

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

***AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE REPARO DE DNA EM
POLIGLUTAMINOPATIAS COM
ÊNFASE NA DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH***

RAFAELLA MERGENER

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira

Porto Alegre, dezembro de 2020.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurogenética Translacional do Centro de Pesquisa Experimental no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em parceria com a Seção de Biologia Molecular do Departamento de Ciências Biomédicas de Células e Sistemas (*Molecular Cell Biology section of the Department of Biomedical Science of Cells and Systems*) no Centro Médico Universitário de Groningen (*University Medical Center Groningen – UMCG*), Holanda. Teve como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo 141889/2016-0), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) através do programa NUFFIC - Edital nº 63/2014 (Processo 88887.142488/2017-00).

“Alice perguntou: Gato Cheshire... pode me dizer qual o caminho que eu devo tomar?

Isso depende muito do lugar para onde você quer ir – disse o Gato.

Eu não sei para onde ir! – disse Alice.

Se você não sabe para onde ir, qualquer caminho serve.”

Alice no País das Maravilhas, Lewis Carroll, 1865

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à minha orientadora, Professora Maria Luiza Saraiva-Pereira que me acolheu, foi uma luz no meu caminho quando eu não sabia para onde ir e tem me guiado durante estes quatro anos de doutorado.

Agradeço a Professora Laura Bannach Jardim por ter me aberto novos caminhos, ampliando meu mundo e proporcionado aprendizados não somente na área acadêmica, mas pessoal também.

Agradeço ao Professor Harm H. Kampinga e ao Dr. Steven Bergink pela acolhida e paciência.

Agradeço enormemente aos colegas e amigos que trilharam estes caminhos comigo nos laboratórios em que estive, em especial a Yelena Perevalova que, sendo fazendo experimentos, piñatas ou escaladas sempre deixava o ambiente mais leve, com empolgação e alegria; a Amanda Carpinetti de Souza, que foi um presente do laboratório e tem me acompanhado com muito carinho nesses últimos 2 anos e que, com certeza é uma amiga que quero (e vou) levar para o resto da vida; a Ana Carolina Farias, que muitas vezes me trouxe paz em momentos de ansiedade; aos demais colegas, Rafael Caesar Gomes Gonçalves, Raquel de Souza, Eduardo Preusser de Mattos, Maria A. W. H. van Waarde, Márcia Polese-Bonato, Gabriel Vasata Furtado, Ana Carolina Martins, Lucas Senna, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade.

Agradeço a minha família, minha irmã Michelle Mergener, minha mãe Saraí Maria Pereira e meu pai José Augusto Teixeira Mergener por ter me direcionado e estado ao meu lado nesta jornada; aos meus sobrinhos Pedro e Isabella por serem muito fofos e me alegrarem. Também a minha família de coração, meus amigos Mariana Severiano Dias, Matheus Cavalheiro Teixeira, Emerson Santos e Maria Franciéli de Machado, que muitas, mas muitas vezes mesmo, me ouviram, me aconselharam e me divertiram.

Encontrei nesta viagem meu porto seguro chamado Mauro André de Oliveira e agradeço a ele por todo o amor, compreensão das minhas rabugices e incentivo a me tornar uma pessoa melhor; agradeço também aos nossos filhos, Geléia, Belinha e Astrogildo pelos abraços e carinhos e lambidas.

Recapitulando o tempo passado vejo que não escolhi um caminho qualquer mas sim o melhor.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Ataxia espinocerebelar do tipo 3 ou doença de Machado-Joseph, um epítome....	13
1.1.1. Epidemiologia.....	14
1.1.2. Etiologia.....	16
1.1.3. Modificadores de fenótipo.....	18
1.1.4. Patogenicidade.....	19
1.2. Estabilidade do DNA.....	20
1.2.1. Antecipação genética.....	20
1.2.2. Integridade do DNA.....	22
1.3. Mecanismos de Reparo de DNA.....	25
1.3.1. Reparo de DNA e doenças neurodegenerativas.....	28
1.3.2. Reparo de DNA e SCA3/MJD.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. RESULTADOS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICE 1.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AD	Autossômica dominante
ALS	Esclerose lateral amiotrófica (<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>)
AOA1	Ataxia com apraxia oculomotora tipo 1 (<i>Ataxia-oculomotor apraxia type 1</i>)
AOA2	Ataxia com apraxia oculomotora tipo 2 (<i>Ataxia-oculomotor apraxia type 2</i>)
APE1	Endonuclease apurínica (<i>apurinic endonuclease</i>)
APTX	Aprataxina (<i>Aprataxin</i>)
AR	Autossômica recessiva
AT	Ataxia-Telangiectasia (<i>ataxia-telangiectasia</i>)
ATM	Proteína ataxia telangiectasia mutada (<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>)
ATR	Proteína ataxia telangiectasia relacionada ao Rad3 (<i>ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein</i>)
<i>ATXN1</i>	Gene <i>ataxin 1</i>
<i>ATXN2</i>	Gene <i>ataxin 2</i>
<i>ATXN3</i>	Gene <i>ataxin 3</i>
<i>ATXN7</i>	Gene <i>ataxin 7</i>
BER	Reparo por excisão de base (<i>base excision repair</i>)
BRCA1	Gene do câncer de mama 1 (<i>Breast cancer 1 gene</i>)
BRCA2	Gene do câncer de mama 2 (<i>Breast cancer 2 gene</i>)
Ca ²⁺	Cálcio
<i>CACNA1A</i>	Gene canal de cálcio, dependente de voltagem, tipo PQ subunidade alfa-1A (<i>Calcium channel, voltage-dependent, p/q type, alpha-1A subunit</i>)
CAGexp	Expansão trinucleotídica CAG
CBP	Proteína de ligação de proteína-lisina acetiltransferase CREB (<i>Protein-Lysine Acetyltransferase (CREB) Binding Protein</i>)
CSA	Síndrome de cockayne A (<i>Cockayne syndrome A</i>)
CSB	Síndrome de cockayne B (<i>Cockayne syndrome B</i>)
DDR	Resposta ao dano de DNA (<i>DNA damage response</i>)
DN	Núcleo dentado (<i>Dentate nucleus</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PKcs	Subunidade catalítica de proteína quinase dependente de DNA (<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>)
DR	Reparo direto (<i>direct repair</i>)

DRPLA	Atrofia dentatorubro-palidoluisiana (<i>Dentatorubral-pallidoluysian atrophy</i> ;))
DSBs	Quebras de cadeia dupla de DNA (<i>double strand breaks</i>).
ERCC1	Grupo de complementação cruzada de reparo de excisão 1 (<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
EXO1	Exonuclease 1
FA	Anemia de Fanconi (<i>Fanconi Anemia</i>)
FAAP20	Proteína 20 associada ao complexo central FA (<i>FA Core Complex Associated Protein 20</i>)
FAAP100	Proteína 100 associada ao complexo central FA (<i>FA Core Complex Associated Protein 100</i>)
FACJ	<i>Fanconi Anemia Group J Protein</i>
FAN1	[endo] nuclease 1 associada à Fanconi anemia FANCI/FANCD2 (<i>Fanconi anemia FANCI/FANCD2-associated [endo]nuclease 1</i>)
FANCA	<i>FA Complementation Group A</i>
FANCB	<i>FA Complementation Group B</i>
FANCC	<i>FA Complementation Group C</i>
FANCD2	<i>FA Complementation Group D2</i>
FANCE	<i>FA Complementation Group E</i>
FANCF	<i>FA Complementation Group F</i>
FANCG	<i>FA Complementation Group G</i>
FANCI	<i>FA Complementation Group I</i>
FANCL	<i>FA Complementation Group L</i>
FANCM	<i>FA Complementation Group M</i>
FANCN	<i>FA Complementation Group N</i>
FANCS	<i>FA Complementation Group S</i>
FEN1	Endonuclease específica da estrutura de aba 1 (<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>)
FTD	Demência frontotemporal (<i>Frontotemporal dementia</i>)
FUS	Proteína fusionada em sarcoma (<i>Fused in sarcoma</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HD	Doença de Huntington (<i>Huntington disease</i>)
HR	Recombinação homóloga (<i>homologous recombination</i>)

HR23B	Homólogo B de Rad23 (<i>Rad23 homolog B</i>)
HspB5	Chaperona Alfa-B cristalina
Htt	Proteína Huntingtina (<i>Huntingtin</i>)
<i>HTT</i>	gene Huntingtina (<i>Huntingtin gene</i>)
ICL	Ligações cruzadas entre cadeias de DNA (<i>interstrand crosslink</i>)
ii	Idade de início dos sintomas
Ku 70 (XRCC6)	Proteína de complementação cruzada de reparo por raios-X 6 (<i>X-Ray Repair Cross Complementing 6</i>)
Ku 80 (XRCC5)	Proteína de complementação cruzada de reparo por raios-X 5 (<i>X-Ray Repair Cross Complementing 5</i>)
LIG4	Ligase 4
LTD	Depressão cerebelar de longa duração (<i>long-term depression</i>)
MAF	Frequência do alelo menos comum
MGMT	O6-metilguanina metiltransferase (<i>O6-methylguanine methyltransferase</i>)
MJD	Doença de Machado-Joseph (<i>Machado-Joseph disease</i>)
<i>MJD1</i>	Gene da MJD
MLH1	Proteína de reparo de bases mal pareadas de DNA 1 (<i>DNA mismatch repair protein 1</i>)
MMR	Reparo de bases mal pareadas (<i>mismatch repair</i>)
MRE11	Proteína de reparo de quebra de cadeia dupla MRE11 (<i>double-strand break repair protein MRE11</i>)
MRN	Complexo MRE11-RAD50-NBS1
MRNIP	Proteína de interação com complexo MRN (<i>MRN complex-interacting protein</i>)
MSH2	Homólogo de MutS 2 (<i>MutS Homolog 2</i>)
MSH3	Homólogo de MutS 3 (<i>MutS Homolog 3</i>)
MSH6	Homólogo de MutS 6 (<i>MutS Homolog 6</i>)
<i>MTMR10</i>	Proteína 10 relacionada à miotubularina (<i>myotubularin-related protein 10</i>)
mRNA	RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>)
NAHR	Recombinação homóloga não alélica (<i>nonallelic homologous recombination</i>)
NBS	Nibrina (<i>Nibrin</i>)
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos (<i>nucleotide excision repair</i>)
NHEJ	União de extremidades não homólogas (<i>non-homologous end-joining</i>)
O ₂	Oxigênio

PABP	Proteína de ligação a poli-A (<i>poly(A)-binding protein</i>)
PARP-1	Polimerase de poli (ADP-Ribose) 1 (<i>poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>)
PARP-2	Polimerase de poli (ADP-Ribose) 2 (<i>poly(ADP-ribose) polymerase 2</i>)
pb	Pares de base
PCNA	Antígeno nuclear celular em proliferação (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PMS1	Segregação pós-meiótica aumentada (<i>S. Cerevisiae</i>) 1 (<i>postmeiotic segregation increased (S. Cerevisiae) 1</i>)
PMS2	Segregação pós-meiótica aumentada (<i>S. Cerevisiae</i>) 2 (<i>postmeiotic segregation increased (S. Cerevisiae) 2</i>)
PNK	Polinucleotídeo cinase (<i>Polynucleotide kinase</i>)
PNKP	Polinucleotídeo 3'-Fosfatase cinase (<i>Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase</i>)
Poli-A	Poli-adenosinas
PoliQ	Poliglutamina
PQC	Controle de qualidade de proteínas (<i>Protein Quality Control</i>)
PSP	Paralisia supranuclear progressiva (<i>Progressive supranuclear palsy</i>)
RAD50	Proteína de reparo de quebra de cadeia dupla RAD50 (<i>RAD50 double strand break repair protein</i>)
RAD51	Proteína de Recombinação A (<i>Recombination protein A</i>)
RAD52	Proteína de recombinação RAD52 (<i>Recombination protein RAD52</i>)
RBBP8	Proteína de ligação ao retinoblastoma 8 (<i>Retinoblastoma-binding protein 8</i>)
RFC	Fator de replicação C (<i>Replication factor C</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAPII	RNA polimerase II
RPA	Proteína de replicação A (<i>Replication protein A</i>)
RS	Rio Grande do Sul
SBMA	Atrofia muscular bulbo-espinhal (<i>Spinal-bulbar muscular atrophy</i>)
SCA	Ataxia espinocerebelar (<i>Spinocerebellar ataxia</i>)
SCA1	Ataxia espinocerebelar do tipo 1 (<i>Spinocerebellar ataxia type 1</i>)
SCA2	Ataxia espinocerebelar do tipo 2 (<i>Spinocerebellar ataxia type 2</i>)
SCA3	Ataxia espinocerebelar do tipo 3 (<i>Spinocerebellar ataxia type 3</i>)
SCA6	Ataxia espinocerebelar do tipo 6 (<i>Spinocerebellar ataxia type 6</i>)
SCA7	Ataxia espinocerebelar do tipo 7 (<i>Spinocerebellar ataxia type 7</i>)
SCA17	Ataxia espinocerebelar do tipo 17 (<i>Spinocerebellar ataxia type 17</i>)

SCAN1	Ataxia espinocerebelar com neuropatia axonal tipo 1 (<i>Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1</i>)
SETX	Senataxina (<i>Senataxin</i>)
SLX1	Subunidade de endonuclease específica da estrutura (<i>Structure-specific endonuclease subunit</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
Spo11	Proteína específica para esporulação 11 (<i>sporulation-specific protein 11</i>)
SSBs	Quebras de cadeia simples de DNA (<i>single strand breaks</i>)
ssDNA	Fita simples de DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
STR	Seqüências curtas repetidas em tandem (<i>short tandem repeats</i>)
TDP1	Tirosil-DNA fosfodiesterase 1 (<i>tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1</i>)
TDP-43	Proteína de ligação de DNA transativa 43 (<i>Transactive DNA-binding protein 43</i>)
TOP	Topoisomerase (<i>topoisomerase</i>)
TOP1	Topoisomerase tipo 1 (<i>topoisomerase I</i>)
TOP2	Topoisomerase tipo 2 (<i>topoisomerase II</i>)
UNG1	Uracil DNA Glicosilase 1 (<i>uracil-DNA glycosylase 1</i>)
UTR	Região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
UV	Radiação ultravioleta
XLF	Fator semelhante a XRCC4 (<i>XRCC4-like factor</i>)
XPA	Xeroderma pigmentoso, grupo A (<i>Xeroderma pigmentosum, group A</i>)
XPC	Xeroderma pigmentoso, grupo C (<i>Xeroderma pigmentosum, group C</i>)
XPB	Xeroderma pigmentoso, grupo D (<i>Xeroderma pigmentosum, group D</i>)
XPF	Xeroderma pigmentoso, grupo F (<i>Xeroderma pigmentosum, group F</i>)
XPG	Xeroderma pigmentoso, grupo G (<i>Xeroderma pigmentosum, group G</i>)
XRCC1	Proteína de complementação cruzada de reparo por raios-X 1 (<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>)
XRCC4	Proteína de complementação cruzada de reparo por raios-X 4 (<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>)

RESUMO

A ataxia espinocerebelar tipo 3, ou doença de Machado-Joseph (SCA3/MJD), pertence a um grupo de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade. A SCA3/MJD é causada por uma expansão de repetições CAG no DNA, que se reflete a nível proteico com o acúmulo de glutamina o qual tende a formar agregados tóxicos. Sequências de CAG mais longas se correlacionam inversamente com a idade de início (ii) dos sintomas. Porém, em média, apenas 55,2% da variação da ii pode ser explicada por essa expansão. As repetições expandidas são geneticamente instáveis, com propensão a se expandir ainda mais, gerando mosaicismos somáticos. Visto que, mesmo as células que proliferam muito lentamente têm tendência à expansão, mecanismos não replicativos, como o reparo de DNA, são mais propensos a explicar muitas das expansões somáticas no cérebro. Nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos genes do sistema de reparo de DNA como modificadores da ii em pacientes com SCA3/MJD, bem como o efeito desses sistemas na formação de agregados e estabilidade das repetições CAG. Por meio do estudo de células de pacientes com SCA3/MJD pudemos notar que a instabilidade somática, ou a falta dele, não é o motivo da morte celular, que ocorre, aparentemente, de forma sistêmica. Mesmo que o reparo de ligações cruzadas entre cadeias de DNA tenha mostrado um efeito moderado na formação de agregados, variantes no gene *FAN1* estão associadas à ii tardia. Demonstramos a prevalência da variação rs3512 deste gene no Rio Grande do Sul e em um grupo de pacientes com SCA3/MJD, com efeito protetor na mesma direção dos estudos anteriores. Também demonstramos que a inibição de algumas proteínas-chave do sistema de reparo do DNA pode levar a um aumento da agregação com a inibição das topoisomerasas I e II exibindo uma enorme formação de agregados poliQ nuclear. Com esse fato em mente, testamos sete (equivalentes a 110) variantes no DNA. Nenhuma delas está associada à ii da doença, de modo que a formação de agregados detectada anteriormente pode refletir um desequilíbrio nas vias celulares. Por fim, a superexpressão de uma chaperona, a HspB5 pode suprimir a formação destes agregados tóxicos, sem influenciar no reparo de DNA. Assim, nossos achados sugerem que o acúmulo de danos e a manutenção de agregados proteicos são mecanismos distintos, mas inter-relacionados, atuando na homeostase celular, causando escassez de proteínas, seja pelo sequestro ou pela diminuição de sua produção via transcrição, comprometendo a sobrevivência neuronal.

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 3, or Machado-Joseph disease (SCA3/MJD), belongs to a group of neurodegenerative diseases related to age. SCA3/MJD is caused by an DNA expansion of CAG repeats, which is reflected at the protein level as the accumulation of glutamine and tends to form toxic aggregates. Longer CAG sequences correlate inversely with the age of onset (AO) of the symptoms. However, on average, only 55.2% of the AO variation can be explained by this expansion. The expanded repetitions are genetically unstable, with a propensity to expand further, generating somatic mosaicism. Since even cells that proliferate very slowly tend to expand, non-replicative mechanisms, such as DNA repair, are more likely to explain many of the somatic expansions in the brain. Our study aimed to evaluate the effect of the DNA repair system genes as modifiers on AO in patients with SCA3/MJD, as well as the effect of these systems on the formation of aggregates and stability of CAG repetitions. Through the study of cells from patients with SCA3/MJD we could show that somatic instability, or the lack of it, is not the reason for cell death, which apparently occurs in a systemic way. Even though the repair of cross-links between DNA strands has a moderate effect on the formation of aggregates, variants in the FAN1 gene are associated with late AO. We demonstrated the prevalence of FAN1 variation rs3512 in Rio Grande do Sul and in a group of patients with SCA3/MJD, corroborating its protective effect in the same direction than previous studies. We also demonstrate that the inhibition of some key proteins of the DNA repair system can lead to increased aggregation with the inhibition of topoisomerases I and II exhibiting an enormous formation of nuclear polyQ aggregates. With that fact in mind, we tested seven (equivalent to 110) variants in DNA. None of them are associated with the disease AO, so the formation of aggregates previously detected may reflect an imbalance in the cellular pathways. Finally, overexpression of a chaperone HspB5 can suppress the formation of these toxic aggregates, with no repercussions on DNA repair. Thus, our findings suggest that the damage accumulation and the maintenance of protein aggregates are distinct but interrelated mechanisms acting on cellular homeostasis, causing protein shortages, either by protein sequestration or by decreasing their production via transcription, thus compromising neuronal survival.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ataxia espinocerebelar do tipo 3 ou doença de Machado-Joseph, um epítome.

A primeira publicação desta condição se deu em 1972 e foi alcunhada Doença de Machado, dado que consistia na descrição clínica de quatro gerações de descendentes de William Machado, imigrante luso-americano, nativo da Ilha de São Miguel nos Açores, Portugal que migrou para o estado de Massachusetts, Estados Unidos da América (EUA). Os integrantes afetados apresentavam ataxia de marcha de progressão lenta com início na vida adulta, seguida de outros sintomas variados. A doença de Machado foi considerada de herança autossômica dominante (AD), entretanto os filhos de indivíduos aparentemente sem sintomas poderiam apresentá-la, uma vez que os pais tenham vindo a óbito antes dos 40 anos (idade média de início da doença). O grande número de casos foi atribuído ao fato de que 9 dos 13 descendentes da primeira geração manifestaram sinais neurológicos (Nakano *et al.*, 1972).

Alguns anos mais tarde, em 1976, outra doença cuja principal manifestação clínica era igualmente ataxia de marcha foi caracterizada e denominada Doença de Joseph, epônimo de Antone Joseph, também imigrante nos EUA proveniente das ilhas dos Açores. Neste artigo foram estudadas oito gerações de descendentes do Antone Joseph com ataxia de marcha, que se manifestava em média aos 25 (variando de 13 a 42) anos de idade e progredia com um aumento do déficit neurológico, geralmente resultando em morte por pneumonia dentro de 15 anos. (Rosenberg *et al.*, 1976).

Dois anos depois, através de um estudo conduzido nas ilhas dos Açores, o qual abrangeu 40 indivíduos de 15 famílias, Coutinho e Andrade (1978) chegaram à conclusão de que tanto a família Machado quanto a Joseph padeciam do mesmo distúrbio, o qual apresenta notável pleomorfismo sintomático. Tal condição passou então a ser denominada Doença de Machado-Joseph (MJD – do inglês “*Machado-Joseph disease*”; OMIM 109150).

Já na década de 90 a mutação responsável pela MJD foi mapeada no braço longo do cromossomo 14, entre as bandas 24.3 e 32.1 (Takiyama *et al.*, 1993), primeiro em Japoneses e confirmada em açorianos (Sequeiros *et al.*, 1994). O gene foi identificado pouco depois e denominado *MJD1*, localizado na região 14q32.1 (Kawaguchi *et al.*, 1994).

Neste mesmo período se especulava sobre as possíveis mutações que ocasionariam ataxia espinocerebelar (SCA – do inglês “*Spinocerebellar ataxia*”). Apenas dois tipos eram conhecidos na época (SCA1 no braço curto do cromossomo 6 e SCA2 no braço longo do cromossomo 12) quando um terceiro locus foi determinado dentro da posição 14q24.3-qter (Stevanin *et al.*, 1994; Gispert *et al.*, 1993; Ranum *et al.*, 1991; Zoghbi *et al.*, 1991). A patologia oriunda desta mutação foi então chamada de ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3 – do inglês “*Spinocerebellar ataxia type 3*”; OMIM 109150). Mesmo sabendo que a mutação responsável por MJD estava dentro dos limites de SCA3, os autores não puderam afirmar se ambas advinham do mesmo gene (Stevanin *et al.*, 1994).

Após este longo caminho, ilustrado na figura 1, finalmente verificou-se que, apesar das diferenças clínicas, SCA3 e MJD são de fato geneticamente idênticas, com cada distúrbio representando extremos em um espectro de sintomas provenientes de uma expansão trinucleotídica CAG (CAGexp). Ainda, esta CAGexp se apresenta instável, podendo aumentar ou contrair entre gerações (ver seção 1.2.1) o que demanda cautela na correlação genótipo/fenótipo e explica a variabilidade entre as idades de início dos sintomas (ii) descritas entre as duas famílias (Haberhausen *et al.*, 1995).

Atualmente descrevemos a SCA3/MJD como o tipo mais comum e com fenótipo mais variável entre as SCAs, um grupo de distúrbios herdado de forma AD, causado pela degeneração do cerebelo e suas conexões aferentes e eferentes, bem como substância nigra e núcleos de nervos cranianos e estriado (Nóbrega *et al.*, 2012). A ii ocorre em média em torno da terceira década de vida, mais comumente com o aparecimento de ataxia de marcha, seguido de diplopia, disartria e espasticidade. Há heterogeneidade em conceituar o início da doença, pois alguns autores a definem como o tempo observado do primeiro sintoma e outros como o tempo de início da ataxia de marcha (Saute & Jardim, 2015). A doença é implacável e em poucos anos os pacientes tornam-se acamados, tendo uma sobrevivência média de 21,18 anos a partir da ii (Kieling *et al.*, 2007). No presente momento as terapias disponíveis visam apenas atenuar os sintomas, uma vez que não há cura ou tratamento disponíveis.

1.1.1. Epidemiologia

A SCA3/MJD é a forma de ataxia dominante mais comum em todo o mundo (Martins *et al.*, 2007). Contudo, a maior frequência relativa de (78.4% dentre todas as SCAs) está

presente no estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil e em Portugal (de Castilhos *et al.*, 2014), onde as taxas de prevalência foram recentemente estimadas em 7:100.000 habitantes (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020). Esta alta taxa de prevalência pode ser explicada pela história da colonização, quando no período entre 1750 a 1770 de dois a cinco mil açorianos foram enviados ao RS pela coroa portuguesa (Figura 1) devido a baixa densidade geográfica, pois apenas poucos ameríndios que viviam nesta região (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020).

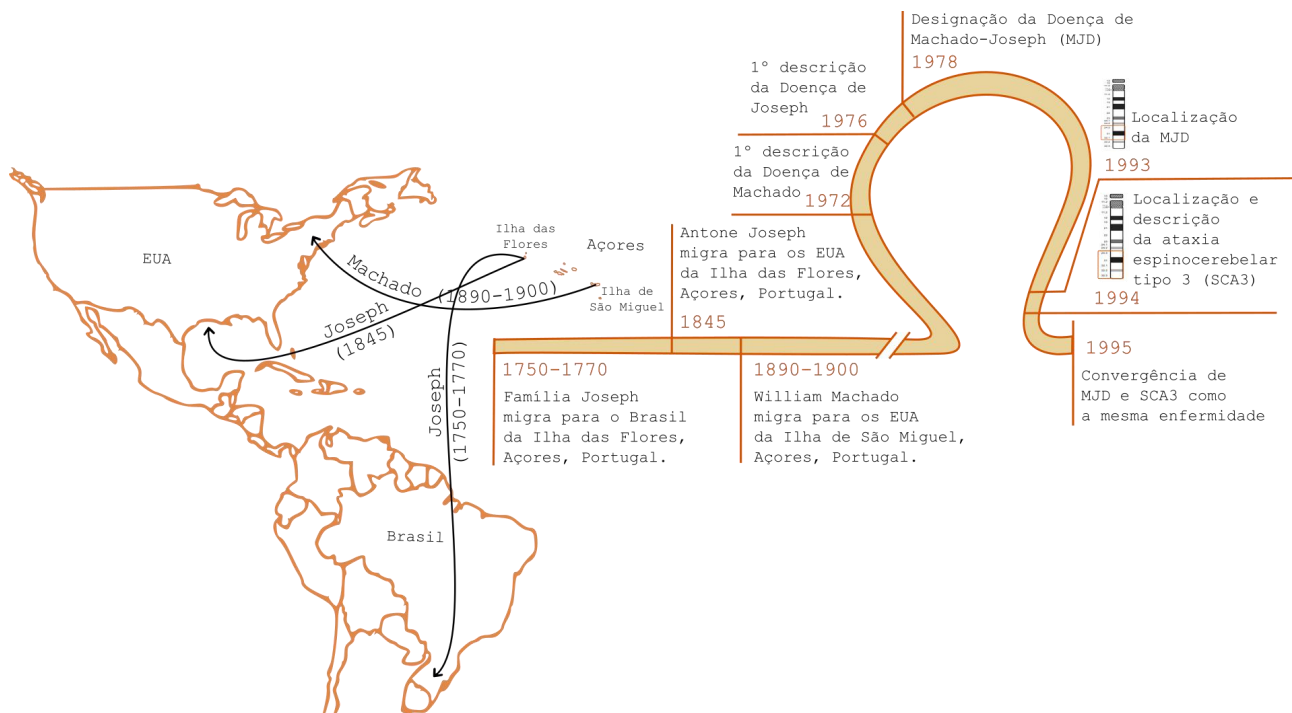


Figura 1: Histórico da SCA3/MJD. Mapa de migração da SCA3/MJD (esquerda) e Linha do tempo (direita). A curva na linha do tempo representa a sucessão do trabalho necessário para se chegar à conclusão de que SCA3/MJD são uma doença única.

A caracterização de haplótipos ancestrais ligados à mutação de SCA3/MJD tornou possível distinguir a origem e dispersão das famílias descritas originalmente. Assim sendo, por meio de três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – do inglês “*single nucleotide polymorphism*”) nas posições A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG (rs1048755), C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG (rs12895357) e TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸ (rs7158733) (Figura 2) quatro configurações haplotípicas foram encontradas em Portugal. Destas, 94% de todas as famílias com a doença possuíam ACA ou GGC. A configuração haplotípica ACA, referida à família Joseph, estaria mais concentrada na Ilha das Flores e a configuração GGC, referida à família Machado, na Ilha

de São Miguel, contudo, ambas são encontradas em Portugal continental (Martins *et al.*, 2007).

Ciente disto e com a informação de que o haplótipo ACA predomina no RS, compreende-se que a família Joseph deu origem a SCA3/MJD nesta região, através de um efeito fundador provavelmente durante a imigração açoriana. Ainda, a partir da análise de 4 sequências curtas repetidas em tandem (STR – do inglês “*short tandem repeats*”), duas delas localizadas na região 5’ ((TAT)_n e (CA)_n) e duas na região 3’ ((AC)_n e (GT)_n) do gene causador de SCA3/MJD, foi possível observar que 170 das 178 famílias carregam a extensão 11-21-ACA-14-15 (ACA H1) do haplótipo ACA (figura 2) sugerindo que 92% da linhagem residente no RS é aparentada (Rodríguez-Labrada *et al.*, 2020).

1.1.2. Etiologia

Como mencionado anteriormente, a descoberta da mutação responsável pela SCA3/MJD deu-se na década de 90 (Takiyama *et al.*, 1993; Sequeiros *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 1994). Com o passar dos anos e o avanço do conhecimento, nos dias de hoje sabe-se que a doença é ocasionada por uma expansão do trinucleotídeo CAG no éxon 10 do gene *MJD1* ou, como é mais comumente reportado, gene *ataxin 3* (*ATXN3*; OMIM 607047), encontrado mais precisamente na posição cromossômica 14q32.12 (coordenadas genômicas: GRCh38: 14:92,058,551-92,106,620) representado na figura 2.

Enquanto os alelos normais apresentam de 12 a 43 repetições, os indivíduos afetados têm pelo menos um alelo expandido com mais de 55 repetições (de Mattos *et al.*, 2018). Indivíduos com 51 repetições foram descritos com e sem a doença em populações diferentes, contudo não se tem certeza se isto pode ser atribuído a expressividade variável da mutação ou diferenças na modulação da doença por fatores modificadores (Gu *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2001).

A ii da SCA3/MJD é variável e o maior fator que a influência é o tamanho da expansão. De uma maneira geral, quanto maior a CAGexp, mais cedo iniciará a doença (Maciel *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2016). Contudo, na população brasileira, o tamanho de CAGexp contribui apenas para cerca de 55,2% da variação em ii, sendo o percentual restante pertencente a outros fatores ainda em especulação (de Mattos *et al.*, 2018). Todavia, a elucidação das condições que fazem uma pessoa apresentar mais precoce ou mais tardiamente os sintomas é de extrema importância, pois em posse deste conhecimento

laranja na sequência de DNA e no transcrito representam as junções éxon-éxon; Texto em negrito mostra as repetições CAG; Texto em azul mostra as interrupções na repetição CAG. Esquema foi baseado em Kawaguchi *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2007; com distanciamento e junções éxon-éxon atualizadas pelo Ensembl Human Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>), com base no transcrito *ATXN3-214*.

Correlações positivas para ii também foram observadas entre irmãos, pares avunculares e primos de primeiro grau e, da mesma forma que efeitos populacionais, os efeitos familiares também podem ser genéticos ou ambientais, visto que famílias compartilham de ambos (DeStefano *et al.*, 1996) .

1.1.3. Modificadores de fenótipo

Apenas alguns fatores conhecidos atuam na modulação de SCA3/MJD e, mesmo quando combinados com CAGexp, têm um alcance de apenas 73,5% da variação da ii (de Mattos *et al.*, 2018).

O modificador de fenótipo mais promissor relatado até o momento consiste na presença de alelos intermediários (27–33 repetições CAG) de *ATXN2* (Tezenas du Montcel *et al.*, 2014). Se este efeito modulador está diretamente relacionado ao CAGexp ou ligado a outra variante genética, ainda não se sabe. Entretanto, várias observações suportam um papel biologicamente significativo para *ATXN2* e/ou sua proteína ataxina-2 normal em doenças neurodegenerativas, como por exemplo, o risco aumentado de desenvolver esclerose lateral amiotrófica (ALS – do inglês “*Amyotrophic lateral sclerosis*”; OMIM 105400) em pacientes com alelos intermediários (Elden *et al.*, 2010); paralisia supranuclear progressiva (PSP – do inglês “*Progressive supranuclear palsy*”; OMIM 601104) em portadores de alelos maiores de 30 repetições (Ross *et al.*, 2011) ou demência frontotemporal (FTD – do inglês “*Frontotemporal dementia*”; OMIM 600274) quando os alelos contêm 29 repetições ou mais (Lattante *et al.*, 2014).

Ainda, foram detectados níveis mais baixos de ataxina-2 em cérebros de pacientes com SCA3/MJD e camundongos transgênicos em comparação com controles saudáveis, ao mesmo tempo que, a restauração dos níveis desta proteína em camundongos afetados levou a melhorias morfológicas e comportamentais significativas (Nóbrega *et al.*, 2015). Por último, foi demonstrada a ação de um SNP (rs7969300) em *ATXN2*, fora do trato CAG, na modulação de ii em pacientes chineses com SCA3/MJD (Ding *et al.*, 2016).

Segundo de Mattos e colaboradores (2018) há diferenças geográficas/étnicas claras sobre o efeito de CAGexp em ii. Os autores inferem que uma correlação universal pode não ser aplicável a todas as populações de portadores pois observaram que a população brasileira tem, em média, CAGexp maiores relacionados com uma manifestação mais tardia de SCA3/MJD quando comparado com outras populações. Se este fato está relacionado com herança genética ou fatores ambientais, ainda não está claro.

1.1.4. Patogenicidade

A CAGexp se reflete a nível proteico com ganho de aminoácidos glutamina na ataxina-3, o que caracteriza SCA3/MJD como uma desordem de expansão de poliglutamina (poliQ), ou poliglutaminopatia, comum a outras doenças como atrofia muscular bulbo-espinhal (SBMA – do inglês “*Spinal-Bulbar Muscular Atrophy*”; OMIM 313200), atrofia dentatorubro-palidoluisiana (DRPLA – do inglês “*Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*”; OMIM 125370), doença de Huntington (HD – do inglês “*Huntington disease*”; OMIM 143100) e outras cinco SCAs (SCA1, SCA2, SCA6, SCA7 e SCA17) além de SCA3/MJD (Gardiner *et al.*, 2019; Schöls *et al.*, 2004; Zijlstra *et al.*, 2010; Massey & Jones, 2018). Surpreendentemente, todas essas doenças têm pelo menos algum elemento de disfunção neurológica, o que sugere uma necessidade específica da regulação destas repetições trinucleotídicas no sistema nervoso central (SNC) (Orr & Zoghbi, 2007). Em tempo, a HD é a poliQ mais estudada e será bastante citada por apresentar mais dados na literatura.

As características neuropatológicas de SCA3/MJD envolvem sistemas cerebelares, bem como substância nigra, núcleos de nervos cranianos e estriado. No cerebelo, o comprometimento severo do núcleo dentado (DN – do inglês “*dentate nucleus*”) é consenso, enquanto a perda de células de Purkinje é controversa. De qualquer forma, sabe-se que a maioria das células de Purkinje projetam seus axônios para o DN (Rüb *et al.*, 2008).

Ataxina-3 é uma deubiquitinase que tem um papel neuroprotetor mediado por sua regulação da autofagia (Ashkenazi *et al.*, 2017). As proteínas mutantes são propensas à formação de agregados intraneurais e, quando transportadas para o núcleo, podem causar neurotoxicidade cerebelar e ataxia provavelmente devido a indução de repressão

transcricional (Chou *et al.*, 2014) e/ou prejuízo da homeostasia celular (Orr, 2012; Massey e Jones, 2018).

O principal mecanismo de formação de agregados relatado envolve a clivagem da ataxina-3 mutante pela calpaína por meio do influxo de cálcio (Ca^{2+}) que sucede à estimulação por glutamato (Koch *et al.*, 2011). Há evidências de que a ataxina-3 mutante prejudica a indução da depressão cerebelar de longa duração (LTD – do inglês “*long-term depression*”), um tipo de mecanismo sináptico considerado crítico para o aprendizado motor. LTD também é regulado pelo glutamato e influxo de Ca^{2+} (Chou *et al.*, 2014).

Embora ataxina-3 seja ubiquamente expressa, a formação de agregados não é notada em todas as células. Fibroblastos epiteliais, por exemplo, não apresentam níveis detectáveis de agregados poliQ, apesar do fato de expressarem níveis apreciáveis do alelo *ATXN3* contendo CAGexp. Isto é atribuído ao fato de que sistemas de controle de qualidade de proteínas (PQC – do inglês “*Protein Quality Control*”) ainda são capazes de lidar com a proteína mutada nestas células, e/ou ao fato de que fibroblastos sofrem divisão rápida, onde proteínas malformadas são distribuídas entre as células mãe e filha antes da produção dos agregados, atuando como um fator de diluição. Ainda assim, não é claro o que provoca a vulnerabilidade neuronal seletiva em SCA3/MJD (Martinez-Vicente & Cuervo, 2007; Zijlstra *et al.*, 2010).

A distinção entre os mecanismos que atuam em diferentes doenças causadas por aumentos semelhantes de trinucleotídeos e o estudo dos mecanismos de instabilidade e fragilidade destes têm sido particularmente valiosos em fornecer considerações sobre como vias de proteção do genoma normalmente podem falhar, levando a alterações e a manifestação da doença (Pacheco *et al.*, 2013).

1.2. Estabilidade do DNA

1.2.1. Antecipação genética

Repetições CAGexp têm propensão a se expandirem em células da linha germinativa (espermatozóides ou ovócitos) (Igarashi *et al.*, 1996). Foi visto que este fenômeno é mais proeminente na transmissão paterna e, dado que o comprimento da repetição se correlaciona inversamente com a idade no início da doença, essa propensão intergeracional à expansão do CAGexp explica a observação fenotípica da antecipação, segundo a qual o

início da doença tende a ocorrer mais cedo nas gerações subsequentes (Durr, 2010; Martins *et al.*, 2014; Zijlstra *et al.*, 2010; Klockgether *et al.*, 2019).

Esse viés paterno é frequentemente atribuído ao aumento do número de divisões mitóticas que precedem a gametogênese masculina, mas também pode ser em consequência de alterações na atividade e concentração de proteínas de reparo do DNA (Durr, 2010). Análises mostraram que mosaicismos somáticos significativos estão presentes no esperma de homens com HD e, sugere-se que um fator independente ao causador da doença está envolvido com mudanças no padrão da transmissão (Telenius *et al.*, 1995). Evidências de um modelo de camundongo transgênico, também em HD (R6/1) sugerem que a expansão do CAGexp dos espermatozoides ocorre no amadurecimento após a meiose (Kovtun & McMurray, 2001). Isso implica que o reparo ao invés da replicação do DNA está envolvido na geração da síntese de DNA necessária para a expansão da CAGexp (Massey & Jones, 2018).

Cientes desta instabilidade nas repetições e intrigados com o fato de o tamanho da expansão não definir com precisão a idade, uma hipótese de mosaicismos somáticos do trato CAGexp como modulador da doença foi proposta (Gomes-Pereira *et al.*, 2014). Afinal, se as células tendem a expandir ainda mais a CAGexp durante a vida de um indivíduo, espera-se que este manifeste a doença precocemente, ao passo que se o trato CAGexp contrair, este indivíduo apresentaria a doença mais tardiamente. Será que a regulação ou proporção entre células contendo expansões ou contrações são elementos determinantes na morte celular?

Aqui vale ressaltar que, no caso de repetições em tandem as desordens no sistema de reparo podem influenciar na manutenção do tamanho destes genes, resultando no mosaicismos somáticos do trato CAG. Aumento de CAGexp foi visualizado em fibroblastos humanos de pacientes com HD durante passagens celulares, entretanto, quando expostas a dano oxidativo houve aumento devido, segundo os autores, ao reparo de quebras de fita dupla do DNA (Kovtun *et al.*, 2007).

Além disso, aumento de dano de DNA foi detectado em linfócitos de pacientes com SCA3/MJD em relação a um grupo controle, através do ensaio Cometa. Os autores remetem esse aumento ao desbalanço na degradação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e apesar de reconhecerem que este estudo não comprova que semelhante dano ocorra no

cerebelo, concluem que um estresse oxidativo sistêmico pode estar ocorrendo nos pacientes (Pacheco *et al.*, 2013).

Expansões somáticas foram descritas em poliQ de uma maneira tecido-específica (Møllersen *et al.*, 2010; Silva-Fernandes *et al.*, 2010), chegando a ganhos de até 1000 repetições em células do corpo estriado (região do cérebro mais afetada pela doença) em um indivíduo com HD (Kennedy *et al.*, 2003). Apesar de tenderem à expansão, a maioria dos estudos no cérebro humano foi realizada antes da aplicação de metodologias mais sensíveis para determinar o comprimento da repetição e os resultados relativos à SCA3/MJD não são tão precisos (Muñoz *et al.*, 2002; Cancel *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 1997).

Modelos animais de SCA3/MJD mostram grande aumento da CAG_{exp} no cérebro e, especificamente, em neurônios pós-mitóticos (Silva-Fernandes *et al.*, 2010). Uma vez que neurônios cessam sua proliferação*, presume-se que mecanismos não replicativos de expansão são mais aptos a explicar muitas expansões somáticas (Usdin *et al.*, 2015). No cérebro, a divisão de células gliais mostra evidências de instabilidade de CAG contínua, *in situ* e em cultura (Watanabe *et al.*, 2000; Claassen & Lahue, 2007).

1.2.2. Integridade do DNA

Estima-se que algo entre mil e milhões de lesões ocorram por dia no DNA em todas as células humanas (Mani & Chinnaiyan, 2010). As causas destes danos ao DNA se estendem de agentes externos, como: radiação ionizante ou ultravioleta (UV), produtos químicos ou drogas; a fontes internas, como: espécies reativas de oxigênio (EROs) e erros no metabolismo do DNA (transcrição e replicação), os quais, por si só, contribuem consideravelmente para a carga de danos no DNA de uma célula (Bohlander & Kakadia, 2015).

De uma forma geral, os danos se apresentam através de quebras de cadeia simples (SSBs – do inglês “*single strand breaks*”) ou de cadeia dupla de DNA (DSBs – do inglês “*double strand breaks*”) e a incapacidade para reparar adequadamente SSBs podem resultar em DSBs (Bohlander & Kakadia, 2015).

* Não completamente, pois conjectura-se que a neurogênese está ligada a determinadas áreas do cérebro, como o hipocampo, área responsável pelo aprendizado, memória e comportamento afetivo. Contudo, não é conhecido o número preciso de neurônios gerados por dia (Steiner *et al.* 2019).

Além disso, as altas demandas de oxigênio (O₂) do cérebro (20% do consumo total de oxigênio no corpo, com apenas 2% da massa corporal) expõem suas células a inúmeras EROs produzidas pela respiração mitocondrial normal (Massey & Jones, 2018). Interessantemente, a chaperona HspB5 (também conhecida por alfa-B cristalina) impede a geração de EROs em mitocôndrias no cérebro, fato comprovado em um modelo animal. Neste experimento, os autores determinaram o sinal de EROs na presença de diferentes concentrações de HspB5. Os dados revelaram que a geração de EROs, causada pela antimicina A na presença de malato e glutamato, foi inibida significativamente pela aplicação de 50 mg/ml de HspB5 (Zhu *et al.*, 2015).

Ao mesmo tempo, a deficiência de micronutrientes (ácido fólico, vitamina B12, B6, niacina, C, E, ferro e zinco) pode mimetizar danos químicos ou de radiação causando quebras de cadeia simples e dupla ou ambas (Ames, 2001). Quando relacionadas à radiação ionizante, DSBs são ocasionados principalmente pelo ataque de radicais livres gerados pela ionização da água. As DSBs também ocorrem de forma endógena, no processo de recombinação meiótica mediada pela proteína específica para esporulação 11 (Spo11 – do inglês “*sporulation-specific protein 11*”) e transcrição pela topoisomerase tipo 2 (TOP2 – do inglês “*topoisomerase II*”) (Zhu *et al.*, 2019).

Por outro lado, as SSBs diretas são lesões "não programadas" e várias das ataxias que exibem degeneração limitada ao SNC são causadas por mutações nos genes de reparo de SSBs, sugerindo que o SNC pode ser excepcionalmente vulnerável a interrupções no reparo de quebras de cadeia simples (Caldecott, 2003; Massey & Jones, 2018).

Ademais, nem todas as sequências de DNA são iguais em sua contribuição para a integridade genômica. Algumas conformações estruturais alternativas são mais propensas a quebras e “escorregões” da polimerase e, com isso, induzem instabilidade genética e mutagênese, além de interferir em processos celulares normais, como a transcrição (Zaytseva & Quinn, 2018; Massey & Jones, 2018). Estas, ao invés de adotar o padrão de dupla hélice de Watson-Crick (estrutura-B), adotam estruturas de DNA não-B, pelo menos transitoriamente, as quais incluem *hairpins*, *R-loops*, Z-DNA, DNA cruciforme, H-DNA (tríplice) e tetrâmeros de DNA (Wells, 2007).

Repetições em tandem (tanto de trinucleotídeos como de unidades maiores) são mais propensas a formação de estruturas não-B. Para a repetição CAG/CTG, ambos podem formar *hairpins* (Figura 3A), sendo CTG mais estável do que CAG (Gacy *et al.*, 1995). O

Vários fatores *cis* e *trans* podem afetar a estabilidade das repetições CAG no genoma. Os fatores *cis* incluem o comprimento da repetição CAG, a presença de interrupções intercaladas nas repetições (figura 2 - texto em azul), haplótipos e o contexto genômico. Como mencionado anteriormente, repetições mais longas, principalmente aquelas acima do limiar causador da doença, são mais instáveis e tendem a se expandir. Contudo, quando há interrupções intercaladas a essas repetições. Esses efeitos podem ser atenuados por reduzir a estabilidade de *hairpins* (Usdin *et al.*, 2015; Massey & Jones, 2018).

A geração e a persistência das lesões do DNA no genoma humano podem levar a mutagênese, instabilidade genética e câncer (Zhu *et al.*, 2019; Dworaczek & Xiao, 2007). Para manter a fidelidade do genoma, as células desenvolveram mecanismos complexos, iniciadas por enzimas específicas e seguidas de vias de sinalização. Estas vias são chamadas coletivamente de resposta ao dano de DNA (DDR – do inglês “*DNA damage response*”) e garantem o reparo apropriado para cada tipo diferente de lesão (Jackson & Bartek, 2009; Iyama & Wilson, 2013). O controle rígido do reparo do DNA é crucial para manter a expressão e função dos neurônios. De fato, muitas doenças neurológicas mendelianas (algumas delas descritas na seção 1.3.1) resultam diretamente de defeitos na resposta a danos no DNA (Madabhushi *et al.*, 2015).

1.3. Mecanismos de Reparo de DNA

As vias de reparo de DNA são específicas para cada tipo de lesão e suas as proteínas que integram essas vias são recrutadas de acordo com a necessidade. Um dos primeiros sensores de respostas a danos no DNA é o complexo MRN, formado pelas proteínas de reparo de quebra de cadeia dupla RAD50 (RAD50 – do inglês “*RAD50 double strand break repair protein*”) e MRE11 (MRE11 – do inglês “*double-strand break repair protein MRE11*”) e nibrina (NBS – do inglês “*nibrin*”). Este complexo é ativado em resposta a DSB, colapso na forquilha de replicação, disfunção de telômeros e invasão viral. A estrutura MRN pode ser separada em "cabeça", "bobina", “gancho” e regiões adaptadoras. A região da cabeça consiste em duas proteínas RAD50 e duas nucleases MRE11, formando o mecanismo central do processamento que retira as extremidades do DNA para gerar DNA de fita simples na extremidade 3', necessária para posterior reparo. A NBS1 forma o domínio "adaptador" de MRN e atua como um regulador e módulo de recrutamento de proteínas, ligando-se a ambas proteínas ataxia telangiectasia mutada (ATM – do inglês

“*ataxia-telangiectasia mutated*”) e relacionada ao Rad3 (ATR – do inglês “*ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein*”) as quais, por sua vez, orquestram cascatas de sinalização para manutenção da integridade genômica (Bian *et al.*, 2019).

Centenas de proteínas alvo a jusante são fosforiladas nos motivos Ser/Thr-Gln (S/TQ) por ATM ou ATR ativados e contribuem para uma grande rede de processos celulares especificamente envolvidos no DDR. Em contraste com ATM que responde principalmente a DSBs, ATR é ativado por uma gama muito mais ampla de estresses genotóxicos e, enquanto ATR fosforila muitos dos mesmos substratos que ATM, também pode ter alvos únicos - particularmente aqueles que funcionam em vias conectadas ao reparo de forquilhas de replicação como a via da anemia de Fanconi (FA – do inglês “*Fanconi anemia*”), por exemplo (Blackford & Jackson, 2017).

Assim sendo, com relação ao reparo de DSBs, há apenas duas vias a seguir e elas se diferenciam quanto à dependência de homologia. A união de extremidades não homólogas (NHEJ – do inglês “*non-homologous end-joining*”), apenas une as extremidades livres, levando a deleção ou inserção de alguns pares de base, dependendo da compatibilidade requerida para efetuar a ligação das fitas danificadas. A NHEJ deve se adaptar a divergências estruturais nas extremidades danificadas e, para isto, requer um motivo estrutural específico da ligase 4 (LIG4), o qual medeia o alinhamento destas extremidades (Conlin *et al.*, 2017).

Em contrapartida, a recombinação homóloga (HR – do inglês “*homologous recombination*”) é um reparo crítico de DBS, particularmente ativa na fase G1-S do ciclo celular, em que uma fita simples danificada invade a fita dupla do cromossomo homólogo ou cromátide irmã (caso esta esteja disponível) a procura de um molde para guiar um reparo mais confiável do DNA, formando uma estrutura conhecida como *D-loop*. Neste processo, a proteína recombinase RAD51 (RAD51 – do inglês “*RAD51 Recombinase*”) forma um complexo que se associa a co-fatores adicionais para mediar este reparo, fazendo com que este seja mais fidedigno (Sinha *et al.*, 2020). No entanto, caso a fita molde pertença ao cromossomo homólogo, esta ação pode resultar em perda de heterozigidade, ou em recombinação homóloga não alélica (NAHR – do inglês “*nonallelic homologous recombination*”), no caso da região danificada se assemelhar a qualquer outra que não o alelo correspondente (Curral *et al.*, 2013).

SSBs têm uma gama maior de sistemas de reparo disponíveis, são eles: reparo por excisão de base (BER – do inglês “*base excision repair*”); reparo de bases mal pareadas (MMR – do inglês “*mismatch repair*”); reparo por excisão de nucleotídeos (NER – do inglês “*nucleotide excision repair*”) e reparo direto (DR – do inglês “*direct repair*”).

O BER é a principal via de reparo das bases apurínicas, e de DNA quimicamente modificadas. Como exemplo, temos a uracila genômica, resultante da incorporação de uma uracila ao invés de uma timina durante a replicação, originando um pareamento U:A; ou desaminação da citosina, derivando um pareamento U:G. O reconhecimento destas bases apurpunicas é alcançado pelas poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1 – do inglês “*poly(ADP-ribose) polymerase 1*” ou PARP-2 – do inglês “*poly(ADP-ribose) polymerase 2*”). As PARP podem desempenhar uma série de funções nos locais de quebra (como de quebras associadas à topoisomerase), incluindo o recrutamento ou estímulo de outras enzimas de reparo, modulando a estrutura da cromatina e inibindo a recombinação indesejada (Caldecott, 2003; Kong *et al.*, 2020). A proteína uracil DNA glicosilase 1 (UNG1 – do inglês “*uracil-DNA glycosylase 1*”) é responsável pela maior parte da atividade de excisão de uracila de DNA, preferencialmente no processamento de regiões de ssDNA (Sarno *et al.*, 2019).

O MMR está normalmente envolvido no reparo de mal-pareamentos entre bases ou inserções/deleções das mesmas, extrai e corrige as bases danificadas ou o trecho onde elas se encontram (Bohlander & Kakadia, 2015; Usdin *et al.*, 2015), nesta via a proteína homóloga de MutS 6 (MSH6 – do inglês “*MutS Homolog 6*”) está envolvida no reparo de incompatibilidades de base única e curvas de inserção-deleção (formados a partir do DNA extra na fita maior). Contudo, MSH6 não é absolutamente necessária para a atividade do MMR, pois, na falta desta, a proteína homóloga de MutS 3 (MSH3 – do inglês “*MutS Homolog 3*”) pode substituir parcialmente a função de reparo (Mahalingam, 2017).

O NER, por sua vez, resolve numerosas lesões de DNA, particularmente modificações de bases que distorcem a estrutura helicoidal normal do DNA, como os dímeros de pirimidina, induzidos por UV e H₂O₂ (Iyama & Wilson, 2013). Há fortes evidências que uma função de reconhecimento destes danos seja feita pela proteína Xeroderma Pigmentosum grupo complementar A (XPA – do inglês “*Xeroderma Pigmentosum, complementation group A*”) durante as etapas iniciais do NER, e que esta também tenha uma função estrutural durante as etapas posteriores (Kong *et al.*, 2020).

Não há muito o que detalhar sobre o DR, apenas que ele retira grupos metil (O-6-metilguanina) através da proteína O-6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) (Curtin, 2012).

As principais proteínas operantes dos sistemas de reparo estão listadas na figura 4. As proteínas mais pertinentes para esta tese se encontram em negrito e, as não mencionadas nesta seção, serão ressaltadas nas seções que seguem.

1.3.1. Reparo de DNA e doenças neurodegenerativas

O DNA danificado ou reparado incorretamente pode se tornar oncogênico, ativar vias pró-apoptóticas ou induzir senescência celular (Jackson & Bartek, 2009; Iyama & Wilson., 2013). O aumento do acúmulo de DNA danificado nos neurônios é característico do envelhecimento normal, mas também é uma característica fundamental de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a HD (Madabhushi *et al.*, 2015; McLoughlin *et al.*, 2020).

Múltiplas ataxias herdadas são causadas diretamente por mutações nos genes que codificam as principais proteínas de reparo de danos ao DNA (McLoughlin *et al.*, 2020). Por exemplo, a ataxia-telangiectasia (AT – do inglês “*ataxia-telangiectasia*”; OMIM 208900), é uma doença que afeta o SNC e os tecidos periféricos, causada por mutações em ATM, a qual, como mencionado anteriormente, é responsável pelo reconhecimento das DSBs, parada do ciclo celular e fosforilação das proteínas necessárias para o reparo de DNA (Rothblum-Oviatt *et al.*, 2016).

Compartilhando de vários fenótipos neurológicos semelhantes, outra ataxia autossômica recessiva (AR), conhecida como ataxia com apraxia oculomotora tipo 1 (AOA1 – do inglês “*Ataxia-oculomotor apraxia type 1*”; OMIM 208920), também é causada por mutações em um gene de reparo do DNA, a aprataxina (*APTX* – do inglês “*aprataxin*”) (Caldecott, 2003). A proteína aprataxina é responsável por reverter a adenilação do DNA, a qual, se acumulada, causa degeneração do cerebelo (Tumbale *et al.*, 2013).

Assim como AOA1, a ataxia com apraxia oculomotora tipo 2 (AOA2 – do inglês “*Ataxia-oculomotor apraxia type 2*”; OMIM 606002) é decorrente de mutações em um gene de reparo. Neste caso o gene em questão se chama senataxina (*SETX* – do inglês “*senataxin*”), o qual codifica uma helicase que atua em uma grande variedade de processos

biológicos, desde o término da transcrição até a conclusão da meiose e manutenção da integridade genômica com atividade na resolução de *R-loops* (Cohen *et al.*, 2018). Mutações em *SEXT* também estão relacionadas com o desenvolvimento de uma forma juvenil de ALS. Demais proteínas vinculadas à ALS são a proteína de ligação de DNA transativa 43 (TDP-43 – do inglês “*transactive DNA-binding protein 43*”) e a proteína fusionada em sarcoma (FUS – do inglês “*Fused in sarcoma*”), ambas helicases que, assim como SETX, atuam na resolução de *R-loops*, dentre uma ampla gama de funções, a maioria das quais envolve a transcrição e processamento de RNA (Hill *et al.*, 2016) e, assim como as poliQ, tendem a formar agregados (Birsa *et al.*, 2020).

Outro exemplo concerne a mutação da proteína tirosil-DNA fosfodiesterase 1 (TDP1 – do inglês “*tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*”), que repara SSBs criadas pela topoisomerase tipo 1 (TOP1 – do inglês “*topoisomerase I*”) e está associada à ataxia espinocerebelar com neuropatia axonal (SCAN1 – do inglês “*Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1*”; OMIM 607250). A associação de uma proteína de reparo do DNA ao SCAN1 é impressionante, pois esta é uma doença caracterizada pela neurodegeneração, que não possui características extra neurológicas óbvias, como instabilidade genética ou câncer (Caldecott, 2003).

As topoisomerasas podem introduzir SSBs (TOP1) ou DSBs (TOP2) temporárias a fim de regular o superenrolamento do DNA e são essenciais para a expressão de genes longos. Isto faz com que elas sejam particularmente importantes no cérebro, onde os genes expressos são mais longos do que em outros lugares do corpo (King *et al.*, 2013; Massey & Jones, 2018). As mutações da TOP podem levar a várias condições neurodesenvolvimentais e neurodegenerativas, destacando a importância da regulação torcional do DNA na função cerebral (King *et al.*, 2013; McKinnon, 2016).

Há muito tempo que se observa a importância de um reparo preciso e oportuno do DNA no cerebelo, uma vez que mutações em enzimas, como a aprataxina e a tirosil-DNA fosfodiesterase 1, levam especificamente à neurodegeneração cerebelar (Ward & La Spada, 2015).

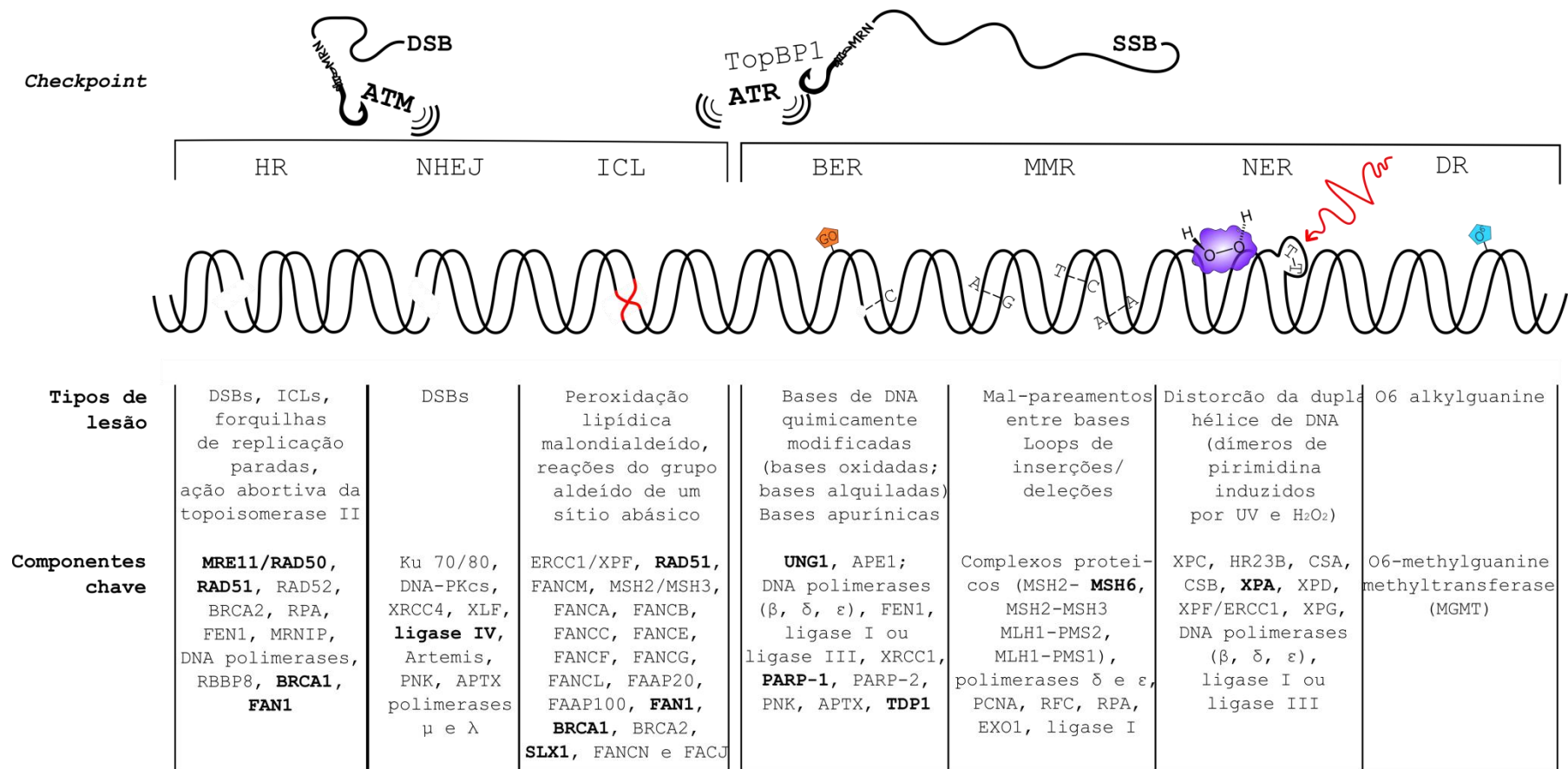


Figura 4: Vias de reparo de DNA. Ilustração das principais vias de reparo de quebras de fita dupla (DSBs) e simples (SSBs) de DNA. HR = Recombinação homóloga; NHEJ = União das extremidades homólogas; BER = Reparo por excisão de base; MMR = Reparo de bases mal emparelhadas; NER = Reparo por excisão de nucleotídeos; DR = Reparo direto. Os tipos de lesão reparados por cara via estão especificados dentro das caixas correspondentes, bem como as principais proteínas envolvidas no reparo. Siglas usadas estão definidas na lista de abreviaturas, símbolos e unidades (p.6) Destacadas em negrito estão as proteínas estudadas neste trabalho.

Muitas das mutações em proteínas de reparo do DNA estão envolvidas na biologia do câncer, algumas delas inclusive identificadas como a causa da predisposição ao câncer (Curtin, 2012). Neste cenário, variações de sequências que alterassem a atividade de reparo do DNA, em geral, fariam com que observássemos um risco maior de suscetibilidade ao câncer em pacientes com SCA3/MJD. Ao contrário, verificou-se que estes pacientes apresentam uma menor incidência e morte em decorrência de câncer (Souza *et al.*, 2017). Portanto, a hipótese relativa ao reparo de DNA aponta para um mecanismo mais restrito, onde as variações analisadas podem alterar a interação da proteína de reparo com o locus *ATXN3*, resultando em diferentes padrões de instabilidade (Martins *et al.*, 2014). Contudo, uma vez que muitos dos genes que contêm repetições patogênicas de CAG codificam proteínas que têm papel na DDR, é possível que expansões repetidas prejudiquem vias de reparo específicas (Massey & Jones, 2018).

1.3.2. Reparo de DNA e SCA3/MJD

Em 2015 um estudo sugeriu que vias de reparos de DNA operariam como um mecanismo patogênico comum entre poliQs, modulando a idade de início dos sintomas. Neste trabalho, foi demonstrado um atraso de 2,156 anos na ii do primeiro sintoma de indivíduos europeus com SCA3/MJD portadores do alelo C na variante rs3512 (Bettencourt *et al.*, 2016). A mesma variante havia sido correlacionada com um atraso de 1,31 anos na ii de sinais motores em pacientes em HD, também com ancestralidade europeia (Genetics Modifiers of Huntington's Disease [GeM-HD] Consortium 2015). Porém, um terceiro estudo realizado em uma coorte chinesa não encontrou associação desta variante (Wang *et al.*, 2018). Este fato demonstra disparidades de resultados e valida a necessidade de confirmação dos resultados em diferentes populações.

A variante rs3512 está localizada em uma região compartilhada por dois genes e é encontrada na região intrônica da proteína 10 relacionada à miotubularina (*MTMR10* – do inglês “myotubularin-related protein 10”) e na região 3’UTR do gene [endo] nuclease 1 associada à FANCD1/FANCD2 (*FANCD1* – do inglês “Fanconi anemia FANCD1/FANCD2-associated [endo]nuclease 1”) (Bettencourt *et al.*, 2016).

Não se tem conhecimento sobre a ação da proteína 10 relacionada à miotubularina. Entretanto, espera-se que como outros membros da família relacionados à miotubularina,

este heterodimerize uma subunidade de fosfatase ativa para atuar nos fosfatos de fosfatidilinositol (Hnia *et al.*, 2012).

Em contrapartida, sabe-se que FAN1 atua como uma endo/exonuclease de DNA, recrutada em forquilhas de replicação estagnadas e locais de dano ocasionado pelas ligações cruzadas entre cadeias de DNA (ICL – do inglês “*interstrand crosslink*”). Os ICL são formados naturalmente nas células de duas maneiras: (1) por meio de reações com produtos químicos endógenos, como o produto de peroxidação lipídica malondialdeído, ou (2) por meio de reações do grupo aldeído de um sítio abásico com uma base normal na fita oposta. Várias endonucleases foram propostas para realizar a incisão do ICL, dentre elas, além de FAN1, encontra-se a subunidade de endonuclease específica da estrutura (SLX1 – do inglês “*structure-specific endonuclease subunit*”) (Wilson *et al.*, 2017).

A FAN1 interage com as proteínas dos grupos 1 e 2D (FANCI – do inglês “*Fanconi Anemia complementation group I*” e FANCD2 – do inglês “*Fanconi Anemia complementation group D2*”) no complexo central da via FA (Lachaud *et al.*, 2016; Smogorzewska *et al.*, 2010). Até o momento, 22 genes foram identificados pertencentes a via FA, dentre eles, resalto o gene do câncer de mama 1 (*BRCA-1* – do inglês “*breast cancer 1 gene*”) e 2 (*BRCA-2* – do inglês “*breast cancer 2 gene*”), conhecidos nesta via por *FANCS* e *FANCD1*, respectivamente (Milletti *et al.*, 2020).

A diversa atividade de nuclease de FAN1 implica que esta pode participar de vários eventos diferentes no reparo do DNA, como desengatar ICL, aparar os oligonucleotídeos soltos e efetuar a incisão em *D-loop* durante a recombinação homóloga (Jin & Cho, 2017). Além disso, a via da FA protege a integridade genômica através da resolução de *R-loops* (García-Rubio *et al.*, 2015).

É provável que a FAN1 desempenhe um papel fundamental em uma rede de proteínas da DDR. Os resultados em um trabalho recentemente publicado insinuam ligações de FAN1 na repetição CAG ou muito perto dela, possivelmente reconhecendo conformações incomuns formadas por esse tipo de sequência. No mesmo estudo eles ainda observaram que a inativação da atividade de nuclease de FAN1 não prejudicou sua capacidade de estabilizar a repetição de CAG, o que é incomum, pois na biologia da FAN1 todas as funções identificadas até o momento dependem desta atividade de nuclease. Deste modo, os autores sugerem que uma nova atividade da FAN1 está regulando a estabilidade do CAG e que, dado o grande tamanho do efeito do nível de proteína encontrado, essas

alterações são provavelmente devidas a diferenças na expressão de FAN1, em vez de alteração na função intrínseca da proteína (Goold *et al.*, 2019).

Este dado reforça o papel do polimorfismo rs3512, uma vez que a região 3'UTR também é caracterizada por estruturas secundárias que desempenham um papel importante na interação dos mRNAs com as proteínas associadas. Uma perturbação nessas estruturas devido a uma mudança inerente na sequência altera sua interação com estas proteínas, influenciando na tradução, localização e estabilidade do mRNA (Chatterjee & Pal, 2009).

Normalmente a FAN1 é altamente expressa no cérebro e, quando esgotada, causa defeitos no reparo das ICLs e instabilidade do genoma (Goold *et al.*, 2019; MacKay *et al.*, 2010). O papel de FAN1 na patogênese de poliQs ainda não está bem definido. Contudo, ele se destaca, entre outros componentes, na via de expansão e/ou a integridade da sequência CAGexp e é posta como um dos possíveis alvos terapêuticos (Ciosi *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é relacionar o papel do sistema de reparo de DNA em poliglutaminopatias, especialmente na SCA3/MJD, e seu eventual efeito na idade de início da doença.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto são:

- » Avaliar a estabilidade das repetições CAG em cultura primária de fibroblastos de paciente com SCA3/MJD antes e após a indução de dano por peróxido de hidrogênio;
- » Avaliar o polimorfismo rs3512 em pacientes com SCA3/MJD e sua influência sobre a idade de início da doença nestes pacientes;
- » Avaliar o efeito combinado do polimorfismo rs3512 com o comprimento da repetição CAG no gene *ATXN2* sobre a idade de início da doença em pacientes com SCA3/MJD;
- » Avaliar a possível ação de variações de sequência nos genes que codificam as topoisomerase 1 e 2 sobre a idade de início de pacientes com SCA3/MJD;
- » Avaliar o efeito combinado das variações de sequência avaliadas com o tamanho de *ATXN2* sobre a idade de início de pacientes com SCA3/MJD.
- » Avaliar o efeito combinado das variações de sequência avaliadas com o tamanho de *ATXN2* e com o polimorfismo rs3512 sobre a idade de início de pacientes com SCA3/MJD.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em forma dos artigos científicos cada um compondo um capítulo conforme estão descritos abaixo:

Capítulo 1 – Artigo: “*New insight on somatic mosaicism of CAG length in Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph Disease*”

Capítulo 2 – Artigo: “*Variation in DNA Repair System Gene as an Additional Modifier of Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado–Joseph Disease*”

Capítulo 3 – Artigo: “*Evaluating a possible role of sequence variations in genes coding for topoisomerases on age of onset of SCA3/MJD patients*”

REFERÊNCIAS

Ames BN (2001) DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 475:7–20.

Ashkenazi A, Bento CF, Ricketts T, Vicinanza M, Siddiqi F, Pavel M, Squitieri F, Hardenberg MC, Imarisio S, Menzies FM, et al. (2017) Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature* 545(7652):108–111.

Belotserkovskii BP, Liu R, Tornaletti S, Krasilnikova MM, Mirkin SM and Hanawalt PC (2010) Mechanisms and implications of transcription blockage by guanine-rich DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(29):12816–12821.

Belotserkovskii BP, Mirkin SM and Hanawalt PC (2013) DNA sequences that interfere with transcription: implications for genome function and stability. *Chem Rev* 113(11):8620–8637.

Bettencourt C, Hensman-Moss D, Flower M, Wiethoff S, Brice A, Goizet C, Stevanin G, Koutsis G, Karadima G, Panas M, et al. (2016) DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol* 79(6):983–990.

Bian L, Meng Y, Zhang M and Li D (2019) MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Mol Cancer* 18:169.

Birsa N, Bentham MP, Fratta P (2020) Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS. *Semin Cell Dev Biol.* 99:193–201.

Blackford AN and Jackson SP (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* 66:801–817.

Bohlander SK and Kakadia PM (2015) DNA Repair and Chromosomal Translocations. *Recent Results Cancer Res* 200:1–37.

Brambati A, Zardoni L, Nardini E, Pelliccioli A and Liberi G (2020) The dark side of RNA:DNA hybrids. *Mutat Res* 784:108300.

Caldecott KW (2003) DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell*, 112: 7–10.

Cancel G, Gourfinkel-An I, Stevanin G, Didierjean O, Abbas N, Hirsch E, Agid Y and Brice A (1998) Somatic mosaicism of the CAG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Hum Mutat* 11:23–27

Chatterjee S and Pal JK (2009) Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 101:251–62.

Chou AH, Chen YL, Hu SH, Chang YM and Wang HL (2014) Polyglutamine-expanded ataxin-3 impairs long-term depression in Purkinje neurons of SCA3 transgenic mouse by inhibiting HAT and impairing histone acetylation. *Brain Res* 1583:220–229.

Chou SM, Huang TH, Chen HC and Li TK (2011) Calcium-induced cleavage of DNA topoisomerase I involves the cytoplasmic-nuclear shuttling of calpain 2. *Cell Mol Life Sci* 68(16):2769–2784.

Ciosi M, Maxwell A, Cumming SA, Hensman Moss DJ, Alshammari AM, Flower MD, Durr A, Leavitt BR, Roos RAC, Holmans P, et al. (2019) A genetic association study of glutamine-encoding DNA sequence structures, somatic CAG expansion, and DNA repair gene variants, with Huntington disease clinical outcomes. *EBioMedicine* 48:568–580.

Claassen DA and Lahue RS (2007) Expansions of CAG.CTG repeats in immortalized human astrocytes. *Hum Mol Genet* 16:3088–3096.

Cohen S, Puget N, Lin YL, Clouaire T, Aguirrebengoa M, Rocher V, Pasero P, Canitrot Y and Legube G (2018) Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat Commun* 9:533.

Conlin MP, Reid DA, Small GW, Chang HH, Watanabe G, Lieber MR, Ramsden DA and Rothenberg E (2017) DNA Ligase IV Guides End-Processing Choice during Nonhomologous End Joining. *Cell Rep* 20:2810–2819.

Coutinho P and Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28:703–709.

Currall BB, Chiang C, Talkowski ME and Morton CC (2013) Mechanisms for Structural Variation in the Human Genome. *Curr Genet Med Rep* 1:81–90.

Curtin NJ (2012) DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12:801–817.

de Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, de Lima MA, et al. (2014) Spinocerebellar ataxias in Brazil - frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum* 13:17–28.

de Mattos EP, Kolbe Muskopf M, Bielefeldt Leotti V, Saraiva-Pereira ML and Jardim LB (2018) Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90:203–210.

DeStefano AL, Cupples LA, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Corwin L, Coutinho P, MacLeod P, et al. (1996) A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 59:119–127.

- Ding D, Li K, Wang C, Chen Z, Long Z, Peng Y, Zhou X, Peng H, Qiu R, Xia K, et al. (2016) ATXN2 polymorphism modulates age at onset in Machado-Joseph disease. *Brain* 139:e59.
- Durr A (2010) Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 9:885–894.
- Dworaczek H and Xiao W (2007) Xeroderma pigmentosum: a glimpse into nucleotide excision repair, genetic instability, and cancer. *Crit Rev Oncog* 13:159–177.
- Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armarkola M, Geser F, Greene R, Lu MM, et al. (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466:1069–1075.
- Gacy AM, Goellner G, Juranić N, Macura S and McMurray CT (1995) Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell* 81:533–540.
- Gao R, Chakraborty A, Geater C, Pradhan S, Gordon KL, Snowden J, Yuan S, Dickey AS, Choudhary S, Ashizawa T, et al. (2019) Mutant huntingtin impairs PNKP and ATXN3, disrupting DNA repair and transcription. *Elife* 8:e42988.
- García-Rubio ML, Pérez-Calero C, Barroso SI, Tumini E, Herrera-Moyano E, Rosado IV and Aguilera A (2015) The Fanconi Anemia Pathway Protects Genome Integrity from R-loops. *PLoS Genet* 11:e1005674.
- Gardiner SL, Boogaard MW, Trompet S, de Mutsert R, Rosendaal FR, Gussekloo J, Jukema JW, Roos RAC and Aziz NA (2019) Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease-Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts. *JAMA Neurol* 76:650–656.
- Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium (2015) Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*. 162:516–526.
- Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C, et al. (1993) Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. *Nat Genet* 4:295–299.
- Gomes-Pereira M, Hilley JD, Morales F, Adam B, James HE and Monckton DG (2014) Disease-associated CAG·CTG triplet repeats expand rapidly in non-dividing mouse cells, but cell cycle arrest is insufficient to drive expansion. *Nucleic Acids Res* 42:7047–7056.
- Goold R, Flower M, Moss DH, Medway C, Wood-Kaczmar A, Andre R, Farshim P, Bates GP, Holmans P, Jones L, et al. (2019) FAN1 modifies Huntington's disease progression by stabilizing the expanded HTT CAG repeat. *Hum Mol Genet* 28:650–661.
- Gu W, Ma H, Wang K, Jin M, Zhou Y, Liu X, Wang G and Shen Y (2004) The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol* 52:107–111.

Haberhausen G, Damian MS, Leweke F and Müller U (1995) Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci* 132:71–75.

Hill SJ, Mordes DA, Cameron LA, Neuberg DS, Landini S, Eggan K and Livingston DM (2016) Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(48):E7701–E7709.

Hnia K, Vaccari I, Bolino A and Laporte J (2012) Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 18:317–327.

Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, Rogaeva EA, Sasaki H, Wakisaka A, Zhou YX, Takano H, Endo K, Sanpei K, et al. (1996) Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet* 5:923–932.

Iyama T and Wilson DM 3rd (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* 12:620–636.

Jackson SP and Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078.

Jarmasz JS, Stirton H, Davie JR and Del Bigio MR (2019) DNA methylation and histone post-translational modification stability in post-mortem brain tissue. *Clin Epigenetics* 11:5.

Jin H and Cho Y (2017) Structural and functional relationships of FAN1. *DNA Repair (Amst)* 56:135–143.

Jones L, Houlden H and Tabrizi SJ (2017) DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *Lancet Neurol* 16(1):88–96.

Kampinga HH and Bergink S (2016) Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. *Lancet Neurol* 15(7):748–759.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, et al. (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221–228.

Kennedy L, Evans E, Chen CM, Craven L, Detloff PJ, Ennis M and Shelbourne PF (2003) Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 12:3359–3367.

Khan N, Kolimi N and Rathinavelan T (2015) Twisting right to left: A...A mismatch in a CAG trinucleotide repeat overexpansion provokes left-handed Z-DNA conformation. *PLoS Comput Biol*;11:e1004162.

Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML and Jardim LB (2007) Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72:543–545.

- Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M and Hartl FU (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82:323–355.
- King IF, Yandava CN, Mabb AM, Hsiao JS, Huang HS, Pearson BL, Calabrese JM, Starmer J, Parker JS, Magnuson T, et al. (2013) Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 501:58–62.
- Klockgether T, Mariotti C and Paulson HL (2019) Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5:24.
- Koch P, Breuer P, Peitz M, Jungverdorben J, Kesavan J, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Mertens J, Tüting T, et al. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 480:543–546.
- Kong M, Beckwitt EC and Van Houten B (2020) Dynamic action of DNA repair proteins as revealed by single molecule techniques: Seeing is believing. *DNA Repair (Amst)* 93:102909.
- Kovtun IV and McMurray CT (2001) Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet* 27:407–411.
- Kovtun IV, Liu Y, Bjoras M, Klungland A, Wilson SH and McMurray CT (2007) OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447:447–452.
- Lachaud C, Moreno A, Marchesi F, Toth R, Blow JJ and Rouse J (2016) Ubiquitinated Fancd2 recruits Fan1 to stalled replication forks to prevent genome instability. *Science* 351:846–849.
- Lattante S, Millecamps S, Stevanin G, Rivaud-Péchoux S, Moigneu C, Camuzat A, Da Barroca S, Mundwiller E, Couarch P, Salachas F, et al. (2014) Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders. *Neurology* 83:990–995.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimarães J, Loureiro JE, et al. (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57:54–61.
- Maciel P, Lopes-Cendes I, Kish S, Sequeiros J and Rouleau GA (1997) Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients. *Am J Hum Genet* 60:993–996.
- Maciel P, Costa MC, Ferro A, Rousseau M, Santos CS, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P and Sequeiros J (2001) Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 58:1821–1827.
- MacKay C, Déclais AC, Lundin C, Agostinho A, Deans AJ, MacArtney TJ, Hofmann K, Gartner A, West SC, Helleday T, et al. (2010) Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 142:65–76.

Madabhushi R, Gao F, Pfenning AR, Pan L, Yamakawa S, Seo J, Rueda R, Phan TX, Yamakawa H, Pao PC, et al. (2015) Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* 161:1592–1605.

Mahalingam M (2017) MSH6, Past and Present and Muir-Torre Syndrome-Connecting the Dots. *Am J Dermatopathol.* 39:239–249.

Mani RS and Chinnaiyan AM (2010) Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* 11:819–829.

Martinez-Vicente M and Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6:352–361.

Martins S, Calafell F, Gaspar C, Wong VC, Silveira I, Nicholson GA, Brunt ER, Tranebjaerg L, Stevanin G, Hsieh M, et al. (2007) Asian origin for the worldwide-spread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 64:1502–1508.

Martins S, Pearson CE, Coutinho P, Provost S, Amorim A, Dubé MP, Sequeiros J and Rouleau GA (2014) Modifiers of (CAG)(n) instability in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) transmissions: an association study with DNA replication, repair and recombination genes. *Hum Genet* 133:1311–1318.

Massey TH and Jones L (2018) The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases. *Dis Model Mech* 11:dmm031930.

McKinnon PJ (2016) Topoisomerases and the regulation of neural function. *Nat Rev Neurosci* 17:673–679.

McLoughlin HS, Moore LR and Paulson HL (2020) Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis* 134:104635.

Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, et al. (2017) Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93(5):1015–1034.

Mergener R, Furtado GV, de Mattos EP, Leotti VB, Jardim LB and Saraiva-Pereira ML (2020) Variation in DNA Repair System Gene as an Additional Modifier of Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Neuromolecular Med* 22:133–138.

Milletti G, Strocchio L, Pagliara D, Girardi K, Carta R, Mastronuzzi A, Locatelli F and Nazio F (2020) Canonical and Noncanonical Roles of Fanconi Anemia Proteins: Implications in Cancer Predisposition. *Cancers (Basel)* 12:2684.

Milo R, Jorgensen P, Moran U, Weber G and Springer M (2010) BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res* 38:D750–D753.

Møllersen L, Rowe AD, Larsen E, Rognes T and Klungland A (2010) Continuous and periodic expansion of CAG repeats in Huntington's disease R6/1 mice. *PLoS Genet* 6:e1001242.

Muñoz E, Rey MJ, Milà M, Cardozo A, Ribalta T, Tolosa E and Ferrer I (2002) Intranuclear inclusions, neuronal loss and CAG mosaicism in two patients with Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 200:19–25.

Nakano KK, Dawson DM and Spence A (1972) Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22:49–55.

Nóbrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Conceição M, Déglon N and de Almeida LP (2012) Overexpression of mutant ataxin-3 in mouse cerebellum induces ataxia and cerebellar neuropathology. *Cerebellum* 12:441–455.

Nóbrega C, Carmo-Silva S, Albuquerque D, Vasconcelos-Ferreira A, Vijayakumar UG, Mendonça L, Hirai H and de Almeida LP (2015) Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 138:3537–3554.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (March 11, 2020).

Orr HT and Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30:575–621.

Orr HT (2012) Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J Cell Biol* 197:167–177.

Pacheco LS, da Silveira AF, Trott A, Houenou LJ, Algarve TD, Belló C, Lenz AF, Mânica-Cattani MF and da Cruz IB (2013) Association between Machado-Joseph disease and oxidative stress biomarkers. *Mutat Res* 757:99–103.

Ranum LP, Duvick LA, Rich SS, Schut LJ, Litt M and Orr HT (1991) Localization of the autosomal dominant HLA-linked spinocerebellar ataxia (SCA1) locus, in two kindreds, within an 8-cM subregion of chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 49:31–41.

Richard P, Feng S, Tsai YL, Li W, Rinchetti P, Muhith U, Irizarry-Cole J, Stolz K, Sanz LA, Hartono S, et al. (2020) SETX (senataxin), the helicase mutated in AOA2 and ALS4, functions in autophagy regulation. *Autophagy* 7:1–18.

Rodríguez-Labrada R, Martins AC, Magaña JJ, Vazquez-Mojena Y, Medrano-Montero J, Fernandez-Ruiz J, Cisneros B, Teive H, McFarland KN, Saraiva-Pereira ML, et al. (2020) Founder Effects of Spinocerebellar Ataxias in the American Continents and the Caribbean. *Cerebellum* 19:446–458.

Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C and Shore P (1976) Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 26:703–714.

Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, Soto-Ortolaza AI, Carrasquillo MM, DeJesus-Hernandez M, Adamson J, Li M, Volkening K, Finger E, et al. (2011) Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 20:3207–3212.

Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO and Lederman HM (2016) Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 11:159.

Rüb U, Brunt ER and Deller T (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 21:111–116.

Sarno A, Lundbæk M, Liabakk NB, Aas PA, Mjelle R, Hagen L, Sousa MML, Krokan HE and Kavli B (2019) Uracil-DNA glycosylase UNG1 isoform variant supports class switch recombination and repairs nuclear genomic uracil. *Nucleic Acids Res.* 47:4569–4585.

Saute JAM and Jardim LB (2015) Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 3:517–535.

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T and Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004 May;3(5):291–304.

Sequeiros J, Silveira I, Maciel P, Coutinho P, Manaia A, Gaspar C, Burlet P, Loureiro L, Guimarães J, Tanaka H, et al. (1994) Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics* 21:645–648.

Sequeiros J, Martindale J, Seneca S, Giunti P, Kämäräinen O, Volpini V, Weirich H, Christodoulou K, Bazak N, Sinke R, et al. (2010) EMQN Best Practice Guidelines for molecular genetic testing of SCAs. *Eur J Hum Genet* 18:1173–1176.

Silva-Fernandes A, Costa Mdo C, Duarte-Silva S, Oliveira P, Botelho CM, Martins L, Mariz JA, Ferreira T, Ribeiro F, Correia-Neves M, et al. (2010) Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis* 40:163–176.

Sinha A, Saleh A, Endersby R, Yuan SH, Chokshi CR, Brown KR, Kuzio B, Kauppinen T, Singh SK, Baker SJ, et al (2020) RAD51-Mediated DNA Homologous Recombination Is Independent of PTEN Mutational Status. *Cancers (Basel)* 12(11):E3178.

Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, Schlabach M, Lach FP, Sowa ME, Clark AB, Kunkel TA, Harper JW, Colaiácovo MP, et al. (2010) A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell* 39:36–47.

Souza GN, Kersting N, Krum-Santos AC, Santos AS, Furtado GV, Pacheco D, Gonçalves TA, Saute JA, Schuler-Faccini L, Mattos EP, et al. (2016) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clin Genet* 90:134–140.

Souza GN, Kersting N, Gonçalves TA, Pacheco DLO, Saraiva-Pereira ML, Camey SA, Saute JAM and Jardim LB (2017) Cancer in Machado-Joseph disease patients-low frequency as a cause of death. *Cancer Genet* 212-213:19–23.

Steiner E, Tata M and Frisén J (2019) A fresh look at adult neurogenesis. *Nat Med* 25:542–543.

Stevanin G, Le Guern E, Ravisé N, Chneiweiss H, Dürr A, Cancel G, Vignal A, Boch AL, Ruberg M, Penet C, et al. (1994) A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type I maps to chromosome 14q24.3-qter: evidence for the existence of a fourth locus. *Am J Hum Genet* 54:11–20.

Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, et al. (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4:300–304.

Telenius H, Almqvist E, Kremer B, Spence N, Squitieri F, Nichol K, Grandell U, Starr E, Benjamin C, Castaldo I, et al. (1995) Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington disease. *Hum Mol Genet* 4:189–195.

Tezenas du Montcel S, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, Forlani S, Rakowicz M, Schöls L, Mariotti C, et al. (2014) Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain* 137 :2444–55.

Tumbale P, Williams JS, Schellenberg MJ, Kunkel TA and Williams RS (2013) Aprataxin resolves adenylated RNA-DNA junctions to maintain genome integrity. *Nature* 506:111–115.

Usdin K, House NC and Freudenreich CH (2015) Repeat instability during DNA repair: Insights from model systems. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50:142–167.

Wang C, Chen Z, Peng H, Peng Y, Zhou X, Yang H, Wang P, Li T, Hou X, Qiu R, et al. (2018) Investigation on modulation of DNA repair pathways in Chinese MJD patients. *Neurobiol Aging* 71:267.e5–267.e6.

Ward JM and La Spada AR (2015) Ataxin-3, DNA damage repair, and SCA3 cerebellar degeneration: on the path to parsimony? *PLoS Genet* 11:e1004937.

Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y and Sobue G (2000) Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidolusian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet* 107:452–457.

Wells RD (2007) Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci* 32(6):271–278.

Wilson DM 3rd, Rieckher M, Williams AB and Schumacher B (2017) Systematic analysis of DNA crosslink repair pathways during development and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 45:9467–9480.

Wright GEB, Caron NS, Ng B, Casal L, Casazza W, Xu X, Ooi J, Pouladi MA, Mostafavi S, Ross CJD and Hayden MR (2020) Gene expression profiles complement the analysis of genomic modifiers of the clinical onset of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 29:2788–2802.

Zaytseva O and Quinn LM (2018) DNA Conformation Regulates Gene Expression: The MYC Promoter and Beyond. *Bioessays* 40:e1700235.

Zhu LS, Wang DQ, Cui K, Liu D and Zhu LQ (2019) Emerging Perspectives on DNA Double-strand Breaks in Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol* 17:1146–1157.

Zhu Z, Li R, Stricker R and Reiser G (2015) Extracellular α -crystallin protects astrocytes from cell death through activation of MAPK, PI3K/Akt signaling pathway and blockade of ROS release from mitochondria. *Brain Res.* 1620:17–28.

Zhu Z and Reiser G (2018) The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 115:69–79.

Zijlstra MP, Rujano MA, Van Waarde MA, Vis E, Brunt ER and Kampinga HH (2010) Levels of DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurosci* 32:760–770.

Zoghbi HY, Jodice C, Sandkuijl LA, Kwiatkowski TJ Jr, McCall AE, Huntoon SA, Lulli P, Spadaro M, Litt M, Cann HM, et al. (1991) The gene for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA1) maps telomeric to the HLA complex and is closely linked to the D6S89 locus in three large kindreds. *Am J Hum Genet* 49:23–30.

APÊNDICE 1

As figuras apresentadas nesta tese são de autoria de Rafaella Mergener e foram produzidas no software Inkscape (Copyright (C) 1989, 1991 Free Software Foundation, Inc. 51 Franklin Street, Quinto Andar, Boston, MA 02110-1301, USA).