos ao *locus MJDI*.

Os primeiros estudos identificaram haplótipos de quatro marcadores microssatélites, cobrindo uma região de 3 cM. Estes marcadores se localizam muito próximos ao *locus MJDI*. Os resultados destes estudos apontam para a existência de 5 ou 6 origens ancestrais da mutação em pacientes com DMJ (Takiyama *et al*, 1995; Stevanin *et al*, 1995; Gaspar *et al*, 1996).

A análise dos haplótipos internos ao *locus* MJD1 revelou também a existência de vários alelos. Dentro da região codificadora do gene, são utilizados 3 sítios polimórficos. São eles (1) uma transversão do nucleotídeo adenina por guanina na posição 669 (669A→G) do cDNA, (2) uma transição do nucleotídeo citosina por guanina na posição 987 (987C→G) e (3) uma transversão do nucleotídeo adenina por uma citosina na posição 1118 (1118A→C), a qual altera o codon de terminação do gene, resultando na adição de um resíduo de 16 aminoácidos no domínio carboxi-terminal do produto gênico (Maciel *et al.*, 1999; Gaspar *et al.*, 2001). Esses três polimorfismos geram oito possíveis haplótipos. Até o momento, foram identificados outros três sítios polimórficos. São eles (1) uma transverção do nucleotídeo citosina por uma adenina na posição 1178, (2) uma transição do nucleotídeo adenina por uma guanina na posição 1294 e (3) uma transição do nucleotídeo timina por uma citosina na posição 527. Estes três últimos polimorfismos, entretanto, ainda não foram relacionados com possíveis haplótipos (Costa *et al.*, 2002).

Em um recente estudo, sugeriu-se a ocorrência de dois eventos mutacionais na população portuguesa, os quais originaram dois haplótipos distintos nas ilhas de São Miguel e de Flores (Gaspar *et al.*, 2001). Neste estudo, o haplótipo intragênico A-C-A estava associado com a DMJ em famílias originárias da ilha de Flores; enquanto o haplótipo intragênico G-G-C foi observado em famílias originárias de São Miguel. Estes autores especularam também que a mutação encontrada em Flores foi introduzida da França, já que algumas famílias originárias tanto da França como da ilha de Flores, compartilham o mesmo haplótipo no alelo expandido.

1.8 – História da colonização açoriana no sul do Brasil

Durante o século XVIII, o arquipélago de Açores vinha sofrendo muito com a fome e os terremotos (Coutinho, 1994). Neste mesmo período, ocorreu o Tratado de Madri (1750). Este tratado se baseou no princípio do *uti possidetis*: a terra pertence a quem a ocupa, o que garantiu a extensão territorial brasileira. Neste tratado ficou determinado que as ilhas Filipinas e a Colônia de Sacramento seriam cedidas pelos portugueses aos espanhóis, e o vale do rio Amazonas e os Sete Povos das Missões seriam cedidos pelos espanhóis aos portugueses. Portugal queria assegurar o domínio português nos territórios do sul do Brasil ao mesmo tempo em que existia uma super população nas ilhas açorianas (além da fome e dos terremotos). A Coroa portuguesa ofereceu então uma série de vantagens aos açorianos que

quisessem emigrar para o Brasil, desde viagem gratuita, lote de terra, até os instrumentos utilizados para cultivar a terra. Isto provocou uma forte corrente migratória açoriana (Coutinho, 1994; http://www.multirio.rj.gov.br/historia/modulo01/tratado_madri.html; <http://www.terravista.pt/fernoronha/5667/colonia5.htm>).

A imigração subvencionada de casais açorianos iniciou em 1748. Estima-se que entre 1748 e 1756, entraram no Rio Grande aproximadamente 2.300 açorianos, o que representava dois terços da população gaúcha da época. A idéia inicial era utilizá-los para ocupar a região das Missões, que pelo Tratado de Madri passaria para Portugal. No entanto, o tratado foi anulado, Portugal não entregou Sacramento e nem recebeu as Missões, e os açorianos ficaram instalados nas margens do rio Jacuí (<http://www.terravista.pt/fernoronha/5667/colonia5.htm>; http://www.multirio.rj.gov.br/historia/modulo01/tratado_madri.html).

Com a invasão espanhola (em que foi ocupada a cidade de Rio Grande, em 1763), os comandantes militares portugueses fundaram diversas praças militares ao longo do rio Jacuí, para garantir o acesso fluvial a Rio Pardo, que se tornou, após a invasão, o posto mais avançado do domínio português. Além dos açorianos, que já se encontravam na região, foram concentrados na área os “retirantes” vindos de regiões mais ao sul, como Rio Grande (<http://www.riogrande.com.br/historia/colonizacao3.htm>).

Além da imigração no Rio Grande do Sul, Santa Catarina recebeu 7.817 imigrantes açorianos entre 1748 e 1753. Somente nestes cinco anos, os casais que ali se estabeleceram duplicaram a escassa população da então capitania de Santa Catarina. Este forte contingente ilhéu saiu de diversas freguesias dos Açores; entretanto, os registros históricos são escassos, não indicando exatamente de que ilhas vieram estes açorianos.

2. JUSTIFICATIVA

No sul do Brasil é conhecida uma forte influência de migração açoriana ocorrida principalmente durante o século XVIII. Entretanto, as origens específicas destas famílias que vieram para cá, dentro do arquipélago de Açores, não são bem definidas, havendo escassos registros históricos. Em virtude disto, não é espantoso que um grande número de pacientes com DMJ venham sendo diagnosticados em centros especializados. No trabalho de Jardim e colaboradores de 2001, foram estudados 62 doentes de 35 famílias provenientes do Sul do Brasil (Jardim *et al*, 2001b). Esse número aumentou para 68 famílias em 2002 (Zandoná *et al*, 2002) e tende a crescer.

Nas investigações conduzidas por estes autores, evidenciou-se também que a média de idade de início da doença é menor na amostra brasileira quando comparada à portuguesa (Lopes-Cendes, *et al*, 1997b; Iughetti *et al*, 1998; Jardim *et al*, 2001b).

Como citado acima, não há dados historiográficos muito completos sobre a migração açoriana para o Sul do Brasil. Embora esses registros existam e sejam até surpreendentemente extensos, eles deixaram de ser bem guardados a partir de 1755 (Piazza, 1992). Por outro lado, os registros atuais dos dados clínicos de pacientes com DMJ demonstram uma idade de início média de 32 anos nos pacientes do nosso meio (Rio Grande do Sul). Essa manifestação clínica mais precoce poderia ser explicada pela origem geográfica dos imigrantes açorianos, sendo compatível com imigração proveniente da ilha de Flores. Entretanto, não há menção historiográfica que comprove essa hipótese.

Portanto, um estudo de haplótipos intragênicos entre os doentes gaúchos poderia esclarecer ou fornecer dados biológicos quanto à origem da imigração açoriana.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- a) analisar os pacientes portadores da expansão CAG no gene *MJD1* para os seguintes sítios polimórficos: $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$, $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ e $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$;
- b) determinar os haplótipos presentes nos pacientes analisados;
- c) traçar as possíveis origens dos pacientes com DMJ da região sul do Brasil comparando os dados obtidos neste estudo com os dados da literatura internacional;
- d) estabelecer uma correlação entre os haplótipos identificados e a idade de início da doença bem com a gravidade dos sintomas, dados estes já determinados em estudos prévios.

4. RESULTADOS

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

Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease

In Patients from South Brazil:

Detection of three Intragenic Polymorphisms

In Mutant Alleles of the *MJD1* Gene

Tatiana Azevedo Bastian Bressel^{1, 2}, Tiago Santos Carvalho^{2,3}, Laura Bannach Jardim^{2,4},
Lavínia Schüler-Faccini^{1,2}, Maria Luiza Saraiva Pereira^{2,3}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil;

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil;

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

Keywords: MJD, SCA-3, polymorphism, and haplotype

Running title: Origins of MJD in South 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

Summary

Machado-Joseph disease (MJD, or SCA-3) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder originally described in families of Portuguese-Azorean ancestries. A recent worldwide haplotype study demonstrated two different haplotypes in families of Azorean background which are specific to the island of origin. In families from the mainland of Portugal, both Azorean haplotypes can be found. The majority of the non-Portuguese families also share the same intragenic haplotype carried by families coming from Flores Island, but at least three other haplotypes can be determined. So far, the strongest hypothesis states that the spread of an original founder mutation is directly linked to the Portuguese-Azorean immigration. In the present study, we tested this hypothesis by linkage-disequilibrium analysis of three intragenic single-base-pair polymorphisms (A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG, C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG, TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸). Our results indicated that the A-C-A intragenic haplotype was associated to the disease allele in the majority of patients (92%). These results are in agreement to others studies. This indicates that a single MJD mutation was introduced in various populations, followed by a local founder effect; and this mutational event is probably very old. Based in our findings and comparing to data generated by the worldwide haplotype study, we can speculate the origin of MJD associated-mutation. The origin of MJD in patients of South Brazil is from Flores Island.

Introduction

Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder of late onset, characterized by cerebellar ataxia, progressive external ophthalmoplegia and pyramidal signs (Coutinho & Andrade, 1978). The MJD clinical features include cerebellar ataxia, spasticity dystonia, ophtalmoplegia, sensory loss, muscle atrophy and faciolingual fasciculation. These clinical features present a variable degree of severity in members of the same family and at different times during illness. The associated mutation is an expansion of a CAG tract in the MJD1 gene, which is located on 14q32.1 (Kawaguchi *et al.*, 1994). Normal alleles show 12–44 repeats and mutant alleles show 61–87 repeats (Maciel *et al.*, 2001).

The first description of MJD came from families of Islands of Azores (Nakano *et al.*, 1972; Woods & Schaumburg 1972; Rosenberg *et al.*, 1976), but the disease was later identified in families from many other ethnic origins (Sequeiros & Coutinho, 1993), being now recognized as the most common among the dominant spinocerebellar ataxias (Ranum *et al.*, 1995; Schöls *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1998). MJD is the main spinocerebellar ataxia (SCA) found in our region, corresponding to 92% of our families with autosomal dominant inheritance, and to an estimated prevalence of 1.8:100,000 inhabitants (Jardim *et al.*, 2001a).

The ancestral origin of the MJD mutation and the presence of a founder effect that determine a worldwide distribution of the disease has been the source of much speculation over the years (Sequeiros, 1989; Sequeiros & Coutinho, 1993; Stevanin *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995; Gaspar *et al.*, 1996; Stevanin *et al.*, 1997; Gaspar *et al.*, 2001). In Azores, the disease is mainly found in two islands, São Miguel and Flores. A founder effect was thought to account for the high frequency of MJD in the Azores archipelago; the mutation would have arisen in the mainland of Portugal and later would have been introduced into the isolated Azorean archipelago during its colonization (Sequeiros & Coutinho, 1993). The

Portuguese sea explorations of the late-15th and 16th centuries could explain the presence of MJD in countries such as India, China, Japan, and others (Gaspar *et al.*, 2001).

Recently, based on historical, epidemiological and molecular studies, the hypothesis of the present world distribution of MJD is a result of the spread of the original founder mutation was discussed (Sequeiros, 1989; Sequeiros & Coutinho, 1993, Stevanin *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995). This possibility can be tested by linkage-disequilibrium analysis of closely linked markers and shared haplotypes.

Three intragenic single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were previously described in the *MJD1* gene: A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG, C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG, and TA¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ (Goto *et al.*, 1997). These intragenic SNPs were used in a worldwide haplotype study to elucidate the ancestral origins of the MJD mutation. This study demonstrated that the haplotype A-C-A is shared by the majority of the studied families, suggesting a major founder mutation in MJD (Lima & Coutinho, 1980; Gaspar *et al.*, 2001). The existence of two different haplotypes in Azores background, G-G-C in families from São Miguel Island and A-C-A in families from Flores Island, was confirmed by Gaspar and coworkers (Gaspar *et al.*, 2001).

So far, the strongest hypothesis states that the spread of an original founder mutation is directly linked to the Portuguese-Azorean immigration.

The aims of the present study were to detect three intragenic single-base-pair polymorphisms, in order to determine the haplotypes carried by our patients, and to draft the possible origins of patients with MJD in South Brazil.

Subjects and Methods

A total of 50 MJD patients confirmed by molecular analysis from 35 families were studied. The study included a clinical and neurological evaluation, which were described elsewhere (Jardim *et al*, 2001c), as well as blood collections. Patients were interviewed and examined by the same physician (LBJ). Blood samples were obtained from individuals after signing an informed consent form. Genomic DNA was extracted from lymphocytes following standard procedures (Miller *et al*, 1988).

The intragenic polymorphism $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$, located at the 3' end of CAG repeat, was detected by allele-specific PCR using primers ASP1 or ASP2 (Gaspar *et al*, 2001), in combination with MJD52 (Kawaguchi *et al*, 1994). The stop codon polymorphism TAA^{1118}/TAC^{1118} was detected by allele-specific PCR using primers ASP3 or ASP4 (Gaspar *et al*, 2001), together with MJD52. In both cases, PCR reaction was performed using same conditions applied for amplification of the CAG repeat (Kawaguchi *et al*, 1994), except for the annealing step, which was performed at 55°C or 65°C for 30s (Gaspar *et al*, 2001). DNA fragments were visualized by agarose gel electrophoresis. Allele sizes were estimated comparing to a DNA sequencing ladder.

The $\underline{A}^{669}TG/\underline{G}^{669}TG$ polymorphism was detected by a combined approach of PCR followed by SSCP analysis. PCR amplification was performed using primers MJD1VSR and MJD734R and amplification conditions were followed according to previously described procedure (Gaspar *et al*, 2001). Amplified DNA fragments were submitted to electrophoresis using a 12.5% (w/v) polyacrylamide gel with 5% (w/v) glycerol during 14 hours. The gel were stained with silver nitrate solution (0.012M) and dried. Migration patterns were compared to patterns of previously defined samples. Confirmation of sequence variants was

obtained by direct sequencing analysis using Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech), according to manufacturer instructions.

Evidence of linkage disequilibrium of intragenic polymorphism were established using $\delta = (F_d - F_c) / (1 - F_c)$, where F_d is the frequency of carrier, and F_c is the frequency of no carrier chromosomes. A measure of allele-specific association δ is an approximation of the population-attributable risk and has desirable properties in a case/control study (Delvin & Risch, 1995).

Phase of haplotype was identified by molecular analysis and confirmed by Multiple Locus Haplotype Analysis ver. 2.0 (Long *et al.*, 1995; Long, 1999; Peterson *et al.*, 1999). The maximum likelihood estimates of haplotype frequencies were calculated from multisite marker data using the Multiple Locus Haplotype Analysis ver. 2.0. Test for linkage disequilibrium were performed in Arlequin ver 2.000 programs (Schneider *et al.*, 2000).

Results

Figure 1 and figure 2 show the results of intragenic polymorphism analyzed. Based on these results, the genotype frequencies were calculated for each polymorphic site, and are summarized in figure 3. The majority (80%) of patients were A/G for the $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ polymorphism. In the $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ polymorphism, 72% of the patients were C/G and, in the $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ polymorphism 80% were A/C.

Based in these frequencies, the linkage disequilibrium for each polymorphic site were calculated, using $\delta = (F_d - F_c)/(1 - F_c)$. These results can be observed in table 1.

The maximum-likelihood haplotype frequencies, calculated from multisite marker data using the Multiple Locus Haplotype Analysis ver. 2.0, were as follows: genotype ACA/GGC 0.56; genotype ACA/ACA 0.04 and genotype AGA/GGC 0.40. The test of linkage disequilibrium for all pairs of loci, performed in Arlequin ver. 2.000 program, showed significant differences for all loci. Using chi-square test, the P value was smaller than 0.0001 for all loci (table 2).

Patients were then stratified according to their genotypes of both normal and expanded allele. Two subsets of patients were the obtained. Differences in ages at onset between the two subgroups of genotypes were assessed by t test. Differences in the severity of neurological findings were assessed by chi-square test or by Kruskal-Wallis test, according to the type of variables under study.

Haplotype distribution in patients analyzed was follows: 36 heterozygote for intragenic haplotypes A-C-A/G-G-C; 10 were homozygote for genotype A-C-A/A-C-A; and 4 were heterozygote for the genotype A-G-A/G-G-C. These results pointed that the majority of the expanded alleles shared the haplotype A-C-A.

According to results presented here, patients studied carry same haplotype on the expanded allele. An attempt was made to look for an association among genotypes and clinical findings, however, no association was found.

Discussion

Linkage disequilibrium (LD) analysis in the overall MJD population reveals significant results for at least one allele for each marker (table 1). At the intragenic level, values of δ were high for alleles with the A-C-A haplotype, suggesting that this haplotype is common in most shared families. The results presented in table 1 seem to indicate that the A-C-A intragenic haplotype is conserved among most families affected with MJD.

In the overall MJD population, an association between the presence of the A variant of the A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG polymorphism with expanded chromosome was found. Similar analysis for both the C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG and the TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸ polymorphism revealed an association of the C variant of the C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG and A variant of the stop codon polymorphism with the expanded chromosome (table 1) (Fischer's exact test, $P < 0.001$).

In the present study, amongst the eight possible haplotypes when analyzing three polymorphisms, only three haplotypes were detected (A-C-A, A-G-A and G-G-C); however, in the majority (92%) of patients, the expanded chromosome was associated with the A-C-A haplotype. Interestingly, A-C-A appears in a lower frequency in normal chromosomes (20%). The A-G-A haplotype was associated with the expanded chromosome in MJD patients. On the other hand, the G-G-C haplotype was associated with the normal chromosome (table 2).

Historical findings suggest that Portuguese MJD cases are due to one original mutation, and that this mutation was introduced in several non-Portuguese families. Some families whose ancestries are not traceable back to Portugal may have undergone distinct mutational events. Previous studies suggested that the original mutation may have occurred more than five centuries ago in a Sephardic Jewish settlement in the isolated northeastern region of Portugal, spreading later to Azores (first São Miguel, and later Flores) and from there to the United States, Canada and Brazil (Sequeiros & Coutinho, 1993). The other

hypothesis is that the Flores mutation was introduced from France, since some families originated from both places share the same extended haplotype A-C-A (Gaspar *et al*, 2001).

Our results indicate that the A-C-A intragenic haplotype was associated to the disease allele in the majority of patients. These results are in agreement to previous studies (Gaspar *et al*, 2001; Stevanin *et al*, 1997). The intragenic haplotype A-C-A is also found in Flores' island, suggesting the origin of the disease allele in our population. The results presented here suggest a new insight on emigration of Azorean settlement in South Brazil, and are in contrast to our former data (Jardim *et al*, 2001b). In that study, the only available data was the historiography registry. Now the haplotype analyses come to solve this question: our patients carry the Flores haplotype. We can then conclude that the Azorean immigration to South Brazil produced a new founder effect of MJD, with its origin in Flores Island.

The other haplotype A-G-A observed in our population was also seen in patients from the USA and Marrocos (Gaspar *et al*, 2001). This haplotype is also found in descendents of Africans and Yemenites Jewish (Stevanin *et al*, 1997). Probably the cytosine in the position 987 was replaced by a guanine in a result of a punctual mutation. We are hypothesizing this because the A-C-A haplotype is the most frequent in the world population, what makes many authors infer that this is the ancestral haplotype.

Acknowledgements:

The authors would like to thank the patients for their participation in our study. The authors are also grateful to Dr Jorge Sequeiros and his research group for assistance in data interpretation and valuable discussion, and Silvana de Almeida for assistance in linkage disequilibrium analysis.

This work was partially supported by PRONEX-MCT, FIPE/HCPA, Brazil, ICCTI, Portugal. TABB is recipient of a post graduation fellowship from CAPES-Brazil.

References

- Coutinho P & Andrade C (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of Azores Islands. *Neurology* 28: 703–709.
- Delvin B & Risch N (1995). A Comparison of Linkage Disequilibrium Measures for Fine-Scale Mapping. *Genomics* 29: 311-322.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, Silveira I, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, Farrer L, Rouleau G (1996). Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet* 98: 620–624.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, Goto J, Arvidsson K, Dias A, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Lima M, Zhou Y.-X, Soong B.-W, Watanabe M, Giunti P, Stevanin G, Riess O, Sasaki H, Hsieh M, Nicholson G A, Brunt E, Higgins J J, Lauritzen M, Tranebjaerg L, Volpini V, Wood N, Ranum L, Tsuji S, Brice A, Sequeiros J, Rouleau G A (2001). Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *Am J Hum Genet* 68: 523-528.
- Goto J, Watanabe M, Ichikawa Y, Yee SB, Ihara N, Endo K, Igarashi S, Takiyama Y, Gaspar C, Maciel P, Tsuji S, Rouleau GA, Kanazawa I (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience Res* 28: 373-377.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Moreira MC, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R (2001a). A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil – 110 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8 or unidentified disease causing mutations. *J Neurol* 248: 870-876.

- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001b). Machado-Joseph disease in South Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol Scand* 104: 224-231.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001c). Neurologic findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58: 899-904.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Moreira MC, Mendonça P, Sequeiros J, Giugliani R (2002). Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurologica Scandinavica*, *in press*.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumira S, Kakizuka A (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 8: 221-8.
- Lima L & Coutinho P (1980). Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology* 30: 319-322.
- Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995). An e-m algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56: 799-810.
- Long JC (1999). Multiple locus haplotype analysis, version 2.0. Software and documentation distributed by author. Section on population genetics and linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF (1988). A sample salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972). Machado disease. A hereditary ataxian Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22: 49-55.

- Peterson RJ, Goldman D, Long JC (1999). Nucleotide sequence diversity in non-coding regions of *aldh2* as revealed by restriction enzyme and sscp analysis. *Hum Genet* 104: 177–187.
- Ranum LPW, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, Aita J, Bird TD, Goetz C, Orr HT (1995). Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: Incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet* 57: 603-608.
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology* 26: 703–714.
- Schneider S, Kueffer J-M, Roessli D, Excoffier L (2000). Arlequin ver 2.000: a software for population data analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schöls L, Vieira-Saecker AMM, Schöls S, Przuntek H, Epplen J, Riess O (1995). Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet* 4: 1001-1005.
- Sequeiros J (1989). Epidemiologia genética da doença de Machado-Joseph. *Arq Inst Nac Saúde* 14: 75–104.
- Sequeiros J & Coutinho P. Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease (1993). In: Harding A, Deufel T, Chamberlain S (eds). *Hereditary Ataxias*. *Adv Neurol*, vol 61. New York: Raven Press, pp. 139–153.
- Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A, Guimarães J, Loureiro L, Sequeiros J, Rouleau GA (1998). Molecular genetic studies in spinocerebellarataxias: analysis of SCA1, DRPLA and MJD mutations in patients from 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet*, 81: 134-138.

- Stevanin G, Cancel G, Didierjean O, Dürr A, Abbas N, Cassa E, Feingold J, Agid Y, Brice A (1995). Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral portuguese-azorean mutation. *Am J Hum Genet* 57: 1247–1250.
- Stevanin G, Lebre AS, Mathieux C, Cancel G, Abbas N, Didierjean O, Dürr A, Trottier Y, Agid Y and Brice A (1997). Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/ Machado-Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *Am J Hum Genet* 60: 1548–1552.
- Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, Endo K, Rogaev EI, Tanaka H, Sherrington R, Sanpei K, Liang Y, Saito M, Tsuda T, Takano H, Ikeda M, Lin C, Chi H, Kennedy JL, Lang AE, Wherrett JR, Segawa M, Nomura Y, Yuasa T, Weissenbach J, Yoshida M, Nishizawa M, Kidd KK, Tsuji S, St George-Hyslop P (1995). Evidence for intergenerational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4: 1137–1146.
- Woods BT & Schaumburg HH (1972). Nigro-spino-dental degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 17: 149–166.

Figure legends

Figure 1: Detection of the $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$ polymorphism and the TAA^{1118}/TAC^{1118} polymorphism by allele-specific PCR. PCR products were run on a 2% (w/v) agarose gel. (a) Detection of $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$ polymorphism. Lanes “a” denote PCR amplification using primer ASP1, and lanes “b” denote PCR amplification using primer ASP2. Lane 1: 100bp DNA ladder; lane 2: negative control (no DNA); lanes 3, 5, and 7 heterozygotes for this polymorphism; lanes 4: homozygotes for the allele G; lane 6: homozygote for the allele C. (b) Detection of TAA^{1118}/TAC^{1118} polymorphism. Lanes “a” denote PCR amplification using primer ASP3, and lanes “b” denote PCR amplification using primer ASP4. Lane 1: 100bp DNA ladder; lane 2: negative control (no DNA); lanes 3, and 4: heterozygotes for this polymorphism; lane 4: homozygote for the allele A.

Figure 2: Detection of $\underline{A}^{669}TG/\underline{G}^{669}GG$ polymorphism. (a) SSCP on a 12.5% (w/v) polyacrylamide gel. Lane 1: 100bp DNA ladder; lane 2: positive control (A/G heterozygote determined by sequencing analysis); lane 3: positive control (G/G homozygote); lanes 4 to 8, 10 and 11: A/G heterozygotes; lane 9: A/A homozygote. (b) Sequencing analysis. The arrow denotes the polymorphic site, which in this case is a G/G homozygote. (c) Sequencing analysis. The arrow denotes a A/G heterozygote.

Figure 3. Distribution of genotype frequencies in the MJD1 gene. (a) $\underline{A}^{669}TG/\underline{G}^{669}GG$ polymorphism. (b) $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$ polymorphism. (c) TAA^{1118}/TAC^{1118} polymorphism.

Table 1 - Overall linkage disequilibrium analysis

Marker	Allele ^a	Frequency in		δ^b	P ^c
		Normal Chromosome (Fc)	Expanded Chromosome (Fd)		
669 A/G	A	0.2	1.00	1.0	<0.001
987 C/G	C	0.2	0.92	0.9	<0.001
1118 A/C	A	0.2	1.00	1.0	<0.001

^a Analysis performed in the most frequent allele in the chromosome with an expanded trinucleotide repeat; ^b $\delta = (F_d - F_c)/(1 - F_c)$; ^c Fischer's exact test

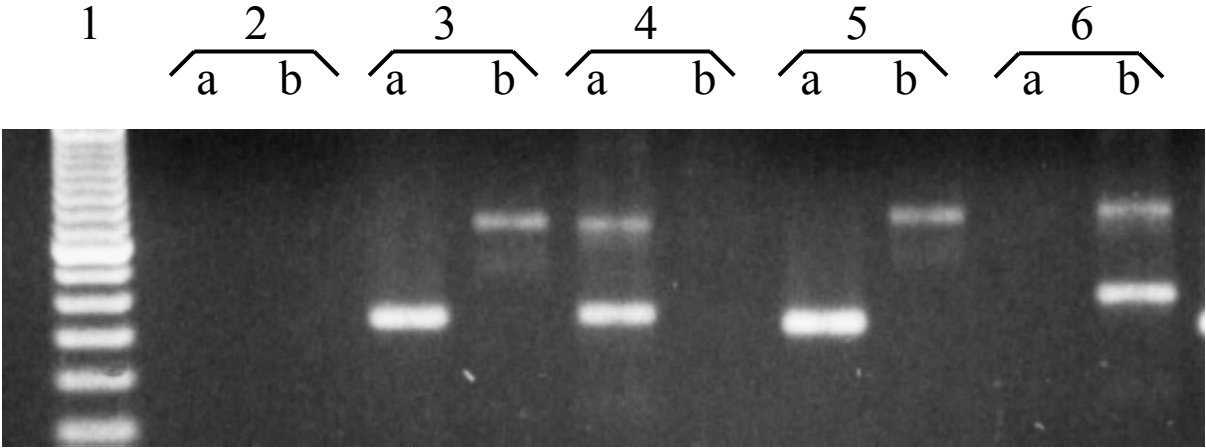
Table 2 - Overall linkage disequilibrium analysis for intragenic haplotypes

Haplotype	Frequency in		δ^a	P ^b
	Normal Chromosome (Fc)	Expanded Chromosome (Fd)		
A-C-A	0.20	0.92	0.90	<0.001
A-G-A	0.00	0.08	0.08	<0.001
G-G-C	0.80	0.00	- 4.00	<0.001

^a $\delta = (F_d - F_c)/(1 - F_c)$; ^b Fischer's exact test

Figure 1

a)



b)

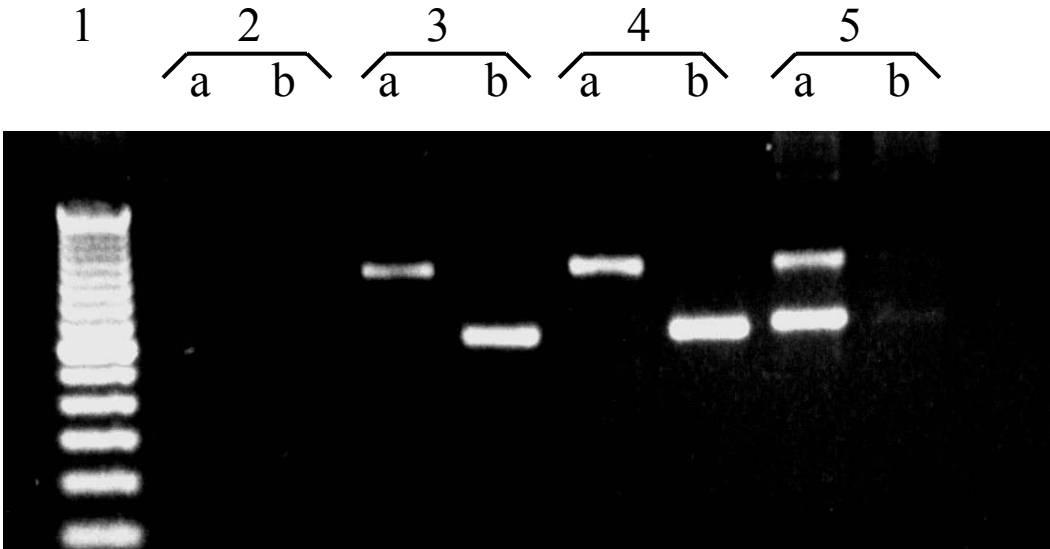
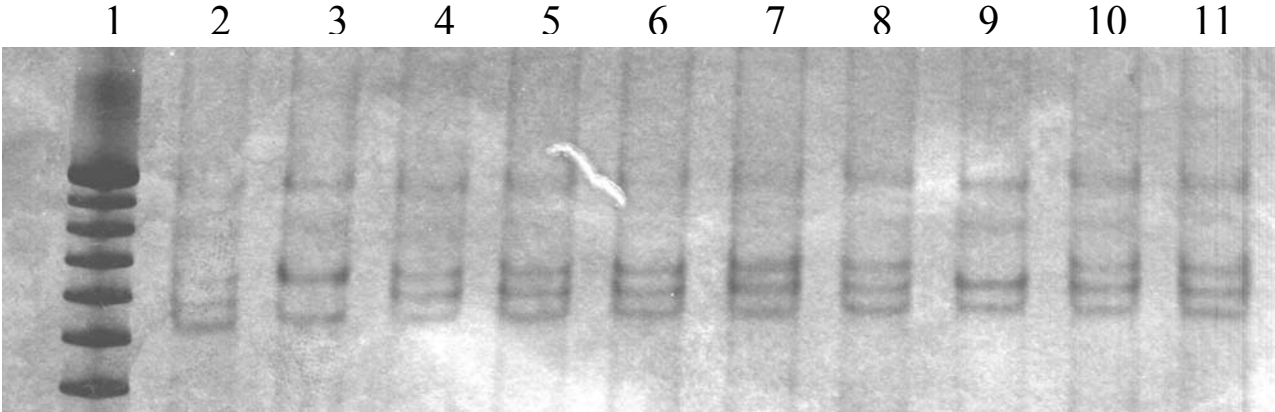
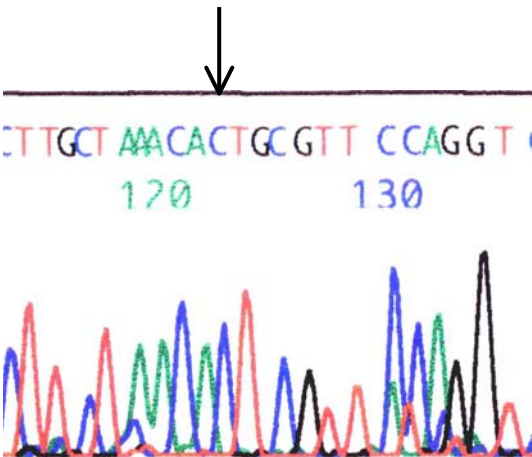


Figure 2

a)



b)



c)

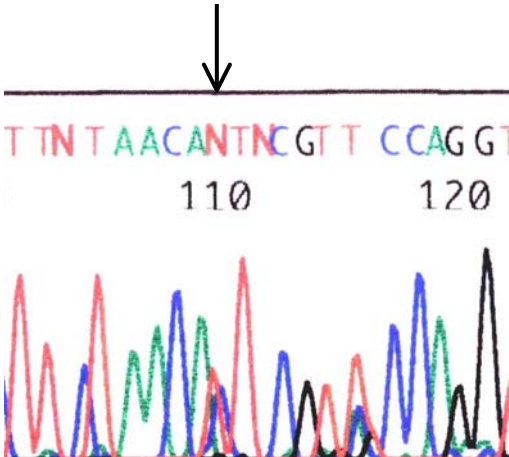
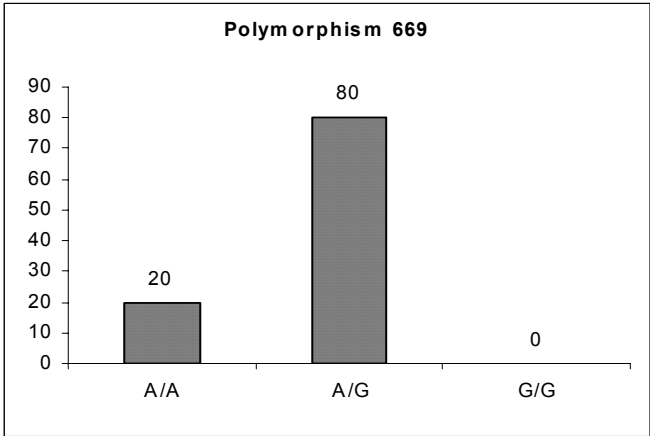
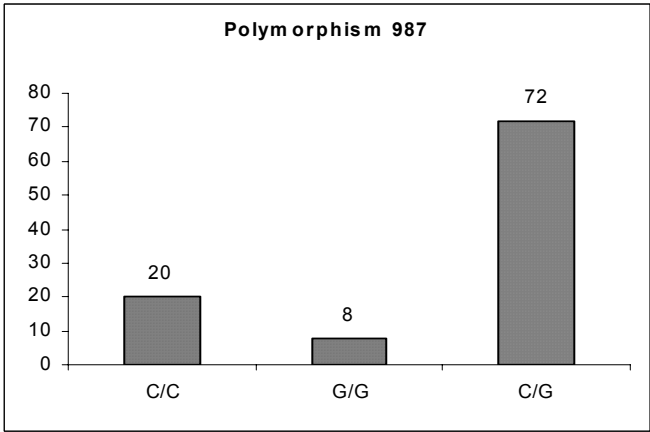


Figure 3

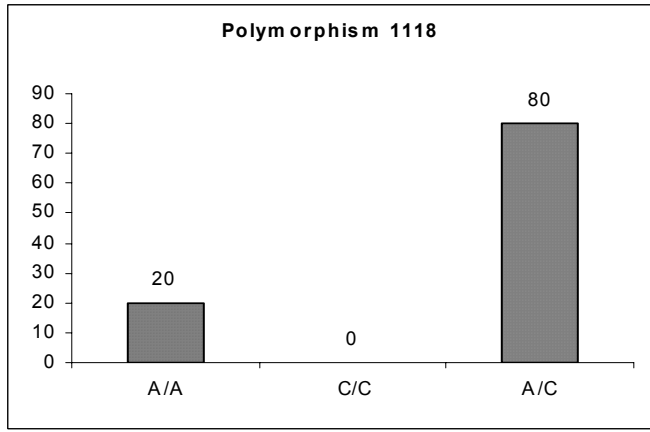
a)



b)



c)



5. DISCUSSÃO

A análise de desequilíbrio de ligação na população estudada revelou resultados significantes para pelo menos um alelo em cada marcador. Ao nível intragênico, os valores de desequilíbrio de ligação entre os alelos normais e os alelos expandidos foram altos para os alelos que formam o haplótipo A-C-A, demonstrando que este é o haplótipo mais comum na maioria das famílias do nosso estudo.

Na maioria das amostras com DMJ, uma associação entre a presença do alelo A do sítio polimórfico A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG com o cromossomo expandido foi encontrada. Análises similares revelaram que existe uma associação entre a variante C do polimorfismo C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG e a variante A deste polimorfismo com o cromossomo que apresenta a expansão (teste exato de Fischer, $P < 0,001$).

Neste estudo, somente três haplótipos foram detectados (A-C-A, A-G-A e G-G-C), entretanto, na maioria dos pacientes (92%), o cromossomo expandido está associado com o haplótipo A-C-A. Por outro lado, este haplótipo aparece em uma frequência mais baixa nos cromossomos normais (20%).

O haplótipo A-G-A estava associado com o cromossomo expandido nos pacientes afetados com DMJ. Por outro lado, o haplótipo G-G-C estava associado com cromossomo normal.

Achados históricos sugerem que os casos de DMJ em pacientes portugueses são originários de uma mutação e esta mesma mutação foi introduzida em várias famílias não portuguesas. Algumas famílias cuja ascendência não é traçada de volta a Portugal, podem ser resultado de um evento mutacional distinto. Estudos anteriores sugeriram que a mutação original deve ter ocorrido há mais de 5 séculos atrás em uma população de judeus sefaraditas, numa região isolada do noroeste de Portugal. Posteriormente foi espalhada para os Açores (primeiro São Miguel e depois Flores) e de lá para os Estados Unidos, Canadá e Brasil (Sequeiros e Coutinho 1993).

Os nossos resultados indicam que o haplótipo A-C-A está associado com o haplótipo expandido na maioria dos pacientes. Estes resultados estão de acordo com outros estudos (Gaspar *et al*, 2001; Stevanin *et al*, 1997). Este haplótipo intragênico (A-C-A) é o mesmo haplótipo encontrado na ilha de Flores, sugerindo a origem do alelo expandido na nossa população. Os resultados deste estudo trouxeram novas evidências em oposição aos dados historiográficos, ou pelo menos corrigindo-os. Nos mesmos, não há qualquer referência a

emigrantes provenientes de Flores (Piazza, 1992). É provável que os registros aglutinassem os indivíduos dessa procedência com os de uma ilha maior (Graciosa ou Terceira) ou, então, que os indivíduos de Flores tenham aportado ao Brasil depois de 1755, quando os registros da Coroa Portuguesa foram interrompidos por razões ditas estratégicas (Piazza, 1992.).

De todo modo, o achado do haplótipo A-C-A em praticamente todos os alelos expandidos, exceto os alelos expandidos que apresentam o haplótipo A-G-A, praticamente explica a idade de início mais precoce entre os nossos doentes. Os pacientes provenientes da ilha de Flores tem uma idade de início média 8 anos mais precoce do que os de São Miguel, 32 e 40 anos, respectivamente. Assim, a idade de início média dos doentes nativos de Flores é exatamente a mesma idade de início média encontrada entre os doentes provenientes do Rio Grande do Sul (Jardim *et al*, 2001b). A idade de início média no nosso meio, por outro lado, permanece um pouco maior do que a encontrada entre negros norte-americanos, japoneses e indianos (Sequeiros e Coutinho, 1993). Nessas populações, um outro agente modificador deve estar agindo.

Ambas as evidências, a dos haplótipos e, em menor grau, a das manifestações clínicas, corroboram a tese da homogeneidade entre nossos doentes e os doentes da ilha de Flores. Pode-se aqui falar em um efeito fundador, provavelmente datado de 250 anos atrás (ou seja, há dez gerações), quando a chegada desses colonos duplicou a população local.

O outro haplótipo A-G-A observado em nossa população também foi observado em pacientes dos Estados Unidos e de Marrocos (Gaspar *et al*, 2001). Este haplótipo é o mesmo dos descendentes de Africanos e de Judeus Yemenitas (Stevanin *et al*, 1997). Provavelmente a citosina localizada na posição 987 foi trocada por uma guanina como resultado de uma mutação de ponto. Esta suposição se baseia no fato do haplótipo A-C-A ser o mais freqüente na população mundial, o que levou muitos autores a inferirem que este seria o haplótipo ancestral.

A ausência de qualquer associação entre os genótipos e os achados clínicos não foi surpreendente. De fato, todos os pacientes com dados clínicos completos apresentavam o mesmo haplótipo (A-C-A) no alelo expandido. Estes pacientes variavam apenas nos seus genótipos, podendo ser homozigotos ou heterozigotos para o haplótipo A-C-A. Neste estudo, foi analisado a influência do haplótipo no alelo normal. Conforme esperado, nenhuma associação foi encontrada. Foram realizados alguns testes estatísticos, mas nenhum apresentou significância. Uma possível explicação para esses resultados seria o limitado número de pacientes avaliados nesse estudo. Portanto, a realização de um estudo semelhante

em um maior número de pacientes seria recomendável para confirmação dos resultados obtidos.

A realização de um outro estudo, incluindo outros marcadores (chamado “haplótipo expandido”) poderia resultar em uma melhor extratificação dos doentes avaliados em dois ou mais subgrupos. Nesse caso, correlações poderiam ser buscadas com uma maior “lógica biológica”. Por outro lado, se o estudo de um “haplótipo estendido” novamente demonstrasse total homogeneidade de uma amostra significativa de casos, estaríamos perante um efeito fundador talvez proveniente de um só indivíduo.

Para finalizar, o presente trabalho trouxe evidências importantes quanto a origem da DMJ no sul do Brasil e estimula a realização de estudos mais aprofundados e abrangentes, visando estabelecer outras correlações nessa doença.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

- O protocolo laboratorial para identificação dos polimorfismos $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$, $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$, $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$, utilizando as técnicas de PCR alelo-específico ou SSCP, se mostrou adequado.
- A análise de seqüenciamento direto foi utilizada para confirmação dos diferentes alelos na detecção do polimorfismo $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$, os quais foram claramente identificados pelos diferentes padrões de migração.
- Considerando o polimorfismo $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$, o alelo mais frequentemente encontrado na nossa amostra foi o A e a maioria dos pacientes (80%) eram heterozigotos A/G.
- Já o alelo mais comumente encontrado na identificação do polimorfismo $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ foi o C e 72% dos pacientes analisados eram heterozigotos C/G.
- O alelo mais frequentemente observado na identificação do polimorfismo $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ na amostra estudada foi o A e a maiorias dos pacientes (80%) eram heterozigotos A/C.
- Após a determinação dos polimorfismos, três haplótipos foram determinados na nossa amostra e a distribuição genotípica foi de 72% A-C-A/G-G-C, 20% A-C-A/A-C-A e 8% A-G-A/G-G-C.
- Dos três haplótipos observados, os haplótipos A-C-A e A-G-A foram determinados nos cromossomos que apresentam uma expansão do trinucleotídeo CAG no gene *MJD1*, enquanto os haplótipos G-G-C e A-C-A estavam ligados ao cromossomo normal.
- Os resultados obtidos, baseados nos haplótipos determinados pelos três polimorfismos intragênicos ao gene *MJD1* indicam que a origem da DMJ no sul do Brasil é proveniente da ilha de Flores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Deidmann JG, Smith JA, Struhl K (1997). Current protocol in molecular biology. Cambridge, John Willey & Sons, pp 2.5.1-2.5.17.
- Barbeau A, Roy M, Cunha L, de Vicente NA, Rosenberg RN, Nyhan WL, Mac Lead PL, Chazot G, Langston LB, Dawson DM (1984). The natural history of Machado-Joseph disease. An analysis of 138 personally examined cases. *Can J Neurol Sci*, 11: 510–525.
- Bharucha NE, Bharucha EP, Bhabha SK (1986). Machado-Joseph-Azorean disease in India. *Arch Neurol*, 43: 142-144.
- Brunner HG, Bruggenwirth HT, Nillensen W, Jansen G, Hamel BC, Hoppe RLE, DeDie, CE, Howeler CJ, Van Oost BA, Wieringa B, Ropers HH, Smeets HJM (1993). Influence of Sex of the transmitting parent as well as parental allele size on the CTG expansion in mitotic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet*, 53: 1016-1023.
- Burt T, Blumbergs P, Currie B (1993). A dominant hereditary ataxia resembling Machado-Joseph disease in Arnhem Land, Australia. *Neurology*, 43: 1750–1752.
- Costa MC, Sequeiros J, Maciel P (2002). Identification of three novel polymorphisms in the *MJD1* gene and study of their frequency in the Portuguese population. *J Hum Genet*, *in press*.
- Coutinho P & Andrade C (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of Azores Islands. *Neurology*, 28: 703–709.
- Coutinho P (1994). *Doença de Machado-Joseph*. Porto: Laboratórios Bial.
- DeStefano AL, Ferrer LA, Maciel P, Gaspar C, Rouleau GA, Coutinho P, Sequeiros J (1995). Gender equality in Machado-Joseph disease. *Nature Genet*, 11: 118-119.
- DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod PM, Sequeiros J, Rouleau GA, Farrer LA (1996). Familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 59: 119-127.
- Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Cheiweis H, Agid Y, Feingold J, Brice A (1995). Gender equality in Machado-Joseph disease. *Nature Genet*, 11: 118–119.
- Evert BO, Wüllner U, Sculz JB, Weller M, Groscurth P, Trotter Y, Brice A, Klockgether T (1999). High level expression of expanded full-length ataxin-3 *in vitro* causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet*, 8: 1169-1176.

- Gacy AM, Goellner GM, Juranic N, Macura S, McMurray C (1995). Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures *in vitro*. *Cell*, 81: 533-540.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, DeStefano A, Maciel P, Silveira I, Coutinho P, MacLeod P, Sequeiros J, Farrer L, Rouleau G (1996). Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet*, 98: 620–624.
- Gaspar C, Lopes-Cendes I, Hayes S, Goto J, Arvidsson K, Dias A, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Lima M, Zhou Y-X, Soong B.-W, Watanabe M, Giunti P, Stevanin G, Riess O, Sasaki H, Hsieh M, Nicholson G A, Brunt E, Higgins J J, Lauritzen M, Tranebjaerg L, Volpini V, Wood N, Ranum L, Tsuji S, Brice A, Sequeiros J; Rouleau G A (2001). Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *Am J Hum Genet*, 68: 523-528.
- Goldberg-Stern, D`jaldetti R, Melamed E, Gadoth N (1994). Machado-Joseph (azorean) disease in a yemenite jewish family in Israel. *Neurology*, 44: 1298–1301.
- Harding AE (1993). Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol*, 61: 1–14.
- Harper P (1997). Trinucleotide repeat disorders. *J Inher Metab Dis*, 20: 122–124.
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nature Genet*, 13: 196-202.
- Ikeuchi T, Igarshi S, Takiyama Y, Onodera O, Oyake M, Takano H, Koide R, Tanaka H; Tsuji S (1996). Non-mendelian transmission in dentatorubralpallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet*, 58: 730–733.
- Iughetti P, Otto PA, Zatz M; Passos-Bueno MR (1998). Different behavior in the paternal vs maternlly inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families. *Am J Med Genet*, 77: 246–248.
- Jardim L (2000). Aspectos clínicos e moleculares da doença de Machado-Joseph no Rio Grande do Sul. Sua relação com as outras ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes. E uma hipótese sobre seus fatores modificadores. Porto Alegre, RS, Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica. UFRGS. 316p.
- Jardim LB, Silveira O, Pereira ML, Ferro A, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J, Giugliani R (2001a). A survey on spinocerebellar ataxia in South Brazil – 110 new patients with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease causing mutations. *J Neurol*, 248: 870-876.

- Jardim L, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001b). Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. *Acta Neurol Scand*, 104: 224-231.
- Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R (2001c). Neurologic findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 58: 899-904.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Moreira M, Mendonça P, Sequeiros J, Giugliani R (2002). Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. *Acta Neurol Scand*, *in press*.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumira S, Kakizuka A (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet*, 8: 221-228.
- Leeflang EP, Tavaré S, Marjoram P, Neal COS, Srinidhi J, MacDonald ME, De Young M, Wexler NS, Gusella JF, Arnheim N (1999). Analysis of germline mutation spectra at the Huntington's disease locus supports a mitotic mutation mechanism. *Hum Mol Genet*, 8: 173-183.
- Lima L & Coutinho P (1980). Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurology*, 30: 319-322.
- Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995). An e-m algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet*, 56: 799-810.
- Long JC (1999). Multiple locus haplotype analysis, version 2.0. Software and documentation distributed by author. Section on population genetics and linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Lopes-Cendes I, Silveira I, Maciel P, Gaspar C, Radvany I, Chitayat D, Babul G, Stewart J, Dollivier M, Robataille Y, Rouleau GA, Sequeiros J (1996). Limits of clinical assesment in the accurate clinical diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 53: 1168-1174.
- Lopes-Cendes I, Teive HGA, Cardoso F, Viana EM, Calcagnotto ME, Costa JC, Trevisol-Bittencourt PC, Maciel JA, Rosseau M, Santos A, Araújo AQC; Rouleau GA (1997a). Molecular characteristics of Machado-Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz J Genet*, 20: 717-724.
- Lopes-Cendes I, Teive HGA, Calcagnotto MA, Costa JC, Cardoso F, Maciel JA, Radvany J, Arruda WO, Trevisol-Bittencourt PC, Rosa-Neto P, Silveira I, Steiner C, Pinto-Junior W, Santos AS, Correa Neto Y, Werneck LC, Araújo AQC, Carakushansky G, Mello LR, Jardim LB, Rolleau GA (1997b). 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.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J, Rouleau GA (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57: 54–61.
- Maciel P, Gaspar C, Guimarães L, Goto J, Lopes-Cendes I, Hayes S, Arvidsson K, Dias A, Sequeiros J, Sousa A, Rouleau GA (1999). Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (*MJD1*) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet*, 7: 147-156.
- Maciel P, Costa MC, Ferro A, Rousseau M, Santos C, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P, Sequeiros J (2001). Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 58: 1821-1827.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Mahal, A, Mott R, Seller M, Bates GP (1997). Instability of high expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nature Genet*, 15: 197-200.
- Maruyama H, Nakamura S, Matsuyama Z, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Hayashi M, Nishino I, Ohtake T, Oda T, Nishimura T, Saida Matsumoto H, Baba M, Kawaguchi Y, Kakizuka A and Kawakami H (1995). Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 4: 807–812.
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- Nakano KK, Dawson DM; Spence A (1972). Machado disease. A hereditary ataxian Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22: 49-55.
- Newton JM & Graham A (1994). *A PCR*. 1st Ed. United Kingdom, Bios Scientific Publishers Limited, p. 161.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2766-2770.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi, K (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879.

- Paulson HL, Das SS, Crino PB, Perez MK, Patel SC, Gotsdiner D, Fischbeck KH, Pittman RN (1997). Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann. Neurol*, 41: 453-462.
- Peterson RJ, Goldman D, Long JC (1999). Nucleotide sequence diversity in non-coding regions of *aldh2* as revealed by restriction enzyme and sscp analysis. *Hum Genet*, 104: 177-187.
- Piazza WF (1992). *A epopéia açórico-madeirense 1748-1756*. Florianópolis: Editora UFSC.
- Reddy PS & Housman DE (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 364-372.
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology*, 26: 703–714.
- Rosenberg RN (1995). Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology*, 45: 1-15.
- Sakai T, Ohta M, Ishino H (1983). Joseph disease in a non-portuguese family. *Neurology*, 33: 74–80.
- Schneider S, Kueffer J-M, Roessli D, Excoffier L (2000). *Arlequin ver 2.000: a software for population data analysis*. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Sequeiros J, Suite ND (1986). Spinopontine atrophy disputed as a separate entity: the first description of Machado-Joseph disease. *Neurology*, 36: 1408.
- Sequeiros J (1989). Epidemiologia genética da doença de Machado-Joseph. *Arq Inst Nac Saúde*, 14: 75–104.
- Sequeiros J (1993). Machado-Joseph disease – Epidemiology, genetics and genetic epidemiology. In: Lechtenberg R (ed). *Handbook of Cerebellar diseases*. 1st edition. New York: Marcel Decker Publ, pp. 354–361.
- 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.
- Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaiá A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimarães J, Tanaka M, Takiyama Y, Sakamoto H, Nishizama M, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Melki J, Munnich A (1994). Genetic linkage of Machado-Joseph disease to chromosome 14q SRTs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics*, 21: 645-648.
- Stevanin G, Cancel G, Didierjean O, Dürr A, Abbas N, Cassa E, Feingold J, Agid Y, Brice A (1995). Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3

- locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral portuguese-azorean mutation. *Am J Hum Genet*, 57: 1247–1250.
- Stevanin G, Lebre AS, Mathieux C, Cancel G, Abbas N, Didierjean O Dür A, Trottier Y, Agid Y; Brice A (1997). Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *Am J Hum Genet*, 60: 1548–1552.
- Strachan T & Read AP (1999). *Genética Molecular Humana*. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, pp. 386-387.
- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet*, 4: 300-303.
- Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, Endo K, Rogaev EI, Tanaka H, Sherrington R, Sanpei K, Liang Y, Saito M, Tsuda T, Takano H, Ikeda M, Lin C, Chi H, Kennedy JL, Lang AE, Wherrett JR, Segawa M, Nomura Y, Yuasa T, Weissenbach J, Yoshida M, Nishizawa M, Kidd KK, Tsuji S, St George-Hyslop P (1995). Evidence for intergenerational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 4: 1137–1146.
- Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, Soutome M, Ogawa T, Nakano I, Nishizawa M (1999). Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) the instability of the CAG repeats in the DRPLA gene is prominent among the CAG repeat disease. *Hum Mol Genet*, 8: 453-457.
- Teive HAG, Arruda W, Trevisol-Bittencourt PC (1991). Doença de Machado-Joseph. Descrição de cinco membros de uma família. *Arq Neuropsiquiatr*, 49: 172–179.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72: 971-983.
- Trottier Y, Biancalana V, Mandel JL (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease gene: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet*, 31: 377-382.
- Twist EC, Causaubon LK, Ruttledge M, Rao VS, MacLeod PM, Radvany J, Zhao Z, Casaubon LK, Ruttledge MH, Rao VS, Macleod PM, Radvany J, Zhao Z, Rosenberg RN,

- Farrer LA, Rouleau GA (1995). Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J Med Genet*, 32: 25–31.
- Wells RD (1996). Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J. Biol. Chem*, 271: 2875-2878.
- Woods BT & Schaumburg HH (1972). Nigro-spino-dental degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci*, 17: 149–166.
- Zandoná D, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Moreira MC, Mendonça P, Cecchin C, Sequeiros J, Jardim LB (2002). Ataxias espinocerebelares no sul do Brasil – atualização com 81 casos familiares, portadores da Doença de Machado-Joseph, SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA8, ou de mutações não identificadas. Livro de resumos do 14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica, Ribeirão Preto. p. 105.
- Zoghbi HY & Orr HT (2001). Spinocerebellar Ataxias. In: Scriver CR, Beaudet AL, William SS, Valle D (eds). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition, New York: McGraw-Hill, pp 5741-5754.

8. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

Tratado de Madri

http://www.multirio.rj.gov.br/historia/modulo01/tratado_madri.html

<http://www.terravista.pt/fernoronha/5667/colonia5.htm>

Colonização açoriana

<http://www.riogrande.com.br/historia/colonizacao3.htm>

9. ANEXOS

Os protocolos laboratoriais utilizados para realização deste trabalho serão descritos abaixo.

9.1 – Extração de DNA genômico (Miller *et al*, 1988):

O DNA genômico foi extraído a partir de 5 ou 10ml de sangue em (quanto) EDTA, utilizando o método de precipitação em excesso de sais (*salting-out*).

O protocolo utilizado foi o seguinte:

- a) transferir o sangue para um tubo plástico cônico estéril de 50ml (tipo Falcon) logo após o seu descongelamento;
- b) adicionar água destilada esterelizada gelada até completar 50ml;
- c) agitar a amostra em agitador de tubos;
- d) centrifugar a amostra por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente;
- e) desprezar o sobrenadante;
- f) adicionar 25ml de Triton X-100 0,1% (v/v) ao precipitado;
- g) homogeneizar o precipitado por alguns segundos até a completa ressuspensão;
- h) centrifugar a solução por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente;
- i) desprezar o sobrenadante;
- j) adicionar ao precipitado 3ml de solução Tris-HCl 100mM, NaCl 4M, EDTA 20mM;
- k) agitar a solução no agitador de tubos durante aproximadamente 20 segundos;
- l) adicionar 120µl da solução de proteinase K 10mg/ml;
- m) adicionar 200µl de SDS 10% (p/v);
- n) agitar rapidamente a solução no agitador de tubos;
- o) incubar a amostra a 37°C durante um período de 12 a 16 horas;
- p) adicionar 1ml de acetato de amônio 9,6M;
- q) homogeneizar no agitador de tubos por 15 segundos;
- r) manter a amostra em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos;
- s) centrifugar a solução durante 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente;
- t) transferir o sobrenadante para um frasco de vidro de 20ml estéril;
- u) adicionar ao sobrenadante 10ml de etanol absoluto gelado;
- v) misturar levemente por inversão;

- x) retirar o DNA e transferir para um tubo de plástico cônico de 1,5ml (tipo Eppendorf);
- y) ressuspender em 150 a 200µl de solução de Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM;
- z) manter a solução em temperatura ambiente durante alguns minutos e posteriormente armazenar a - 20°C até o momento de uso;

Uma alíquota de 10µl da solução de DNA foi transferida para um tubo cônico de plástico de 1,5ml (Eppendorf) e diluída até 500µl com água Mili-Q (diluição 1:50). A amostra foi homogeneizada e a absorbância da mesma foi lida em um quantificador de DNA (Pharmacia Biotech) a 260nm. A concentração de DNA foi determinada considerando que 1 unidade de absorbância é equivalente a 50 µg/ml de DNA dupla fita.

A solução de DNA foi então diluída até uma concentração final de 100ng/µl.

9.2 – Amplificação das regiões de interesse pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Newton & Graham, 1994):

Para a realização deste estudo, três regiões do gene *MJD1* foram amplificadas. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) encontra-se a seguir:

- Para análise do polimorfismo $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ (Gaspar *et al*, 2001)
 - MJD1VSR 5' TACTAGAGCTTATTTGCCAG 3'
 - MJD734R 5' CAGAGCCCTCTGCAAATCCT 3'
- Para a análise do polimorfismo $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ (Gaspar *et al*, 2001)
 - MJD52 5'CCAGTGACTACTTTGATTCG 3'
 - ASP1 5'ACTCTGTCCTGATAGGTCCCC 3' ou
 - ASP2 5'ACTCTGTCCTGATAGGTCCCC 3'
- Para a análise do polimorfismo $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ (Gaspar *et al*, 2001)
 - MJD52 5'CCAGTGACTACTTTGATTCG 3'
 - ASP3 5'GCAAAAATCACATGGAGCTCT 3' ou
 - ASP4 5'GCAAAAATCACATGGAGCTCG 3'

Obs: Os nucleotídeos sublinhados identificam o nucleotídeo do sítio polimórfico.

Todos os *primers* foram diluídos com água Mili-Q até uma concentração de 1000 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ (solução estoque). A solução de uso foi preparada para uma concentração final de 10 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$.

As reações de amplificação dos fragmentos por PCR foram realizadas conforme as especificações da tabela 9.2.1. As condições de amplificação utilizadas estão descritas na tabela 9.2.2. Paralelamente aos tubos testes, um tubo branco foi preparado para cada bateria de PCR, substituindo o DNA por água Mili-Q estéril.

Na identificação dos polimorfismos $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ e $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ foram realizadas 2 reações de PCR para cada amostra, pois o protocolo utilizado baseia-se na utilização de *primers* alelo-específicos.

Tabela 9.2.1: Protocolo básico para as reações de PCR

Reagentes	Volume (μ l)	Concentração Final
dNTPs	2,50	0,2mM de cada dNTP
Tampão de PCR	2,50	Tris-HCl 20mM (pH 8,4); KCl 50mM
<i>Primer</i> A (10 μ mol/ μ l)	1,50	15 μ mol
<i>Primer</i> B (10 μ mol/ μ l)	1,50	15 μ mol
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/ μ l)	1,25	6,25 unidades
DNA (100ng/ μ l)	2,00	200 ng
Água Milli-Q estéril	13,75	
Volume total da reação	25	

Tabela 9.2.2: Condições de amplificação

Estágio	Temperatura	Tempo	N ^o de ciclos
Desnaturação inicial	94 ^o C	5 min	1
Desnaturação	94 ^o C	1 min	30
Anelamento	55 ^o C ou 65 ^o C	30 seg	
Extensão	72 ^o C	1 min	
Extensão final	72 ^o C	5 min	1

PS: A temperatura de anelamento utilizada foi 55^oC para o polimorfismo A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG, enquanto os demais polimorfismos foram detectados utilizando-se a temperatura de anelamento de 65^oC.

9.3 – Análise dos produtos amplificados em gel de agarose (Ausubel *et al*, 1997):

A amplificação do fragmento desejado foi confirmada pela análise do produto de PCR por eletroforese realizada em gel de agarose 2% (p/v) em solução contendo trizma base 100mM, ácido bórico 90mM e EDTA 1mM. Uma alíquota de 5µl do volume final do produto amplificado foi adicionada a 1µl de tampão contendo xileno cianol 0,25% (p/v) e ficol 15% (p/v) e submetida à separação eletroforética a 100V por 30 minutos. Paralelamente às amostras, foi analisado um marcador de peso molecular de 100pb. A visualização do fragmento amplificado foi realizada pelo coramento do gel com solução de brometo de etídio (10mg/mL) e transluminação com luz ultravioleta.

9.4 – Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP) (Orita *et al* 1989a; Orita *et al*, 1989b).

O polimorfismo $\underline{A}^{69}\text{TG}/\underline{G}^{69}\text{TG}$ foi amplificado conforme item 9.2 e submetido ao SSCP, conforme descrito abaixo.

Uma alíquota de 8µl de produto de PCR foi adicionada a 5µl de tampão contendo azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v) e ficol 15% (p/v) em um tubo cônico de plástico de 0,5ml (tipo Eppendorf). As amostras foram colocadas em um termociclador a 99°C por 10 minutos para serem desnaturadas e, decorrido este tempo, foram transferidas para um banho de gelo imediatamente, onde foram mantidas durante 5 minutos. Uma alíquota de 8µl do material desnaturado foi aplicada na canaleta de um gel de poliacrilamida 12,5% (p/v) (acrilamida-bisacrilamida - 49:1). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 14 horas.

A revelação do gel foi realizada conforme protocolo abaixo:

- a) Etapa de fixação: submergir o gel em solução de etanol a 10% (v/v), por 5 minutos;
- b) Etapa de oxidação: submergir o gel em solução de ácido nítrico 1% (v/v), por 3 minutos;
- c) Lavagem do gel em água destilada e deionizada por poucos segundos
- d) Etapa de impregnação com prata: submergir o gel em solução de nitrato de prata 0,012M por 20 minutos;
- e) Lavagem do gel em água destilada e deionizada por poucos segundos;
- f) Revelação do gel. Submergir o gel em solução de carbonato de sódio anidro 0,28M e formaldeído 37% (v/v) até a visualização dos fragmentos, o que em geral ocorre em aproximadamente 15 min;
- g) Parar a revelação tratando o gel com solução de ácido acético a 10% (v/v) por 2 minutos;
- h) Lavagem do gel em água destilada e deionizada por poucos segundos;
- i) Submergir o gel em solução de etanol 50% (v/v) por 30 minutos.

Após seguir estes passos, o gel foi transferido para papel Whatman 3MM e colocado em um secador de gel a vácuo. O mesmo foi mantido durante 25 minutos a uma temperatura de 65°C até que o gel estivesse completamente seco.

9.5 – Sequenciamento direto

As amostras com mobilidade eletroforética alterada no SSCP foram submetidas à análise de seqüenciamento direto automatizado. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *ConcertTM Rapid PCR Purification System* (GIBCO-BRL Products), seguindo as instruções do fornecedor.

Os produtos purificados foram submetidos à análise de seqüenciamento direto utilizando o kit *Big DyeTM Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) pelo método de terminação fluorescente em um analisador genético (*ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer*).

9.6 - Derivação dos haplótipos

Os haplótipos destes marcadores foram derivados por máxima verossimilhança para a população utilizando o programa Multiple Locus Haplotype Analysis ver. 2.0 (Long *et al*, 1995; Peterson *et al*, 1999). Os testes de desequilíbrio de ligação foram realizados utilizando o programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider *et al*, 2000).

9.7 – Análise Estatística

As frequências alélicas dos polimorfismos identificados foram calculadas pelo método da contagem gênica.

As análises estatísticas realizadas para correlacionar haplótipos com idade de início da doença, tipo clínico e manifestações neurológicas (síndrome piramidal, ataxia axial, ataxia apendicular, nistagmo, retração palpebral, oftalmoparesias, disfagia, disartria, fasciculações, alterações sensoriais, distonia, caimbras e atrofia óptica) foram realizadas utilizando o programa SPSS ver. 10.0. Os testes realizados foram os seguintes: análise estatística de variância de um fator (ANOVA), teste t, Qui-quadrado com correção de Bonferroni quando necessário e o teste exato de Fischer.