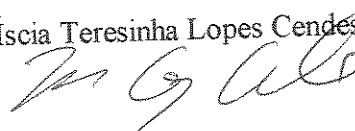


MARIA FRANCISCA ABOIN GOMES CAMARGO

**ESTUDOS MOLECULARES DAS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES
AUTOSSÔMICAS DOMINANTES**

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Ma-
ria Francisca Aboin Gomes Camargo**
Campinas, 20 de agosto de 2002.

Profa. Dra. Íscia Teresinha Lopes Cendes
Orientadora



CAMPINAS

2002

MARIA FRANCISCA ABOIN GOMES CAMARGO

***ESTUDOS MOLECULARES DAS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES
AUTOSSÔMICAS DOMINANTES***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^ª. DRA. ISCLIA T. LOPES-CENDES

CAMPINAS

2002

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C14e
V	EX
TOMBO BC	59052
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00182839-6

C14e

3 10 290560

Camargo, Maria Francisca Aboin Gomes

Estudos moleculares das ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes / Maria Francisca Aboin Gomes Camargo. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Iscia Terezinha Lopes Cendes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema nervoso - doenças. 2. Fatores de idades na doença. 3. Ataxia. I. Iscia Terezinha Lopes Cendes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes

Membros:

- 1. Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes**
- 2. Profa. Dr. Paulo Caramelli**
- 3. Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/08/2002

27/11/02

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Carlos e Catarina, ao meu marido Leandro e a minha filha Maria Gabriela, pela contribuição, pelo incentivo e apoio diante dos obstáculos encontrados.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, pela sua orientação e colaboração no decorrer da minha dissertação de mestrado e a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores, Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes e Dr. Paulo Caramelli, por terem aceitado o meu convite para serem membros da banca da minha dissertação.

Ao Dr. Helio Teive, pela contribuição com muitas amostras de pacientes para realização desse trabalho.

Aos meus pais, ao meu marido, a minha filha e aos meus irmãos pelo incentivo, compreensão, carinho nas horas certas.

As amigas Rejane, Marilza, Kelly e Daniela Facchin pelos momentos de crescimento pessoal, ajuda, incentivo e colaboração para a realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Genética Médica pelos momentos de descontração e incentivo.

A todos os pacientes e familiares, pela grande contribuição para a realização desse trabalho.

A todos os professores que contribuíram com amostras de pacientes ou de uma forma indireta.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xxi</i>
ABSTRACT	<i>xxv</i>
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. As ataxias espinocerebelares.....	31
1.2. As ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes cujos genes já foram identificados.....	34
1.2.1. Ataxia espinocerebelar do tipo 1 (<i>SCA1</i>).....	34
1.2.2. Ataxia espinocerebelar do tipo 2 (<i>SCA2</i>).....	34
1.2.3. Ataxia espinocerebelar do tipo 3 (<i>SCA3</i>) ou Doença de Machado-Joseph (<i>DMJ</i>).....	35
1.2.4. Ataxia espinocerebelar do tipo 6 (<i>SCA6</i>).....	35
1.2.5. Ataxia espinocerebelar do tipo 7 (<i>SCA7</i>).....	36
1.2.6. Atrofia dentatorubropalidolusiana (<i>DRPLA</i>).....	36
1.2.7. Ataxia espinocerebelar do tipo 8 (<i>SCA8</i>).....	37
1.2.8. Ataxia espinocerebelar do tipo 12 (<i>SCA12</i>).....	37
1.3. Mecanismo básico envolvido na patogênese das ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes.....	38

2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivos.....	43
2.2. Importância do estudo.....	43
3. CASUÍSTICA.....	45
3.1. Casuística.....	47
3.2. Aspectos éticos.....	48
4. METODOLOGIA.....	49
4.1. Extração de DNA.....	51
4.2. Genotipagem do fragmento (CAG) _n e (CTG) _n	51
4.3. Metodologia estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	55
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9. ANEXOS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	Ataxia espinocerebelar
CAG	Repetição trinucleotídica (Citosina, Adenina, Guanina)
CTG	Repetição trinucleotídica (Citosina, Timina, Guanina)
cr	Cromossomo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP[P³²]	dinucleotídeo A marcado com fósforo radioativo (P ³²)
PCR	Reação em cadeia da polimerase “Polymerase chain reaction”
“Primers”	Oligonucleotídeos iniciadores
dATP	Deoxi adenosina trifosfato
dTTP	Deoxi timina trifosfato
dCTP	Deoxi citosina trifosfato
dGTP	Deoxi guanina trifosfato
RSB	Tampão à base de cloreto de magnésio e cloreto de potássio
SDS	Lauril sulfato de sódio
Taq®	DNA polimerase <i>Termus aquaticus</i>
Rpm	Rotações por minuto
ml	Mililitro
µl	Microlitro
mg	Micrograma
NaOH	Hidróxido de sódio

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Sequências dos “primers”, condições de PCR e eletroforese para as sete mutações responsáveis pelas AEC autossômicas dominantes.....	53
TABELA 2 : Relação entre o tipo de mutação, número de indivíduos positivos e a frequência.	57
TABELA 3 : Avaliação clínica de 7 indivíduos com SCA1.....	63
TABELA 4 : Avaliação clínica de 52 indivíduos com SCA3/DMJ.....	64
TABELA 5 : Variação dos tamanhos dos alelos normais, média e mediana analisados 30 indivíduos normais (60 alelos) para cada mutação estudada.....	65
TABELA 6 : Localização mais comum, variação de frequência no Brasil em relação a cada uma das mutações (SCA1, SCA2, SCA3/DMJ e SCA7).....	65

LISTA DE QUADROS

	<i>Pág</i>
QUADRO 1 : Tipos das formas das ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes e suas localizações nos genes.....	33
QUADRO 2 : Variação dos tamanhos dos alelos normais e expandidos para AEC dominantes.....	37
QUADRO 3 : Variação dos tamanhos dos alelos normais e dos alelos expandidos para as mutações estudadas.....	58
QUADRO 4 : Características genéticas e moleculares dos 52 pacientes SCA3/DMJ identificados.....	60
QUADRO 5 : Características genéticas e moleculares dos 7 pacientes SCA1 identificados.....	62
QUADRO 6 : Características genéticas e moleculares dos 2 pacientes SCA2 identificados.....	62
QUADRO 7 : Características genéticas e moleculares dos 2 pacientes SCA7 identificados.....	62



RESUMO

As ataxias espinocerebelares (AEC) formam um grupo heterogêneo de doenças degenerativas do sistema nervoso central, caracterizadas por degeneração do cerebelo e suas vias aferentes e eferentes. Clinicamente, a maior parte dos pacientes com AEC apresentam alterações do equilíbrio e disartria, que evoluem de forma progressiva.

As AEC autossômicas dominantes se iniciam normalmente na idade adulta. Até o momento, existem 16 loci mapeados para as formas dominantes de AEC: tipo 1 (*SCA1*) no cromossomo (cr) 6p, tipo 2 (*SCA2*) no cr 12q, tipo 3 ou doença de Machado-Joseph (*SCA3/MJD*) no cr 14q, tipo 4 (*SCA4*) no cr 16q, tipo 5 (*SCA5*) na região centromérica do cr 11, tipo 6 (*SCA6*) no cr 19p, tipo 7 (*SCA7*) no cr 3p, tipo 8 (*SCA8*) no cr 13q, tipo 10 (*SCA10*) no cr 22q, tipo 11 (*SCA11*) no cr 15q, tipo 12 (*SCA12*) no cr 5q, tipo 13 (*SCA13*) no cr 19q, tipo 14 (*SCA14*) no cr 19q, tipo 16 (*SCA16*) no cr 8q, tipo 17 (*SCA17*) na região TATA- box da proteína e a atrofia dentatorubropalidoluisiana (*DRPLA*) no cr 12p. Em sete formas autossômicas dominantes, cujos genes já foram identificados (*SCA1*, *SCA2*, *SCA3/MJD*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA12* e *DRPLA*), a expansão de trinucleotídeo CAG localizada na região codificadora dos genes, foi identificada como a mutação responsável pela neurodegeneração, já na *SCA8* a mutação responsável é uma repetição do trinucleotídeo CTG. Algumas evidências experimentais apontam para um ganho específico de função que levaria a toxicidade neuronal nas doenças causadas pela expansão do trinucleotídeos CAG.

O objetivo principal deste projeto de pesquisa foi a determinação da frequência e das características moleculares das mutações responsáveis pelas diferentes formas de AEC em uma amostra da população brasileira.

Cento e sessenta e três indivíduos com ataxia espinocerebelar progressiva foram analisados clinicamente e as amostras de sangue periférico foram coletados para os estudos moleculares. Os 163 pacientes pertenciam a 123 famílias não relacionadas entre si. O DNA genômico foi extraído de cada indivíduo e as amostras foram genotipadas pela técnica da PCR, utilizando pares de “primer” que flanqueiam as regiões adjacentes aos tripletos expandidos encontrados nos genes *SCA1*, *SCA2*, *SCA3/DMJ*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA8* e *DRPLA*. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em géis de sequenciamento por aproximadamente 3 horas. A leitura dos alelos foi por auto-radiografia após 3 dias de exposição a filmes de raio-X.

Na amostra de 123 famílias encontraram-se: 7 indivíduos portadores da mutação *SCA1* (5%), 2 indivíduos portadores da mutação *SCA2* (2%), 52 indivíduos portadores da mutação *SCA3/DMJ* (32%) e 2 indivíduos portadores das mutação *SCA7* (2%). Não se encontrou nenhum indivíduo portador das mutações: *SCA6*, *SCA8*, *DRPLA*.

Observa-se que na população estudada a forma mais frequente de AEC é causada pela mutação *SCA3/DMJ*. Nesse estudo foi também importante para estabelecer quais as AEC autossômicas dominantes mais frequentes em nosso meio e assim orientar o diagnóstico clínico e molecular.



ABSTRACT

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a clinically and genetically heterogeneous group of late onset neurodegenerative disorders. Clinically this group of diseases is characterized by cerebellar dysfunction manifested by gait and limb ataxia, incoordination and dysarthria.

There are a total of sixteen loci for autosomal dominant SCAs described: spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) on chromosome (ch) 6p, spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on ch 12q, spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) or Machado- Joseph disease (MJD) on ch 14q, spinocerebellar ataxia type 4 (SCA4) on ch 16q, spinocerebellar ataxia type 5 (SCA5) on the centromeric region of ch 11, spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) on ch 19p, spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) on ch 3p, spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8) on ch 13q, spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10) on ch 22q, spinocerebellar ataxia type 11 (SCA11) on ch 15q, spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12) on ch 5q, spinocerebellar ataxia type 13 (SCA13) on ch 19q, spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) on ch 19q, spinocerebellar ataxia type 16 (SCA16) on ch 8q, spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17) on the region of TATA- box protein and dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA) on ch 12p. Are eight different genes causing autosomal dominant SCA have been mapped: *SCA1*, *SCA2*, *SCA3/MJD*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA12* and *DRPLA* caused by expansions of an unstable CAG repeat localized in the coding region of causative genes. SCA8 is caused by expansions of an unstable CTG repeat.

The frequency of *SCA1*, *SCA2*, *SCA3/MJD*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA8* and *DRPLA* in brazilian patients and to compare their molecular and clinical characteristics for SCAs mutations.

One hundred and sixty three individuals were genotyped in this study. Of 163 individuals belonging to 123 unrelated families. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the CAG repeat and CTG repeat. PCR products were separated in electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels. Polyacrylamide gels were transferred into Hybond H+ nylon membranes and hybridized with an α ^{32}P 3'- end- labeled (CAG)_n probe. Were determined allele by comparing migration relative to an M13 sequencing ladder and used as positive and negative controls in all analyses.

Of the 123 families studied: 7 positive individuals of the SCA1 mutation (5%), 2 positive individuals of the SCA2 mutation (2%), 52 positive individuals of the SCA3/MJD mutation (32%) and 2 positive individuals of the SCA7 mutation (2%). We found no SCA6, SCA7, DRPLA and SCA8 mutations.

The frequency of SCA3/MJD is substantially higher than that of SCA1, SCA2 and SCA7 in individuals with SCAs.



1. INTRODUÇÃO

1.1. AS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES

As ataxias espinocerebelares (AEC) são doenças degenerativas do sistema nervoso central, caracterizadas clinicamente por disfunção cerebelar progressiva que se manifesta por alterações de equilíbrio e disartria (GREENFIELD, 1954). A herança genética é variável, podendo ocorrer casos esporádicos, autossômicos recessivos e autossômicos dominantes (HARDING, 1986). Desde as primeiras descrições clínicas de pacientes com AEC, em meados do, século XIX (FRIEDREICH, 1876), a classificação dessas doenças tem sido muito discutida. Essa dificuldade se origina principalmente da heterogeneidade clínica observada muitas vezes entre pacientes da mesma família. Acredita-se que com o avanço nas pesquisas moleculares e com a incorporação dos aspectos genéticos, uma classificação de consenso possa ser mais facilmente elaborada (ROSENBERG, 1990).

A prevalência dos casos familiares é estimada em 1:50.000 indivíduos (GUDMUNDSSON, 1969). Para as AEC autossômicas recessivas existem cinco *loci* mapeados até o momento: ataxia de Friedreich (AF) no cromossomo (cr) 9q (CHAMBERLAIN et al., 1988), ataxia com deficiência de vitamina E (ADVE) no cr 8q (BEN HAMIDA et al., 1993), uma forma rara da doença, a ataxia espinocerebelar de início na infância (IOSCA) no cr 10q (NIKALI et al., 1995) descrita somente na população finlandesa, ataxia telangectasia (SALINAS et al., 1981) e a ataxia Charlevoix-Saguenay (RICHTER et al., 1999).

Nas formas de AEC autossômicas dominantes, um total de dezesseis *loci* já foram descritos: tipo 1 (*SCA1*) no cromossomo (cr) 6p (YAKURA et al., 1974), tipo 2 (*SCA2*) no cr 12q (GISPERT et al., 1993), tipo 3 ou doença de Machado-Joseph (*SCA3/MJD*) no cr 14q (TAKIYAMA et al., 1993), tipo 4 (*SCA4*) no cr 16q (FLANIGAN et al., 1996), tipo 5 (*SCA5*) na região centromérica do cr 11 (RANUM et al., 1994b), tipo 6 (*SCA6*) no cr 19p (ZHUCHENKO et al., 1997), tipo 7 (*SCA7*) no cr 3p (BENOMAR et al., 1995), tipo 8 (*SCA8*) no cr 13q (KOOB et al., 1999), tipo 10 (*SCA10*) no cr 22q (ZU et al., 1999), tipo 11 (*SCA11*) no cr 15q (WORTH et al., 1999), tipo 12 (*SCA12*) no cr 5q (HOLMES et al., 1999), tipo 13 (*SCA13*) no cr 19q (HERMAN-BERT et al., 2000), tipo 14 (*SCA14*) no cr 19q (YAMASHITA et al., 2000) tipo 16 (*SCA16*) no cr 8q (MIYOSHI et al.,

2001), tipo 17 (*SCA17*) no TATA box proteína (NAKAMURA et al., 2001) e a atrofia dentatorubropalidoluisiana (*DRPLA*) no cr 12p (KOIDE et al., 1994) (Quadro 1). Na maioria das formas autossômicas dominantes, cujos genes já foram identificados (*SCA1*, *SCA2*, *SCA3/MJD*, *SCA6*, *SCA7*, *SCA12* e *DRPLA*) (ZHUCHENKO et al., 1997; KOIDE et al., 1994; ORR et al., 1993; PULST et al., 1996; KAWAGUCHI et al., 1994; DAVID et al., 1997), a base molecular se caracteriza por uma expansão de repetições CAG localizadas na região codificadora dos genes. Após translação, essa seqüência de CAG resulta em um resíduo de poliglutaminas ao nível protéico (ROSS, 1995). Em indivíduos normais esses trinucleotídeos CAG variam de tamanho entre 8 até aproximadamente 35 unidades de CAG. A doença aparece quando o CAG expande acima de 40 unidades (SUTHERLAND e RICHARDS, 1995). Existe ainda uma forma de AEC autossômica dominante cujo gene já foi identificado (*SCA8*), que é causada pela expansão de repetições CTG (KOOB et al., 1999).

Todas as doenças causadas pela expansão de CAG identificadas até hoje, apresentam uma série de características em comum (LA SPADA et al., 1991; ORR et al., 1993; PULST et al., 1996; KAWAGUCHI et al., 1994; ZHUCHENKO et al., 1997; DAVID et al., 1997), entre elas: a presença de variabilidade clínica importante, mesmo dentro de uma única família; o fenômeno de antecipação, definido como um início precoce da doença em gerações mais recentes, geralmente com quadros mais graves; e a morte neuronal acompanhada de gliose (SUTHERLAND e RICHARDS, 1995). Existe ainda uma correlação inversa entre a idade de início e a gravidade da doença, com o tamanho do triplete expandido (ROSS, 1995; SUTHERLAND e RICHARDS, 1995; LA SPADA et al., 1991; ORR et al., 1993; PULST et al., 1996; KAWAGUCHI et al., 1994; ZHUCHENKO et al., 1997; DAVID et al., 1997). Algumas evidências também apontam para o mecanismo de ganho de função, levando à toxicidade neuronal nessas doenças (ROSS, 1995; ZOGHBI, 1996).

Quadro 1: Tipos das formas das ataxias autossômicas dominantes e a suas localizações nos genes.

Tipo de mutação	Loci
SCA1	Cr 6p
SCA2	Cr 12q
SCA3/MJD	Cr 14q
SCA4	Cr 16q
SCA5	Região centromérica do cr 11
SCA6	Cr 19p
SCA7	Cr 3p
SCA8	Cr 13q
SCA10	Cr 22q
SCA11	Cr 15q
SCA12	Cr 5q
SCA13	Cr 19q
SCA14	Cr 19q
SCA16	Cr 8q
SCA17	TATA box proteína

Fontes: YAKURA et al., 1974; GISPert et al., 1993; TAKIYAMA et al., 1993; RANUM et al., 1994b; BENOMAR et al., 1995; FLANIGAN et al., 1996; ZHUCHENKO et al., 1997; KOOB et al., 1999; ZU et al., 1999; WORTH et al., 1999; HOLMES et al., 1999; HERMAN-BERT et al., 2000; YAMASHITA et al., 2000; MIYOSHI et al., 2001; NAKAMURA et al., 2001.

1.2. AS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES AUTOSSÔMICAS DOMINANTES CUJOS GENES JÁ FORAM IDENTIFICADOS

1.2.1. Ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA 1):

O *locus* para *SCA1* foi o primeiro *locus* para AEC autossômica dominante a ser localizado no braço curto do cr 6 (6p22-p23) (ZOGHBI et al., 1991). O gene *SCA1* foi também o primeiro gene para AEC autossômica dominante que foi identificado como contendo uma repetição de (CAG)_n na região codificadora (ORR et al., 1993). A SCA 1 é responsável por aproximadamente 5% a 10% dos casos de AEC autossômicas dominantes na população da América do Norte (RANUM et al., 1995; SILVEIRA et al., 1996) e é a forma de AEC mais freqüente na Itália (JODICE et al., 1993). No Brasil, apenas três famílias com essa mutação foram identificadas até o momento (LOPES-CENDES et al., 1997a). Como nas outras formas de AEC, a variabilidade clínica é grande, mesmo entre pacientes pertencentes à mesma família. Algumas características clínicas estão ausentes nas famílias, tais como: demência, atrofia ótica e sinais extrapiramidais (SCHUT, 1950). Nos casos terminais, a neuropatologia é característica, revelando atrofia olivo-ponto-cerebelar, com grau severo de perda neuronal, nas células de Pukinje, do córtex cerebelar (ROBITAILLE et al., 1995) (Quadro 2).

1.2.2. Ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA 2):

O *locus* para *SCA2* foi inicialmente mapeado em um grupo de famílias cubanas de origem espanhola, no braço longo do cr 12 (12q23-q24.1) (GISPERT et al., 1993). Famílias de outras origens étnicas também foram mapeadas na mesma localização (LOPES-CENDES et al., 1994). Acredita-se que a *SCA2* seja a segunda forma mais freqüente de AEC autossômicas dominante em pacientes da América do Norte (SILVEIRA et al., 1996). Estudos subsequentes identificaram até o momento cinco famílias no Brasil (LOPES-CENDES et al., 1997b). Indivíduos nos estágios iniciais da doença são clinicamente muito semelhante a pacientes com *SCA1*, porém, na evolução, indivíduos com *SCA2* desenvolvem mais freqüentemente sinais extrapiramidais e lentificação dos movimentos oculares (LOPES-CENDES, 1993) (Quadro 2).

1.2.3. Ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA 3) ou Doença de Machado-Joseph (DMJ):

A primeira descrição dessa doença foi feita em famílias de origem açoreana que imigraram para a região da Nova Inglaterra nos EUA (NAKANO et al., 1972) . O *locus* para SCA 3/DMJ foi localizado no braço longo do cr 14 (TAKIYAMA et al., 1993). Hoje se sabe que a doença afeta também outros grupos étnicos e que é responsável por aproximadamente 20% de todos os casos de AEC autossômica dominante na população não portuguesa na América do Norte (RANUM et al., 1995; SILVEIRA et al., 1996). Acredita-se que seja a forma mais freqüente de AEC autossômica dominante no Brasil (LOPES-CENDES et al., 1997a; LOPES-CENDES et al., 1997c).

Como nas outras formas de AEC autossômica dominante, a doença se inicia geralmente na idade adulta, por volta dos 40 anos de idade (COUTINHO, 1994). Os primeiros sintomas são quase que invariavelmente alterações do equilíbrio durante a marcha e a oftalmoplegia externa, caracterizada, inicialmente, por uma limitação primeiro do olhar vertical para cima e da convergência, seguida por limitação do olhar lateral. Outro achado ocular muito característico na DMJ, presente em aproximadamente 25% dos pacientes de origem portuguesa, é o aspecto dos olhos saltados (COUTINHO, 1994) (Quadro 2).

1.2.4. Ataxia espinocerebelar do tipo 6 (SCA 6):

Esse *locus* foi identificado no braço curto do cr 19 (ZHUCHENKO et al., 1997). Estudos moleculares subsequentes demonstraram que a SCA6 é uma forma freqüente de AEC na América do Norte e Europa (MATSUYAMA et al., 1997; ISHIKAWA et al., 1997; HAYES et al., 1997). No Brasil, nenhum estudo anterior determinou sua freqüência. Diferentemente de todas as outras doenças neurodegenerativas causadas pela expansão de tripletos CAG, essa expansão foi localizada em um gene para qual se conhece a função, a subunidade α_{1A} voltagem dependente do canal de cálcio (ZHUCHENKO et al., 1997). Outro achado interessante, é que mutações pontuais localizadas nesse mesmo gene foram

encontradas em pacientes com ataxia episódica, doença paroxística não progressiva, caracterizada por surtos de ataxia cerebelar e períodos intercríticos sem sintomas (OPHOFF et al., 1996) (Quadro 2).

1.2.5. Ataxia espinocerebelar do tipo 7 (SCA7):

O *locus* para SCA7 foi mapeado no braço curto do cr 3 (BENOMAR et al., 1995) e o gene foi identificado (DAVID et al., 1997). Foi diagnosticada em pacientes de várias origens geográficas: Bélgica, França, Inglaterra, Suécia, Noruega, Estados Unidos, Brasil, Israel, Holanda, Marrocos, Argélia, Tunísia, Coreia e África do Sul (STEVANIN et al., 1998) (Quadro 2).

1.2.6. Atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA):

É uma doença neurodegenerativa rara na população caucasiana, mas descrita com alta frequência nos japoneses (KOIDE et al., 1994; NAGAFUCHI et al., 1994; WARNER et al., 1995). A herança é autossômica dominante e o *locus* foi identificado no braço curto do cr 12 (KOIDE et al., 1994; NAGAFUCHI et al., 1994). Até o momento nenhum caso de DRPLA foi identificado no Brasil (LOPES-CENDES et al., 1997a). A DRPLA apresenta uma grande variabilidade clínica, mesmo dentro de uma única família. Indivíduos com início dos sintomas na primeira ou segunda década de vida apresentam uma evolução mais grave, com quadro típico de epilepsia mioclônica progressiva (EMP), crises mioclônicas e tônico-clônicas generalizadas e declínio mental grave. Por outro lado, pacientes com início dos sintomas na terceira ou quarta década de vida apresentam um quadro de ataxia cerebelar progressiva com declínio mental moderado (SMITH, 1975). Existe uma forte correlação entre o tamanho do triplete e os sinais clínicos, isto é, indivíduos com início precoce e quadro de EMP apresentam os maiores alelos expandidos (SCHMITT et al., 1995) (Quadro 2).

1.2.7. Ataxia Espinocerebelar do tipo 8 (SCA8)

O *locus* para SCA8 foi mapeado no braço longo do cr 13. É a primeira ataxia espinocerebelar autossômica dominante que não é causada pela expansão do triplete (CAG)_n, e sim causada pela expansão do triplete (CTG)_n (KOOB et al., 1999). No Brasil, não existe ainda nenhum estudo a respeito da frequência dessa mutação (Quadro 2).

1.2.8. Ataxia espinocerebelar do tipo 12 (SCA12)

O gene foi encontrado em uma família de origem alemã. A expansão CAG localiza-se antes do sítio de iniciação de um gene conhecido como *PPP2R2B* e que codifica uma subunidade regulatória da fosfatase de proteínas PP2A, localizado no 5q31-33. A região que vem após são as repetições de CAGs sem homologia com nenhum gene conhecido; além disso, não se sabe se a sequência CAG é transcrita ou não (HOLMES et al., 1999) (Quadro 2).

Quadro 2: Variação dos tamanhos dos alelos normais e expandidos para AEC dominantes.

Mutação	Tamanho dos alelos normais	Tamanho dos alelos expandidos
SCA1	19 – 36 (CAG) _n	42 – 69 (CAG) _n
SCA2	14 – 31 (CAG) _n	34 – 57 (CAG) _n
SCA3/DMJ	12 – 34 (CAG) _n	61 – 84 (CAG) _n
SCA6	6 – 17 (CAG) _n	21 – 30 (CAG) _n
SCA7	7 – 17 (CAG) _n	38 – 130 (CAG) _n
DRPLA	7 – 35 (CAG) _n	49 – 88 (CAG) _n
SCA8	74 – 94 (CTG) _n	107 – 127 (CTG) _n
SCA12	7 – 28 (CAG) _n	66 – 78 (CAG) _n

Fontes: ORR et al., 1993; KOIDE et al., 1994; KAWAGUCHI et al., 1994; PULST et al., 1996; ZHUCHENKO et al., 1997; DAVID et al., 1997; KOOB et al., 1999; HOLMES et al., 1999.

1.3. MECANISMO BÁSICO ENVOLVIDO NA PATOGENESE DAS ATAXIAS ESPINOCEREBELARES AUTOSSÔMICAS DOMINANTES

Na doença de Machado-Joseph observou-se que as poliglutaminas precipitavam-se através de uma auto-agregação em células COS cultivadas e assim induziam a morte celular (IKEDA et al., 1996). Essa precipitação só acontecia se as poliglutaminas provinham de uma porção da proteína, mas não da proteína completa. Inclusões ou agregados intracelulares foram vistos em neurônios de pacientes, em modelos transgênicos e em modelos *in vitro* da doença de Huntington, da SCA1, da DMJ, da doença de Kennedy e da DRPLA (HACKAM et al., 1998).

As inclusões de poliglutaminas nos estudos *in vivo* eram intranucleares ou estavam no citosol dos neurônios e, em geral, se restringiam às regiões encefálicas afetadas pela doença. Na glia não havia agregados. Para desencadear a formação desses agregados é necessário um prévio processo de proteólise. (DAVIES et al., 1997; DIFIGLIA et al., 1997; SKINNER et al., 1997; PAULSON, 1999).

Nos estudos *in vitro* formaram-se agregados somente nas células transfectadas com construtos que expressassem proteínas expandidas, especialmente quando a proteína era truncada ou fragmentada. Por exemplo, os agregados de huntingtina em células 2-2 eram marcados apenas por anticorpos dirigidos contra o término-N e não por anticorpos dirigidos contra epítomos mais distais da proteína huntingtina (o mesmo acontecendo nos agregados intraneuronais dos doentes humanos) (DIFIGLIA et al., 1997). Não se obteve a formação de agregados se o trato de poliglutamina era menor do que 44 ou 40 glutaminas, enquanto havia tanto mais agregados quanto maior fosse a expansão do trato (HACKAM et al., 1998).

O modelo atual de relação entre agregados e morte celular propõe que o acúmulo de fragmentos protéicos nos quais haja um trato de poliglutamina expandido seria tóxico para a célula neuronal. Essa toxicidade poderia ser anterior ou subsequente à formação de agregados. Nesse modelo, o processo patológico seria desencadeado, num certo momento, pela proteólise da proteína original, pois as regiões atingidas sempre acumulariam fragmentos da proteína que, por conterem a poliglutamina, tornar-se-iam resistentes à degradação (HACKAM et al., 1998).

Esse modelo deve prever que o processo de quebra das proteínas seja diferente em cada região cerebral, para explicar o acúmulo de agregados em topografias tão específicas (KAKIZUKA et al., 1998). As razões para que isso aconteça ainda são desconhecidas, embora algumas já tenham sido sugeridas, por exemplo, é possível que as proteases responsáveis pela degradação das poliglutaminas tenham expressão diferencial no cérebro. Portanto, os efeitos tóxicos iniciais, prévios à agregação, envolvem apenas determinadas populações de neurônios (HACKAM et al., 1998).

Esse modelo finalmente deve explicar por que há um período pré-sintomático tão longo em todas essas doenças, e por que não só o tempo, mas a gravidade são tão diversos em cada indivíduo (KAKIZUKA et al., 1998).



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS

Os objetivos desse projeto foram:

- a) Testar para a presença de diferentes mutações por expansão de trinucleotídeos (CAG)_n (SCA1, SCA2, SCA3/MDJ, SCA6, SCA7 e DRPLA) e (CTG)_n (SCA8), através da técnica da PCR, em amostras de DNA genômico extraídas de pacientes com AEC.
- b) Determinar a frequência relativa de cada uma das mutações responsáveis por AEC em famílias com herança autossômica dominante.
- c) Estudar as correlações entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes analisados.
- d) Caracterizar, do ponto de vista molecular, as mutações por expansão do trinucleotídeo (CAG)_n e (CTG)_n nas AEC dominantes, através da determinação do tamanho do triplete (CAG)_n e (CTG)_n em indivíduos normais e afetados.
- e) Determinar os padrões de normalidade dos alelos CAG e CTG, em nossa população.

2.2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

As AEC são doenças progressivas para as quais não existe tratamento específico. Com a detecção direta das mutações dinâmicas em pacientes isolados, uma reavaliação das características clínicas e patológicas das AEC se torna possível. Isto tem implicações diretas na classificação dessas doenças neurodegenerativas, assim como no estudo de casos 'atípicos', o que deverá ajudar na melhor definição do espectro clínico de cada uma delas. A possibilidade de estabelecer correlações entre variabilidade clínica e características moleculares da mutação pode ajudar no melhor entendimento e, possivelmente, na determinação de hipóteses sobre o mecanismo fisiopatológico dessas entidades, assim como dos processos de degeneração neuronal em geral. Uma aplicação prática imediata derivada desse estudo é a determinação de padrões para a definição de alelos normais e anormais na nossa população, levando a critérios mais específicos para o diagnóstico molecular de pacientes brasileiros com AEC.



CASUÍSTICA

3.1. CASUÍSTICA

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP foi iniciada a coleta de amostras de pacientes para o estudo. A participação no estudo foi proposta a todos os pacientes avaliados no ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP e que apresentavam quadro clínico de AEC. Ou seja ataxia e incoordenação motora progressivas com padrão de herança autossômico dominante ou casos isolados, nos quais não havia informação adequada sobre o estado clínico dos pais. O objetivo e os procedimentos envolvidos no projeto foram detalhadamente explicados aos pacientes e seus familiares. Quando obtida a concordância em participar no projeto e mediante a assinatura do formulário de consentimento (veja Anexo) as coletas das amostras de sangue eram realizadas. Foram coletadas amostras somente de indivíduos afetados. História clínica, exame neurológico e genealogia detalhada foram também obtidos para cada paciente probando (veja Anexo para formulário clínico). Iniciou-se também amplo trabalho de divulgação com vários neurologistas e geneticistas do país, a fim de aumentar nossa casuística. Vale lembrar que os mesmos critérios clínicos e éticos aplicados nesse serviço foram seguidos pelos colaboradores em outros centros (assinatura do formulário de consentimento e preenchimento do formulário clínico). No Anexo incluiu-se um exemplo de como os resultados do teste molecular foram enviados aos colaboradores de outros centros do país. Quanto aos pacientes acompanhados nesse serviço, esses receberam aconselhamento genético, orientação psicossocial e acompanhamento neurológico pela equipe multidisciplinar do Ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP, sob a coordenação da Dra. Iscia Lopes Cendes.

No presente estudo, identificaram-se um total de 163 pacientes, pertencentes a 123 famílias não relacionadas. Cinquenta e oito dessas famílias foram selecionadas no Ambulatório de Neurogenética do HC- UNICAMP e 65 famílias foram identificadas por colaboradores de outros centros.

Além disso, genotipamos um total de 30 indivíduos normais não relacionados, a fim de determinar os padrões de normalidade dos alelos CAG (*SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, DRPLA*) e CTG (*SCA8*) na população estudada.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular fosse confidencial, questionários clínicos, amostras de sangue e DNA foram identificados por um código comum, designado no momento em que o indivíduo entrou no estudo. A chave de identificação entre o nome do indivíduo, seu dossiê clínico e amostra de DNA era conhecida apenas pelo clínico responsável pelo atendimento direto do paciente. Informações geradas durante o projeto e que tinham implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos já sintomáticos, foram comunicadas aos profissionais responsáveis pelo tratamento direto dos pacientes. Dados para serem usados em diagnóstico pré-sintomático não foram gerados por esse projeto. Um formulário de consentimento pós-informação foi assinado por todos os participantes no estudo (Anexo) . Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM- UNICAMP (Parecer nº 055/98).



4. METODOLOGIA

4.1. EXTRAÇÃO DE DNA:

Vinte a 30 ml de sangue venoso foram colhidos de cada indivíduo recrutado para estudo. As amostras foram centrifugadas à 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde estão localizados os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida, foram adicionadas as soluções de RSB 1× (até completar um volume de 11ml) e 60µl de Nonidet. A solução foi então centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três ml de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K(100 mg/ ml) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação foi acrescentado três ml de fenol, seguido de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5ml de fenol e 1,5ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (24:1), seguido de 3ml de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (24:1). O DNA genômico foi então precipitado com 6ml de etanol absoluto (SAMBROOK et al., 1989).

4.2. GENOTIPAGEM DO FRAGMENTO (CAG)_N E (CTG)_N:

Nas sete AEC autossômicas dominantes causadas pela expansão de tripletos (CAG)_n e (CTG)_n o teste direto da mutação foi realizado. Para isso, foi usada a amplificação *in vitro*, através da PCR (reação da polimerase em cadeia), do fragmento de DNA que contém o (CAG)_n e (CTG)_n obtido a partir de leucócitos do indivíduo. Um par de fragmentos iniciadores ou “primers”, com seqüência complementar à região adjacente ao (CAG)_n ou (CTG)_n foi utilizado na reação de PCR juntamente com nucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), nucleotídeo radioativo (αP^{32} dATP) e a enzima *Taq* DNA polimerase e/ou *Taq Platinum*. Condições da PCR foram específicas para cada par de “primers” utilizados (RANUM et al., 1993; ORR et al., 1993; KAWAGUCHI et al., 1994; PULST et al., 1996; ZHUCHENKO et al., 1997; DAVID et al., 1997) (Tabela 1) . Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em géis de sequenciamento por aproximadamente 3 horas; posteriormente, foi utilizada uma membrana de náilon com carga positiva para a transferência (Hybond – N⁺), molhada dos dois lados com TBE10×, cobriu-se o gel com essa membrana e com dois pedaços de papel “whattman” do mesmo

tamanho da membrana e deixou-se de um dia para outro. No dia seguinte, lavou-se a membrana com duas soluções NaOH 0,4N por quinze minutos e SSPE 2×, após uma hibridização a 42°C “over night”, utilizando uma sonda marcada radioativamente com αP^{32} dATP. A leitura dos alelos foi feita por auto-radiografia após 3 dias de exposição a filmes de raios X, sob temperatura ambiente (ORR et al., 1993; KAWAGUCHI et al., 1994; PULST et al., 1996; SILVEIRA et al., 1996; ZHUCHENKO et al., 1997; DAVID et al., 1997; LOPES-CENDES et al., 1997a). O tamanho dos alelos (CAG)_n e (CTG)_n foram determinados por comparação com fragmentos de DNA submetidos à eletroforese em paralelo e cujo tamanho já era conhecido ou, quando o tamanho não era conhecido foi utilizado um marcador de pares de bases (SILVEIRA et al., 1996; LOPES-CENDES et al., 1997a). Já existem alguns estudos que estabeleceram, em algumas populações, os tamanhos para alelos normais e expandidos nas sete formas de AEC autossômicas dominantes causadas pela expansão de (CAG)_n e (CTG)_n. É importante notar que existe a possibilidade de uma superposição entre o tamanho dos alelos normais e expandidos, os chamados alelos intermediários.

TABELA 1: Sequências dos “primers”, condições de PCR e eletroforese para as sete mutações responsáveis pelas AEC autossômicas dominantes.

Mutação	Primer	Condições do PCR	% do gel de sequenciamento
SCA1 (ORR, et al, 1993)	Rep1 5' AACTGGAAATGTGGACGTAC 3' Rep2 5' CAACATGGGCAGTCTGAG 3'	HS = 94°C - 4' D = 94°C - 1' A = 55°C - 1' E = 72°C - 1' 30 ciclos	6%
SCA2 (PULST, et al, 1996)	SCA-2A 5' GGGCCCCCTCACCATGTGCG 3' SCA-2B 5' CGGGCTTCCGGACATTTGG 3'	HS = 94°C - 5' D = 94°C - 1' A = 61°C - 1' E = 70°C - 2' E = 72°C - 4' 35 ciclos	6%
SCA3/DMJ (KAWAGUCHI, MJD25A 5'GGCTGGCCTTTCACATGGAT 3' et al, 1994)	MJD52 5' CCAGTGACTACTTTGATTCG 3' MJD25A 5'GGCTGGCCTTTCACATGGAT 3'	HS = 95°C - 5' D = 95°C - 1' A = 60°C - 1' E = 72°C - 1' E = 72°C - 5' 32 ciclos	6%
SCA6 (ZHUCHENKO, S-5-R1 5' TGCGTACCTCCGGAGGGCCGCTGGTG 3' et al, 1997)	S-5-F1 5' CACGTGTCTCTATTCCTCCCTGTGATCC 3' S-5-R1 5' TGCGTACCTCCGGAGGGCCGCTGGTG 3'	HS = 94°C - 5' D = 94°C - 1' E = 70°C - 1' 35 ciclos	6%
SCA7 (DAVID, et al, 1997)	4U1024 5' TGTTACATTGTAGGAGCGGAA 3' 4U716 5' CACGACTGTCCCAGCATCACTT 3'	HS = 95°C - 5' D = 95°C - 1' A = 60°C - 1' E = 72°C - 1' 32 ciclos	6%
DRPLA (KOIDE, et al, 1994)	CTG-B37A 5' CACCAGTCTCAACACATCACCATC 3' CTG-B37B 5' CCTCCAGTGGGTGGGAAATGCTC 3'	HS = 96°C - 2' D = 96°C - 1' A = 62°C - 1' E = 72°C - 1' 30 ciclos	6%
SCA8 (KOOB, et al, 1999)	SCA8-F3 5' TTTGAGAAAGGCTTGTGAGGACTGAGAATG 3' SCA8-R4 5' GGTCCTTCATGTTAGAAAACCTGGCT 3'	HS = 72°C - 10' HS = 94°C - 4' D = 94°C - 45'' A = 53°C - 1' 15'' E = 72°C - 1' 15'' 35 ciclos	6%

HS = Hot Start D = Desnaturação A = Anelamento E = Estensão

4.3. METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Para comparar os tipos de mutação com os aspectos clínicos, foi utilizado o teste Exato de Fisher.

Para comparar os grupos normal e afetado com o tamanho do alelo, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para comparar o tamanho dos alelos normais e expandidos com as variáveis sexo e transmissão, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para o grupo SCA3 e Mann-Whitney Exato para o grupo SCA1.

Para comparar o tamanho dos alelos normais e expandidos com a variável idade de início, foi utilizado o coeficiente de correlação Spearman (FLEISS, 1981; CONOVER, 1971).



5. RESULTADOS

Foram estudados cento e sessenta e três indivíduos perfazendo um total de 123 famílias, não relacionadas. Cinquenta e oito dessas famílias são acompanhadas no Ambulatório de Neurogenética e 65 famílias foram identificadas e enviadas por colaboradores de outros centros.

Cinquenta e dois indivíduos em estudo foram positivos para a mutação *SCA3/MJD* (41 famílias não relacionadas), 7 indivíduos foram positivos para *SCA1* (6 famílias não relacionadas), 2 indivíduos foram positivos para *SCA2* (2 famílias não relacionadas), 2 indivíduos foram positivos para *SCA7* (2 famílias não relacionadas) e nenhuma mutação foi encontrada para *SCA6*, *DRPLA* e *SCA8*. Portanto, 32% do total de casos (33% das famílias) apresentam a mutação *SCA3/MJD*, 4% apresentam a mutação *SCA1* (5% das famílias), 1% apresentam a mutação *SCA2* (2% das famílias) e 1% apresentam a mutação *SCA7* (2% das famílias) (Tabela 2)

Tabela 2: Relação entre o tipo de mutação, número de indivíduos positivos e a frequência.

MUTAÇÃO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	FREQUÊNCIA
SCA1	7	4%
SCA2	2	1%
SCA3/DMJ	52	32%
SCA7	2	1%

O tamanho dos alelos CAG normais encontrados no gene *SCA3/MJD* de pacientes variou de 12 a 31 CAGs e do alelo expandido variou de 63 a 78 CAGs. O tamanho dos alelos CAG normais encontrados no gene *SCA1* de pacientes variou de 30 a 33 CAGs e do alelo expandido variou de 48 a 57 CAGs. O tamanho do alelo CAG normal encontrados no gene *SCA2* de pacientes foi de 22 a 23 CAGs e do alelo expandido variou de 48 a 50 CAGs. O tamanho dos alelos CAG normais encontrados no gene *SCA7* de pacientes variou de 11 a 12 CAGs e do alelo expandido variou de 45 a 50 CAGs (Quadro 3)

Quadro 3: Variação dos tamanhos dos alelos normais e dos alelos expandidos para as mutações encontradas.

Mutação	Tamanho dos alelos normais	Tamanho dos alelos expandidos
SCA1	30 – 33 (CAG) _n	48 – 57 (CAG) _n
SCA2	22 – 23 (CAG) _n	48 – 50 (CAG) _n
SCA3/DMJ	12 – 31(CAG) _n	63 – 78 (CAG) _n
SCA7	11 – 12 (CAG) _n	45 – 50 (CAG) _n

Não se encontrou diferença significativa entre o tamanho do alelo CAG normal e as variáveis sexo e tipo transmissão (materna ou paterna) para os pacientes com a mutação *SCA1* (teste de Mann-Whitney, sexo $p=0.14$ e transmissão $p=0.57$). Essas comparações também não foram significativas no grupo de pacientes com a mutação *SCA3/MJD* (sexo $p=0.22$ e transmissão $p=0.42$). Também não se encontrou correlação entre o tamanho do alelo CAG expandido e as variáveis sexo e tipo de transmissão para os pacientes com a mutação *SCA1* (teste de Mann-Whitney, sexo $p=0.82$ e transmissão $p=0.42$). e *SCA3/MJD* (sexo $p=0.84$ e transmissão $p=0.54$) (Quadros 4, 5, 6, 7).

Quando se analisou a idade de início da doença e o tamanho dos alelos CAG (correlação de Spearman) viu-se que, na comparação entre o tamanho do alelo normal e a idade de início para as mutações *SCA1* e *SCA3/MJD* não foram encontradas qualquer relação (*SCA1* $p=0.55$ e *SCA3/MJD* $p=0.45$). No entanto, houve uma tendência, não

significativa estatisticamente, para a comparação entre o tamanho do alelo expandido e a idade de início para a mutação *SCA1* ($p= 0.06$); já para a mutação *SCA3/MJD*, tal correlação foi significativa, mostrando que quanto mais precoce a idade de início da doença maior é a expansão CAG ($p= 0.001$) (tabela 6,7,8 e 9).

Na comparação dos achados clínicos entre os pacientes com as mutações *SCA1* e *SCA3/MJD* encontrou-se que somente o achado de nistagmo se correlacionou significativamente com a presença da mutação *SCA3/MJD* (Fisher $p=0.036$) (Tabela 3 e 4).

Na análise do tamanho dos alelos CAG em 30 indivíduos normais, portanto 60 alelos CAG normais genotipados, encontrou-se que: para o gene *SCA1*, tais alelos variaram de 26 a 37 CAGs com média de 32.9 CAGs e mediana de 33 CAGs. Para o gene *SCA2*, os alelos normais da população controle variaram de 22 a 30 repetições CAG, com média de 22.3 CAGs e mediana de 22 CAGs. No gene *SCA3/MJD*, os alelos CAG normais variaram de 14 a 32 CAGs, com média de 22.6 CAGs e mediana de 23 CAGs. No gene *SCA6*, os alelos normais variaram de 5 a 20 CAGs com média de 12.2 CAGs e mediana 11.5 CAGs. No gene *SCA7*, a variação do alelo CAG normal foi de 7 a 16 CAGs com média de 10.3 CAGs e mediana de 10 CAGs. No gene *DRPLA*, os alelos normais da população brasileira estudada variaram de 8 a 19 CAGs com média de 12.6 CAGs e mediana de 13 CAGs. No gene *SCA8*, os alelos CTG normais variaram de 74 a 90 CTGs com média de 77.9 CTGs e mediana 76.5 CTGs. (Tabela 5)

Quadro 4: Características genéticas e moleculares dos 52 pacientes SCA3/ DMJ identificados.

Família	Amostra	Tamanho do Alelo Normal	Tamanho do Alelo Expandido	Transmissão	Sexo	Idade de Início
01	254/97	22 CAG	72 CAG	Materna	M	35 anos
01	59/97	22 CAG	68 CAG	Materna	M	29 anos
01	60/97	22 CAG	70 CAG	Materna	F	26 anos
03	259/97	22 CAG	75 CAG	Materna	M	12 anos
03	11/99	14 CAG	74 CAG	Materna	F	15 anos
05	278/97	14 CAG	71 CAG	Paterna	M	35 anos
05	290/98	22 CAG	73 CAG	Paterna	M	29 anos
05	64/98	22 CAG	70 CAG	Paterna	F	30 anos
09	192/97	22 CAG	78 CAG	Materna	F	18 anos
10	29/98	18 CAG	72 CAG	Materna	M	38 anos
10	30/98	28 CAG	78 CAG	Paterna	M	20 anos
13	176/97	14 CAG	76 CAG	Materna	F	30 anos
17	60/98	26 CAG	77 CAG	Materna	M	19 anos
19	322/97	14 CAG	70 CAG	Paterna	M	43 anos
19	323/97	14 CAG	65 CAG	Paterna	M	41 anos
22	178/98	22 CAG	69 CAG	Paterna	M	30 anos
22	630/98	22 CAG	68 CAG	Materna	M	52 anos
24	84/98	22 CAG	75 CAG	Materna	M	21 anos
30	381/98	14 CAG	71 CAG	Paterna	F	36 anos
41	497/98	31 CAG	75 CAG	Materna	F	33 anos
43	499/98	22 CAG	69 CAG	Materna	M	40 anos
46	519/98	20 CAG	77 CAG	Paterna	F	23 anos
48	521/98	29 CAG	75 CAG	Materna	F	14 anos
50	547/98	12 CAG	68 CAG	Paterna	M	46 anos
55	485/98	22 CAG	67 CAG	Materna	F	58 anos
56	75/99	22 CAG	74 CAG	Materna	M	29 anos

Continuação do Quadro 4

Família	Amostra	Tamanho do Alelo Normal	Tamanho do Alelo Expandido	Transmissão	Sexo	Idade de Início
56	74/99	22 CAG	71 CAG	Materna	F	33 anos
59	632/98	22 CAG	69 CAG	Paterna	F	46 anos
72	88/99	22 CAG	66 CAG	Caso isolado	F	38 anos
78	95/99	22 CAG	75 CAG		F	37 anos
81	114/99	22 CAG	76 CAG	Materna	F	33 anos
82	119/99	22 CAG	73 CAG	Caso isolado	M	40 anos
84	177/99	14 CAG	71 CAG	Materna	F	24 anos
85	207/99	19 CAG	68 CAG	Paterna	M	39 anos
87	685/98	22 CAG	72 CAG	Materna	F	58 anos
89	320/99	27 CAG	70 CAG	Materna	F	35 anos
89	321/99	23 CAG	69 CAG	Materna	F	70 anos
93	383/99	21 CAG	68 CAG	Materna	F	46 anos
94	456/99	27 CAG	65 CAG	Materna	F	53 anos
99	498/99	23 CAG	63 CAG	Materna	F	55 anos
101	507/99	30 CAG	70 CAG	Paterna	M	35 anos
101	508/99	27 CAG	63 CAG	Paterna	F	50 anos
102	511/99	14 CAG	78 CAG	Paterna	M	14 anos
103	520/99	27 CAG	71 CAG	Paterna	F	18 anos
104	524/99	14 CAG	70 CAG	Paterna	F	35 anos
105	532/99	22 CAG	64 CAG	Paterna	M	54 anos
108	578/99	14 CAG	68 CAG	Materna	M	52 anos
112	21/00	22 CAG	68 CAG	Paterna	F	35 anos
115	59/00	20 CAG	72 CAG	Paterna	F	25 anos
117	76/00	14 CAG	68 CAG	Materna	F	47 anos
121	118/00	24 CAG	72 CAG	Paterna	F	25 anos
123	126/00	26 CAG	70 CAG	Paterna	F	18 anos

Quadro 5: Características genéticas e moleculares dos 7 pacientes SCA1 identificados

Família	Amostra	Tamanho do Alelo Normal	Tamanho do Alelo Expandido	Transmissão	Sexo	Idade de Início
04	261/97	32 CAG	57 CAG	Paterna	M	25 anos
06	261/98	33 CAG	55 CAG	Paterna	F	37 anos
08	695/98	30 CAG	51 CAG	Paterna	M	28 anos
08	694/98	30 CAG	48 CAG	Paterna	M	36 anos
20	108/98	31 CAG	48 CAG	Materna	F	51 anos
29	280/98	33 CAG	48 CAG	Materna	F	42 anos
38	493/98	31 CAG	48 CAG	Paterna	M	38 anos

Quadro 6: Características genéticas e moleculares de 2 pacientes SCA2 identificados.

Família	Amostra	Tamanho do Alelo Normal	Tamanho do Alelo Expandido	Transmissão	Sexo	Idade de Início
49	522/98	22 CAG	50 CAG	Materna	F	41 anos
120	117/00	22CAG	48 CAG	Materna	F	38 anos

Quadro 7: Características genéticas e moleculares dos 2 pacientes SCA7 identificados.

Família	Amostra	Tamanho do Alelo Normal	Tamanho do Alelo Expandido	Transmissão	Sexo	Idade de Início
68	34/99	12 CAG	45 CAG	Paterna	M	29 anos
69	72/99	11 CAG	50 CAG	Materna	M	15 anos

Tabela 3: Avaliação clínica de 7 indivíduos com SCA1.

AValiação Clínica	Nº Indivíduos	%
Diagnóstico de ataxia	7	100
Disartria	7	100
Incoordenação dos membros inferiores	7	100
Incoordenação de marcha	7	100
Incoordenação dos membros superiores	6	85
Movimentos oculares anormais	4	57
Nistagmo	3	43
Disfagia	3	43
Alterações cognitivas	2	29
Movimentos sacádicos lentos	2	29
Tremor	2	29
Cãibras musculares	1	15
Sinais extrapiramidais	1	15
Diminuição da acuidade visual	0	0
Atrofia óptica	0	0
Retinite pigmentosa	0	0
Diminuição da acuidade auditiva	0	0
Fasciculações dos membros	0	0
Fasciculações faciais	0	0
Fasciculações peitorais	0	0
Fasciculações linguais	0	0
Movimentos involuntários	0	0
Distonia	0	0

Tabela 4: Avaliação clínica de 52 indivíduos com SCA3/ MJD.

AVALIAÇÃO CLÍNICA	NºIndivíduos	%
Diagnóstico de ataxia	52	100
Incoordenação de marcha	52	100
Incoordenação dos membros inferiores	45	87
Movimentos oculares anormais	45	87
Nistagmo	45	87
Disartria	45	87
Incoordenação dos membros superiores	40	79
Disfagia	29	56
Cãibras musculares	28	54
Sinais extrapiramidais	17	33
Movimentos sacádicos lentos	15	29
Fasciculações linguais	15	29
Tremor	13	25
Fasciculações faciais	13	25
Fasciculações dos membros	12	22
Fasciculações peitorais	11	21
Diminuição da acuidade visual	10	19
Distonia	9	17
Movimentos involuntários	4	8
Alterações cognitivas	3	6
Atrofia óptica	3	6
Diminuição da acuidade auditiva	3	6
Retinite pigmentosa	0	0

Tabela 5: Variação dos tamanhos dos alelos normais, média e mediana analisados 30 indivíduos normais (60 alelos) para cada mutação estudada.

Mutação	Tamanho dos alelos normais	Média	Mediana
SCA1	26 – 37 (CAG) _n	32.9	33
SCA2	22 – 30 (CAG) _n	22.3	22
SCA3/DMJ	14 – 32 (CAG) _n	22.6	23
SCA6	5 – 20 (CAG) _n	12.2	11.5
SCA7	7 – 16 (CAG) _n	10.3	10
SCA8	74 – 90 (CTG) _n	77.9	76.5
DRPLA	8 – 19 (CAG) _n	12.6	13

Tabela 6: Localização mais comum, variação de frequência no Brasil em relação a cada uma das mutações (SCA1, SCA2, SCA3/DMJ e SCA7).

Mutação	Localização mais comum	Variação de frequência no Brasil
SCA1	Italiana e europeus orientais	6 / 5 %
SCA2	Mexicanos, negros norte-americanos, franceses e suecos	9 / 2%
SCA3/DMJ	Portugueses e açorianos	30 / 33%
SCA7	Várias origens geográficas	0 / 2%



6. DISCUSSÃO

A mutação *SCA1* já foi encontrada em famílias com diferentes origens étnicas e geográficas, porém tem sido mais freqüentemente relatada em famílias de descendência italiana e entre europeus orientais (RANUM et al., 1994a; SILVEIRA et al., 1996; LOPES-CENDES et al., 1997a). Em famílias norte-americanas, a freqüência da mutação *SCA1* é de 3 a 10% (RANUM et al., 1994a; SILVEIRA et al., 1996) e, em famílias brasileiras, a anterior relatada foi de 6% (LOPES-CENDES et al., 1997a). Tal relato prévio na população brasileira é bem semelhante à proporção encontrada nesse estudo atual, que foi de 5% (Tabela 5).

A mutação *SCA2* tem sido relatada como a segunda causa mais freqüente de ataxia dominante em populações mistas, com uma freqüência de 13 a 24% em pacientes mexicanos, negros norte-americanos, franceses e suecos (GESCHWIND et al., 1997; SCHOOLS et al., 1997). Em famílias brasileiras, a freqüência previamente estabelecida foi de 9% (LOPES-CENDES et al., 1997a), o que foi diferente do encontrado nessa amostra atual de pacientes, apenas 2% (Tabela 6).

A mutação *SCA3/MJD* é relatada como a mais freqüente em populações portuguesas e açorianas, mas é também responsável por aproximadamente 20% de todos os casos, na população não portuguesa na América do Norte (SILVEIRA et al., 1996; RANUM et al., 1995). No Brasil, tem sido relatada como a forma mais freqüente de AEC autossômica dominante, com uma freqüência de aproximadamente 30% em relatos anteriores (LOPES-CENDES et al., 1997a; LOPES-CENDES et al., 1997c). Os achados do estudo atual estão de acordo com os dados previamente apresentados para a população brasileira, freqüência de 33% (Tabela 6).

A mutação *SCA7* foi encontrada em indivíduos de várias origens geográficas: Bélgica, França, Inglaterra, Suécia, Noruega, EUA, Brasil, Israel, Holanda, Argélia, Tunísia, Coreia e África do Sul (STEVANIN et al., 1998). Sua freqüência, porém, para a população brasileira não havia sido estimada anteriormente. No presente estudo, encontrou-se uma freqüência de 2% (Tabela 6).

Relatos anteriores não detectaram a mutação no gene *DRPLA* na população (LOPES-CENDES et al., 1997a), o mesmo foi encontrado no presente estudo. Existem alguns relatos prévios do encontro de mutações *SCA6* e *SCA8* em pacientes brasileiros,

porém suas frequências na nossa população não foi estimada (SILVEIRA et al. 2000). Esse estudo não identificou nenhum paciente com essas mutações, o que indica que tais tipos de AEC são raros na população brasileira.

Muito se tem especulado sobre as diferenças clínicas entre os pacientes com os diversos tipos de AEC e pode-se ter uma idéia *a priori* do tipo de mutação, com base na apresentação clínica (ARRUDA E TEIVE et al., 1997). Esses dados indicam que existe grande heterogeneidade clínica entre pacientes com SCA1 e SCA3/DMJ (os únicos dois grupos com número suficiente de pacientes para serem analisados), sendo que apenas a presença mais freqüente de nistagmo foi encontrada entre os pacientes com SCA3/DMJ (87%) em comparação com os pacientes com SCA1 (43%), $p=0,036$). Esse estudo demonstrou que o tamanho dos alelos normais nas seqüências CAG dos genes SCA1, SCA2, SCA3/DMJ, SCA6, SCA7, DRPLA e da seqüência CTG no gene SCA8 não diferem significativamente dos valores relatados na literatura (Quadro 2 e 3). Além disso, não se encontrou nenhuma sobreposição entre os tamanhos dos alelos normais e expandidos, o que permitiu o diagnóstico molecular de certeza em todos os casos analisados. Esses resultados são de grande importância prática, pois auxiliam na orientação do diagnóstico molecular dos pacientes com AEC no Brasil. Com base nesses achados pode-se recomendar que, em primeiro lugar, seja pesquisada a mutação SCA3/DMJ, seguida da SCA1, SCA2, SCA7 e, somente depois dessas serem negativas, haveria indicação para a pesquisa das mutações SCA6, SCA8 e DRPLA.

A recomendação para seqüência da pesquisa das mutações também está relacionada com a distribuição étnica do Brasil, em razão da imigração para cada uma das regiões brasileiras, e devido a nossa colonização ser portuguesa, estes fatores fazem com que a primeira mutação a ser estudada seja a mutação SCA3/DMJ (Tabela 6).



7. CONCLUSÃO

- O diagnóstico molecular foi possível em 38% dos indivíduos com o diagnóstico clínico de AEC, sendo a mutação *SCA3/DMJ* a mais freqüente em nosso meio.
- Os estudos moleculares foram importantes para estabelecer quais as formas de AEC mais freqüentes em nosso meio e assim orientar o diagnóstico clínico e molecular.
- Uma correlação inversa entre o número de repetições trinucleotídicas CAG e a idade de início dos sintomas clínicos foi identificada entre os indivíduos com AEC autossômicas dominantes analisados.
- A caracterização molecular das AEC autossômicas dominantes, em todas as amostras analisadas, quanto a variações dos alelos CAG e CTG normais e expandidos se mostraram condizentes com achados mundiais.



8. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ARRUDA, W.O.; TEIVE, H.A.- Hereditary cerebellar ataxias: from hammer to genetics. *Arq Neuropsiquiatr*, **55(3B)**: 666-76. 1997.
- BEN HAMIDA, C.; DOERFLINGER, N.; BELAL, S.- Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet*, **5**: 195-200. 1993.
- BENOMAR, A.; KROLS, L.; STEVANIN, G.- The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p 12- p21.1. *Nat Genet*, **10**: 84- 8. 1995.
- CHAMBERLAIN, S.; SHAW, J.; ROWLAND, L.P.- Mapping of the mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*, **21**: 248-50. 1988.
- CONOVER, W.J.- **Practical nonparametric statistics**. Nova Iorque: John wiley & Sons Inc. 1971.
- COUTINHO, P.- **Doença de Machado-Joseph: Estudo Clínico, Patológico e Epidemiológico de uma Doença Neurológica de Origem Portuguesa**. Grande Prémio BIAL de Medicina , Portugal, Tipografia Nunes Lda, Porto, 1994.
- DAVID, G.; ABBAS, N.; STEVANIN, G.; DURR, A.; YVERT, G.; CANCEL, G.; WEBER, C.; IMBERT, G.; SAUDOU, F.; ANTONIOU, E.; DRABKIN, H.; GEMMILL, R.; GIUNTI, P.; BENOMAR, A.; WOOD, N.; RUBERG, M.; AGID, Y.; MANDEL, J.L.; BRICE, A. - Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics*, **17**: 65-70. 1997.
- DAVIES, S.W.; TURMAINE, M.; COZENS, B.A.; DIFIGLIA, M.; SHARP, A.H.; ROSS, C.A.; SCHERZINGER, E.; WANKER, E.E.; MANGIARINI, L.; BATES, G.P.- Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**: 537-548. 1997.
- DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K.O.; DAVIES, S.W.; BATES, G.P.; VONTASSEL, J.P.; ARONIN, N.- Agregation of huntingtin in intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, **277**: 1990-3. 1997.

FLANIGAN, K.; GARDNER, K.; ALDERSON, K.- Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4):clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. **Am J Hum Genet**, **59**: 392-9. 1996.

FLEISS, J.L.- **Statistical methods for rates and proportions**. Nova Iorque: John wiley & Sons Inc. 1981.

FRIEDREICH, N.- Über Ataxie mit besonder Berücksichtigung der hereditären formen. **Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Psysiologie**, **68**: 145-254. 1876.

GESHWIND, W.D.H.; PERLMAN, S.; FIGUEROA, C.P.; TREIMAN, L.J.; PUST, S.- The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ayaxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal domonant cerebellar ataxia. **Am J Hum Genet**, **60**: 842-50. 1997.

GISPERT, S.; TWELLS, R.; OROZCO, G.- Chorosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. **Nat Genet.**, **4**: 295-9.1993.

GREENFIELD, J.D. - **The spino-cerebellar degenerations**. Springfield: Charles C. Thomas, 1954.

GUDMUNDSSON, K.- The prevalence and occurrence of some rare neurological diseases in Iceland. **Acta Neurol Scand** , **45**: 114 -8. 1969.

HACKAM, A.S.; WELLINGTON, C.L.; HAYDEN, M.R.- The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. **Clin Genet**, **54** (Suppl 1): 23-32. 1998.

HARDING, A.E. - **The hereditary ataxias and related disorders**. London: Churchill Livingstone, 1986.

HAYES, S.; LOPES-CENDES, I.; ANDERMANN, E.- Investigation of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in a groyp of spinocerebellar ataxia patients: frequency, allele distribution and clinical features. **Am J Hum Genet**, **61**: A310. 1997.

- HERMAN-BERT, A.; STEVANIN, G.; NETTER, J.C.; RASCOL, O.; BRASSAT, D.; CALVAS, P.; CAMUZAT, A.; YUAN, Q.; SCHALLING, M.; DURR, A.; BRICE, A.- Mapping of spinocerebellar ataxia 13 to chromosome 19q13.3-q13.4 in a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and mental retardation. **Am J Hum Genet**, **67**: 229-35. 2000.
- HOLMES, S.E.; O'HEARN, E.E.; MCINNIS, M.G.; GORELICK-FELDMAN, D.A.; KLEIDERLEIN, J.J.; CALLAHAN, C.; KWAK, N.G.; INGERSOLL-ASHWORTH, R.; SHERR, M.; SUMNER, A.; SHARP, A.H.; ANANTH, U.; SELTZER, W.K.; BOSS, M.A.; VIEIRA-SAECKER, A.M.; EPPLIN, J.T.; RIESS, O.; ROSS, C.A.; MARGOLIS, R.- Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. **Nat Genet**, **23**: 391-2. 1999.
- HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, THE.- A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, **72**: 971-83. 1993.
- IKEDA, H.; YAMAGUCHI, M.; SUGAI, S.; AZE, Y.; NARUMIYA, S.; KAKIZUKA, A.- Expanded polyglu in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. **Nat Genet**, **13**: 196-202. 1996.
- ISHIKAWA, K.; TANAKA, H.; SAITO, M.- Japanese Families with Autosomal Dominant Pure Cerebellar Ataxia map to Chromosome 19p 13. 1-p13-2 and Are Strongly Associated with Mild CAG Expansions in the Spinocerebellar Ataxia Type 6 Gene in Chromosome 19p 13.1. **Am J Hum Genet**, **61**: 336-46. 1997.
- JODICE, C.; FRONTALI, M.; PERSICHETTI, F.- The gene for spinal cerebellar ataxia 1 (SCA1) is flanked by two closely linked highly polymorphic microsatellite loci. **Hum Mol Genet**, **2**: 1383-7. 1993.
- KAKIZUKA, A.- Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? **Trends in Genetics**, **14**: 396-402. 1998.

KAWAGUCHI, Y.; OKAMOTO, T.; TANIWAKI, M.; AIZAWA, M.; INOUE, M.; KATAYAMA, S.; KAWAKAMI, H.; NAKAMURA, S.; NISHIMURA, M.; AKIGUCHI, I.- CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. **Nat. Genet** , **8**: 221-8. 1994.

KOIDE, R.; IKEUCHI, T.; ONODERA, O.- Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). **Nat Genet**, **6**: 9-13. 1994.

KOOB, M.D.; MOSELEY, M.L.; SCHUT, L.J.- A untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). **Nat Genet**, **21**: 379-84. 1999.

LA SPADA, A.R.; WILSON, E.M.; LUBAHN, D.B.; HARDING, A.E.; FISCHBECK, K.H.- Androgen receptor gene mutation in X-linked spinal and muscular atrophy. **Nature**, **352**: 7-79. 1991.

LOPES-CENDES, I.- **Clinical and Genetic Heterogeneity in Dominantly Inherited Spinocerebellar Ataxias**. Montreal, Canada, 1993. Master's Degree Thesis - McGill University.

LOPES-CENDES, I.; ANDERMANN, E.; ATTIG, E. - Confirmation of the SCA2 locus as an alternative locus for dominantly inherited spinocerebellar ataxias and refinement of the candidate region. **Am J Hum Genet.**, **54**: 774-81. 1994.

LOPES-CENDES, I.; TEIVE, H.G.A.; CALCAGNOTTO, M.A.- Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. **Arq Neuropsiquiatr**, **55**: (3-B): 519-29. 1997a.

LOPES- CENDES, I.; ANDERMANN, E.; HAYES, S.- Clinical, genetic and molecular studies in spinocerebellar ataxia type 2. **J Neurol Sci.**, **150** (suppl): S41. 1997b.

LOPES-CENDES, I.; TEIVE, H.G.A.; CARDOSO, F.- Molecular characteristics of Machado- Joseph disease mutation in 25 newly described Brazilian Families. **Brazilian Journal of Genetics**, **20**: 717-24. 1997c.

- MATSUYAMA, Z.; KAWAKAMI, H.; MARUYAMA, H.- Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). **Human Molecular Genetics**, 6: 1283-4. 1997.
- MIYOSHI, Y.; YAMADA, T.; TANIMURA, M.; TANIWAKI, T.; ARAKAWA, K.; OHYAGI, Y.; FURUYA, H.; YAMAMOTO, K.; SAKAI, K.; SASAZUKI, T.; IRA, J. - A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1. **Neurology**, 57(1): 96-100. 2001.
- NAGAFUCHI, S.; YANAGISAWA, H.; SATO, K.- Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable GAG trinucleotide on chromosome 12p. **Nat Genet.**, 6: 14-8. 1994.
- NAKAMURA, K.; JEONG, S.Y.; UCHIHARA, T.; ANNO, M.; NAGASHIMA, K.; NAGASHIMA, T.; IKEDA, S.; TSUJI, S.; KANAZAWA, I.- SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. **Hum Mol Genet**, 10(14): 1441-8. 2001.
- NAKANO, K.K.; DAWSON, D.M.; SPENCE, A.- Machado disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. **Neurology**, 22: 49-55. 1972.
- NIKALI, K.; SOUMALAINEN, A.; TERWILLIGER, J.- Random search for shared chromosomal regions in four affected individuals: the assignment of a new hereditary ataxia locus. **Am J Hum Genet**, 56: 1088-95. 1995.
- OPHOFF, R.A.; TERWINDT, G.M.; VERGOUWE, M.N.- Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{++} channel gene CACNL1A4. **Cell**, 87: 543-52. 1996.
- ORR, H.T.; CHUNG, M.Y.; BANFI, S.; KWIATKOWSKI, T.J.JR; SERVADIO, A.; BEAUDET, A.L.; MCCALL, A.E.; DUVICK, L.A.; RANUM, L.P.; ZOGHBI, H.Y. - Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. **Nature Genet**, 4: 221-6. 1993.

PAULSON, H.L.- Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the fold. **Am J Hum Genet**, **64**: 339-45. 1999.

PULST, S.M.; NECHIPORUK, A.; NECHIPORUK, T.; GISPert, S.; CHEN, X.N.; LOPES-CENDES, I.; PEARLMAN, S.; STARKMAN, S.; OROZCO-DIAZ, G.; LUNKES, A.; DEJONG, P.; ROULEAU, G.A.; AUBURGER, G.; KORENBERG, J.R.; FIGUEROA, C.; SAHBA, S. - Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. **Nat.Genet**, **14**: 269-76. 1996.

RANUM, L.P.W.; CHUNG, M.; BANFI, S.- Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. **Am J Hum Genet**, **55**: 244-52. 1994a.

RANUM, L.P.W.; SCHUT, L.J.; LUNDGREN, J.K.; ORR, H.T.- Livingston, D.,M. Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. **Nat Genet**, **8**: 280-4. 1994b.

RANUM, L.P.W.; LUNDGREN, J.K.; SCHUT, L.J. - 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**: 603-8. 1995.

RICHTER, A.; RIOUX, J.D.; BOUCHARD, J.P.; MERCIER, J.; MATHIEU, J.; GE, B.; POIRIER, J.; JULIEN, D.; GYAPAY, G.; WEISSENBAACH, J.; HUDSON, T.J.; MELANCON, S.B.; MORGAN, K.- Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11. **Am J Hum Genet**, **64**(3): 768-75. 1999.

ROBITAILLE, Y.; SCHUT, L.; KISH, S.J.- Structural and immunocytochemical features of olivopontocerebellar atrophy caused by the SCA1 mutation define a unique phenotype. **Acta Neuropathol**, **90**: 572-81. 1995.

ROSENBERG, R.N.- Autosomal dominant cerebellar phenotype: the genotype will settle the issue. **Neurology**, **40**: 1329-31. 1990.

- ROSS, C.A.- When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. **Neuron**, **15**: 493-6. 1995.
- SALINAS, F.; ORTEGA, G.; MOLINA, M.; GARRE, J.; NAVARRETE, A.; PEREZ, V.; CARMENA, R.- Ataxia – telangiectasia with immunodeficiency and malignant lymphoma. Report of two cases. **Med Clin**, **76(3)**: 109-12. 1981.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.- **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SCHMITT, I.; EPPLEAN, J.T.; RIESS, O.- Predominant neuronal expression of the gene responsible for dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) in rat. **Hum Molec Genet**, **9**: 1619-24. 1995.
- SCHOLS, I.; AMOIRIDIS, G.; BUTTNER, T.; PRZUNTEK, H.; EPPLEN, J.; RIESS, O.- Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? **Ann Neurol**, **42**: 924-32. 1997
- SCHUT, J.W.- Hereditary ataxia, clinical study through six generations. **Arch Neurol Psych**, **63**: 535-68. 1950.
- SILVEIRA, I.; LOPES-CENDES, I.; KISH, S.; MACIEL, P.; GASPAR, C.; COUTINHO, P.; BOTEZ, M.I.; TEIVE, H.; ARRUDA, W.; STEINER, C.E.; PINTO-JUNIOR, W.; MACIEL, J.A.; JERIN, S.; SACK, G.; ANDERMANN, E.; SUDARSKY, L.; ROSENBERG, R.; MACLEOD, P.; CHITAYAT, D.; BABUL, R.; SEQUEIROS, J.; ROULEAU, G.A. - Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. **Neurology**, **46**: 214-8. 1996.
- SILVEIRA, I.; ALONSO, I.; GUIMARAES, L.; MENDONÇA, P.; SANTOS, C.; MACIEL, P.; FIDALGO DE MATOS, J.M.; COSTA, M.; BARBOT, C.; TUNA, A.; BARROS, J.; JARDIM, L.; COUTINHO, P.; SEQUEIROS, J.- High germinal instability of the (CTG)_n at the SCA8 locus of both expanded and normal alleles. **Am J Hum Genet**, **66(3)**: 830-40. 2000.

SKINNER, P.J.; KOSHY, B.T.; CUMMINGS, C.J.; KLEMENT, I.A.; HELIN, K.; SERVADIO, A.; ZOGHBI, H.Y.- Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. **Nature**, **389**: 971-4. 1997.

SMITH, J.K.- Dentatorubropallidoluysian atrophy. In: Vinken PJ, Bruyn GW ed. **Handbook of Clinical Neurology**, **21**: 519-34. 1975.

STEVANIN, G.; DAVID, G.; ABBAS, N.; DURR, A.; HOLMBERG, M.; DUYCKAERTS, C.; GIUNTI, P.; CANCEL, G.; RUBERG, M.; MANDEL, J.L.; BRICE, A.- Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7). In: Rubinsztein DC and Hayden MR, editores. **Analysis on triplet repeat disorders**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1998.

SUTHERLAND, G.R.; RICHARDS, R.I.- Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. **Proc Natl Acad Sci**, **92**: 3636-41. 1995.

TAKIYAMA, Y.; NISHIZAWA, M.; TANAKA, H.- The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. **Nat Genet.**, **4**: 300-4. 1993.

WARNER, T.T.; WILLIAMS, L.D.; WALKER, R.W.H.- A Clinical and molecular genetic study of dentatorubropallidoluysian atrophy in four European families. **Ann Neurol.**, **35**: 452-9. 1995.

WORTH, P.F.; GIUNTI, P.; GARDNER-THORPE, C.; DIXON, P.H.; DAVIS, M.B.; WOOD, N.W.- Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3. **Am J Hum Genet**, **65**: 420-6. 1999.

YAKURA, H.; WAKISAKA, A.; FUJIMOTO, S.; ITAKURA, K.- Hereditary ataxia and HLA genotypes. **N Engl J Med**, **291**: 154-5. 1974.

YAMASHITA, I.; SASAKI, H.; YABE, I.; FUKAZAWA, T.; NOGOSHI, S.; KOMEICHI, K.; TAKADA, A.; SHIRAISHI, K.; TAKIYAMA, Y.; NISHIZAWA, M.; KANEKO, J.; TANAKA, H.; TSUJI, S.; TASHIRO, K.- A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q 13.4qter. **Ann Neurol**. **48(2)**: 156-63. 2000.

ZHUCHENKO, O.; BAILEY, J.; BONNEN, P.; ASHIZAWA, T.; STOCKTON, D.W.; AMOS, C.; DOBYNS, W.B.; SUBRAMONY, S.H.; ZOGHBI, H.Y.; LEE, C.C. - Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} - voltage-dependent calcium channel. **Nat Genet**, **15**: 62-9. 1997.

ZOGHBI, H.Y.; JODICE, C.; SANDKUIJL, L.A.; KWIATKOWSKI, T.J. JR; MCCALL, A.E.; HUNTOON, S.A.; LULLI, P.; SPADARO, M.; LITT, M.; CANN, H.M.- The gene for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA 1) 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. 1991.

ZOGHBI, H.Y.- The expanding world of ataxins. **Nat Genet**, **14**: 237-8. 1996.

ZU, L.; FIGUEROA, K.P.; GREWAL, R.- Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22. **Am J Hum Genet**, **64**: 594-9. 1999.



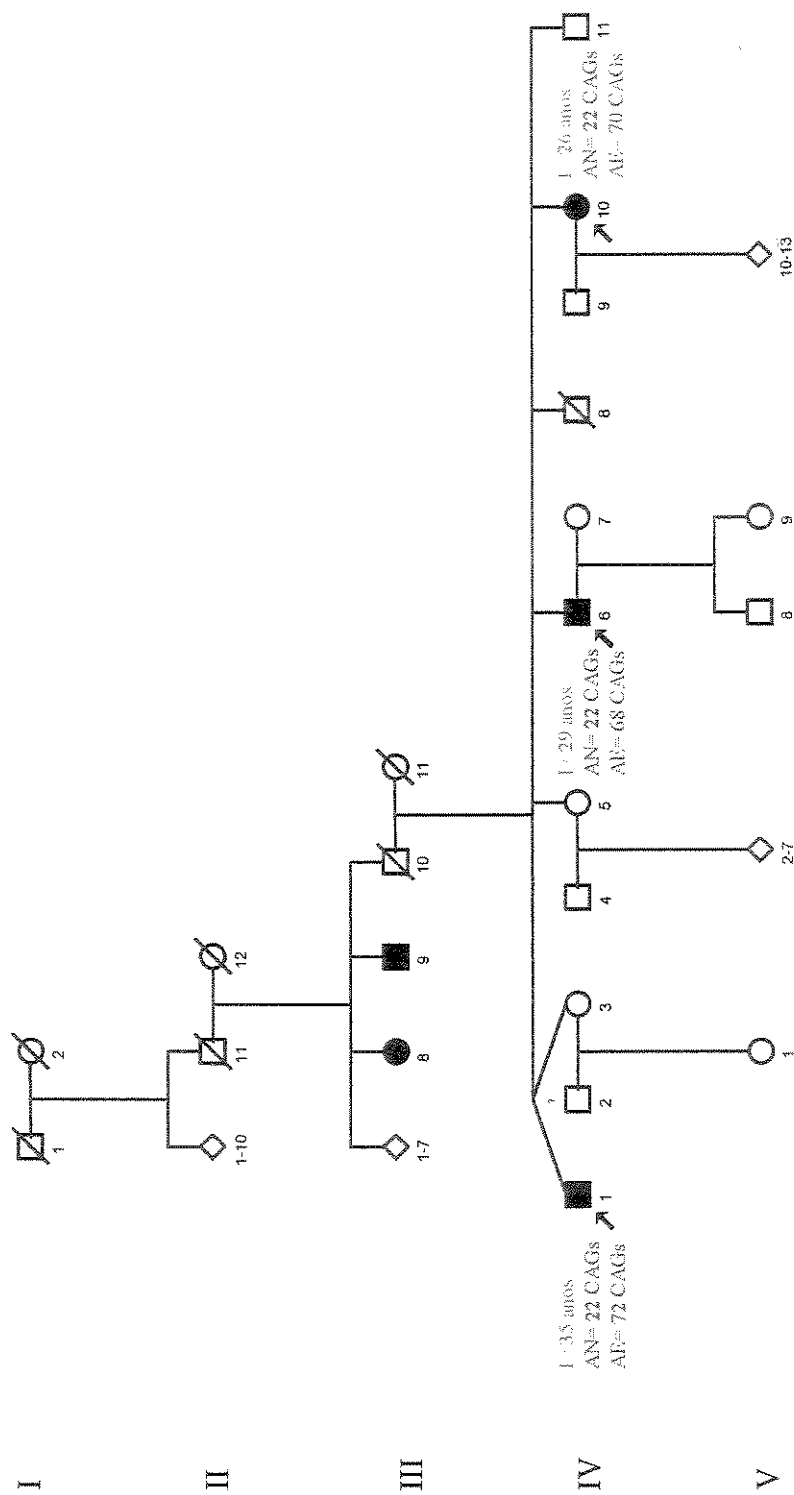
9. ANEXOS

***HEREDOGRAMAS DAS 41 FAMÍLIAS
POSITIVAS PARA SCA3/DMJ***

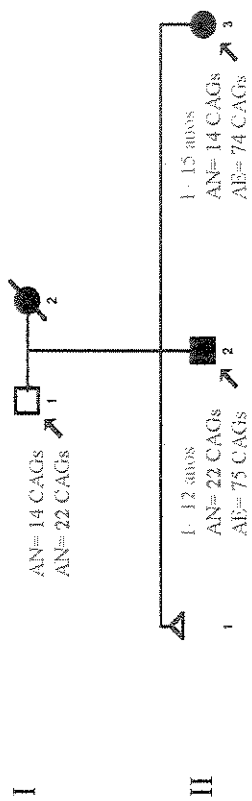
Legenda

	Indivíduo do sexo masculino normal
	Indivíduo do sexo feminino normal
	Indivíduo do sexo masculino possivelmente afetado
	Indivíduo do sexo feminino possivelmente afetado
	Indivíduo do sexo masculino afetado
	Indivíduo do sexo feminino afetado
	Indivíduo de sexo desconhecido
	Aborto espontâneo

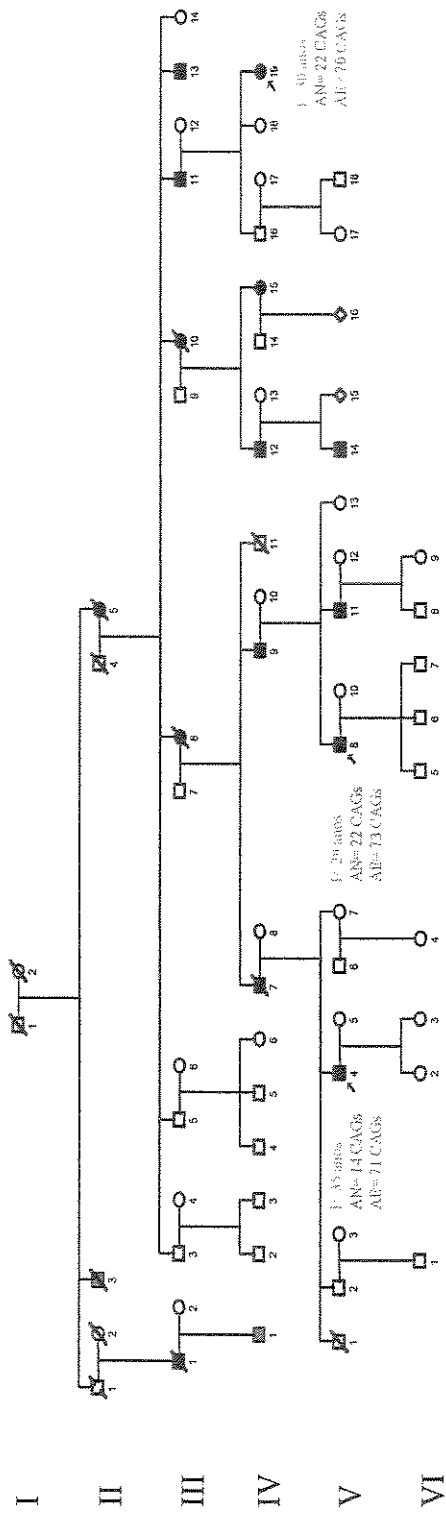
F-01



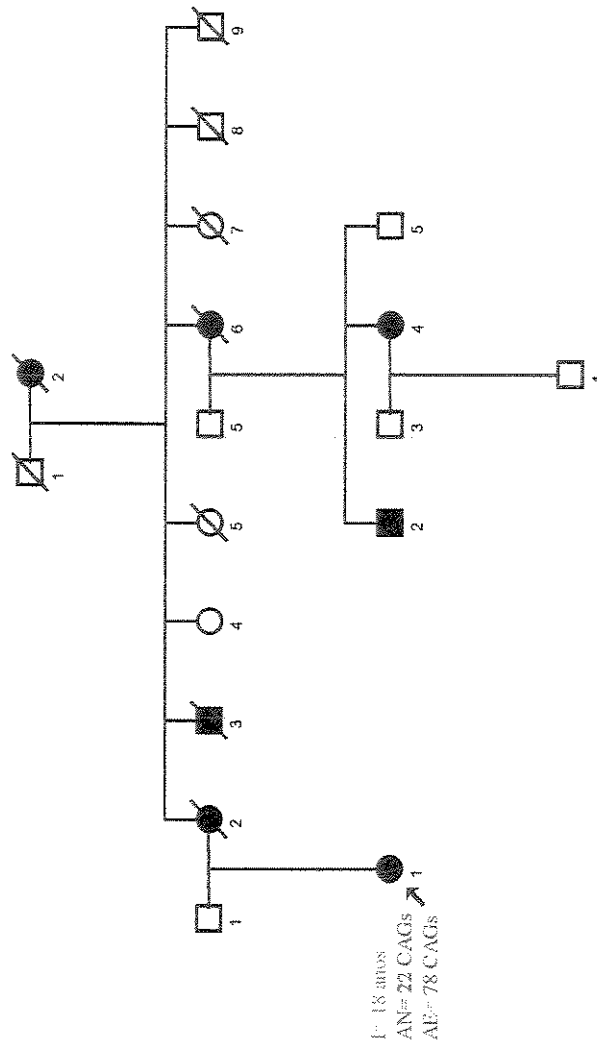
F-03



F-05



F-09



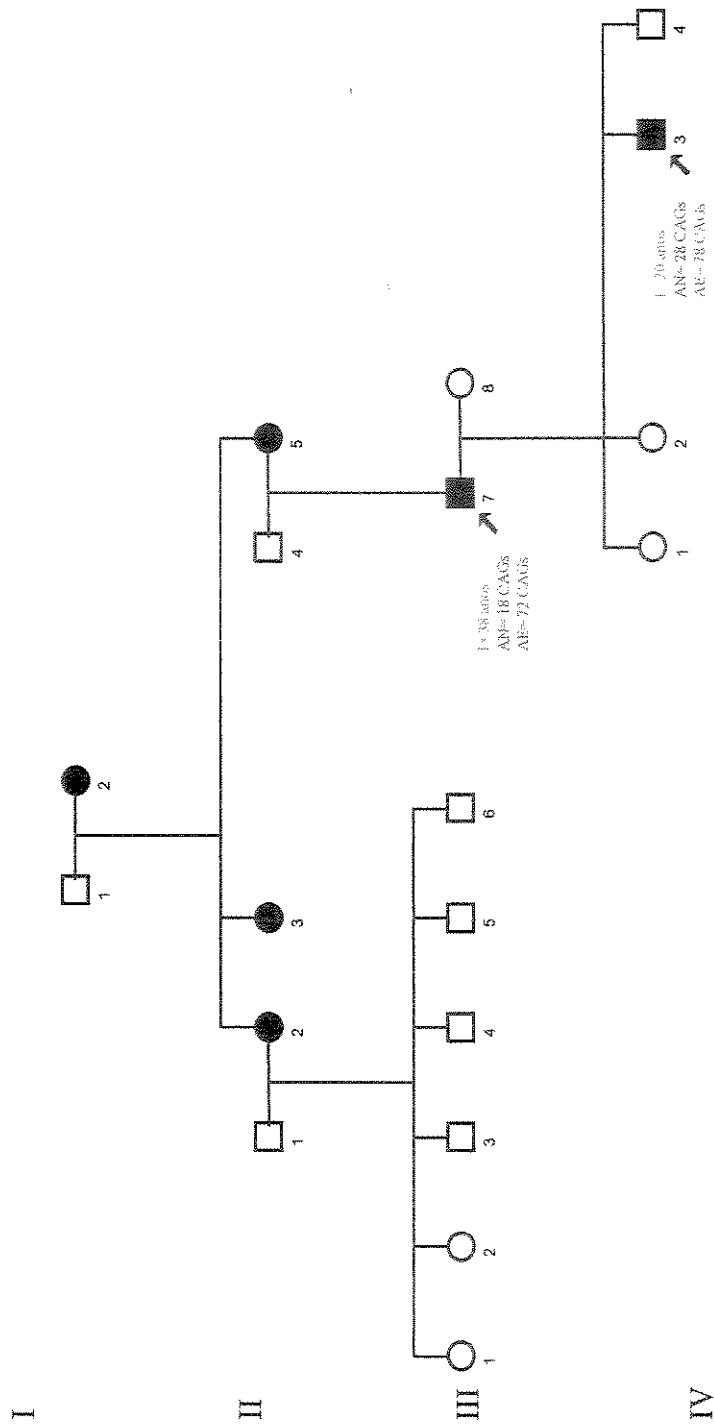
I

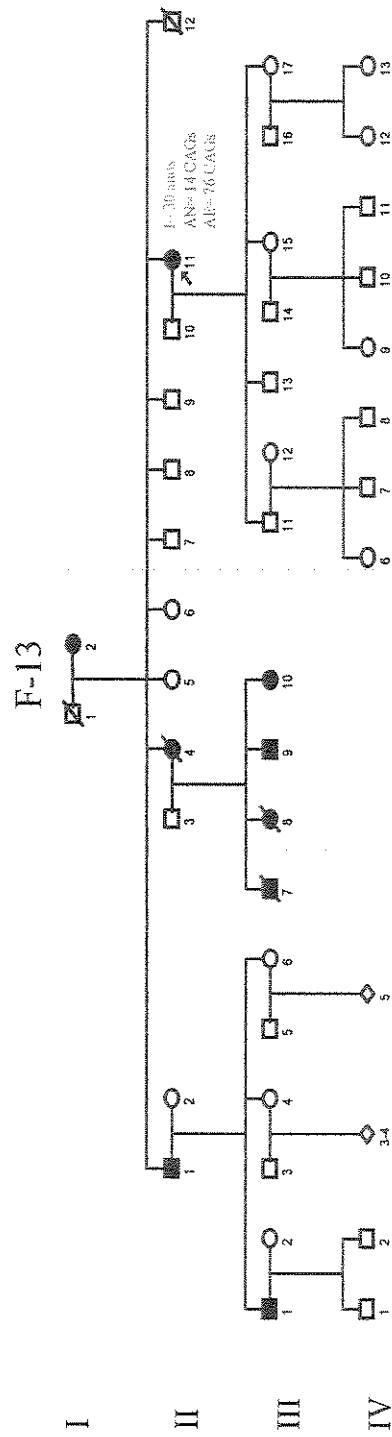
II

III

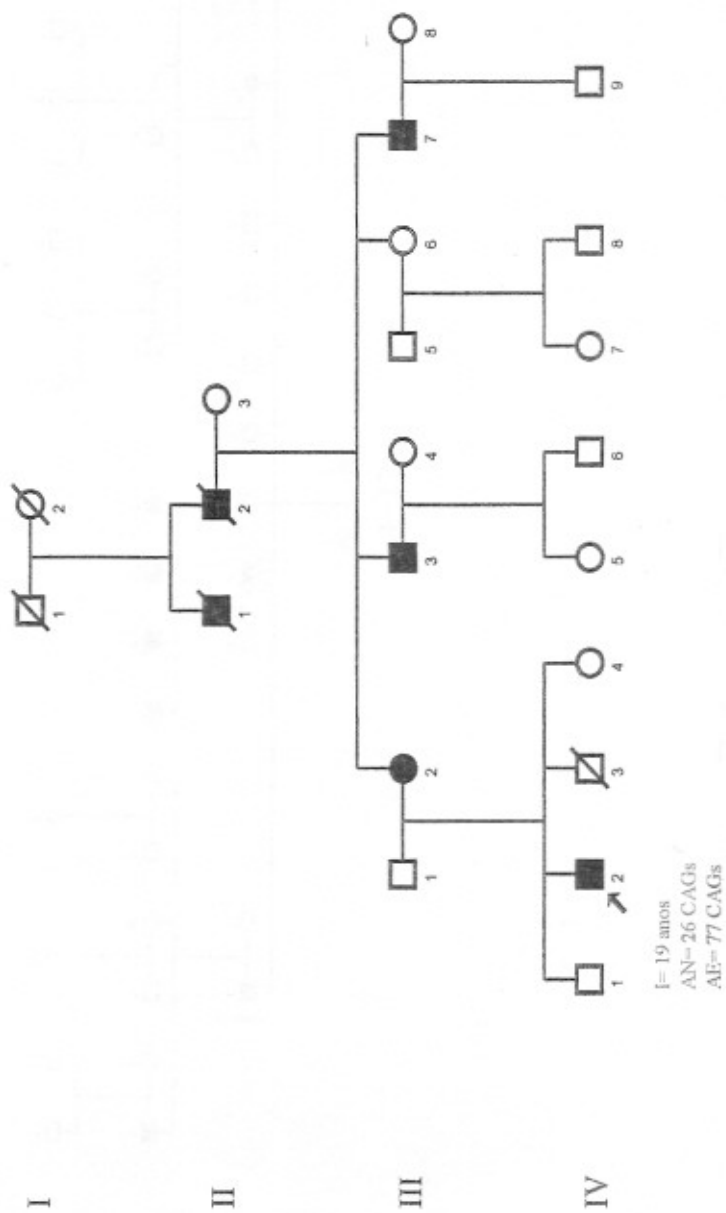
IV

F-10

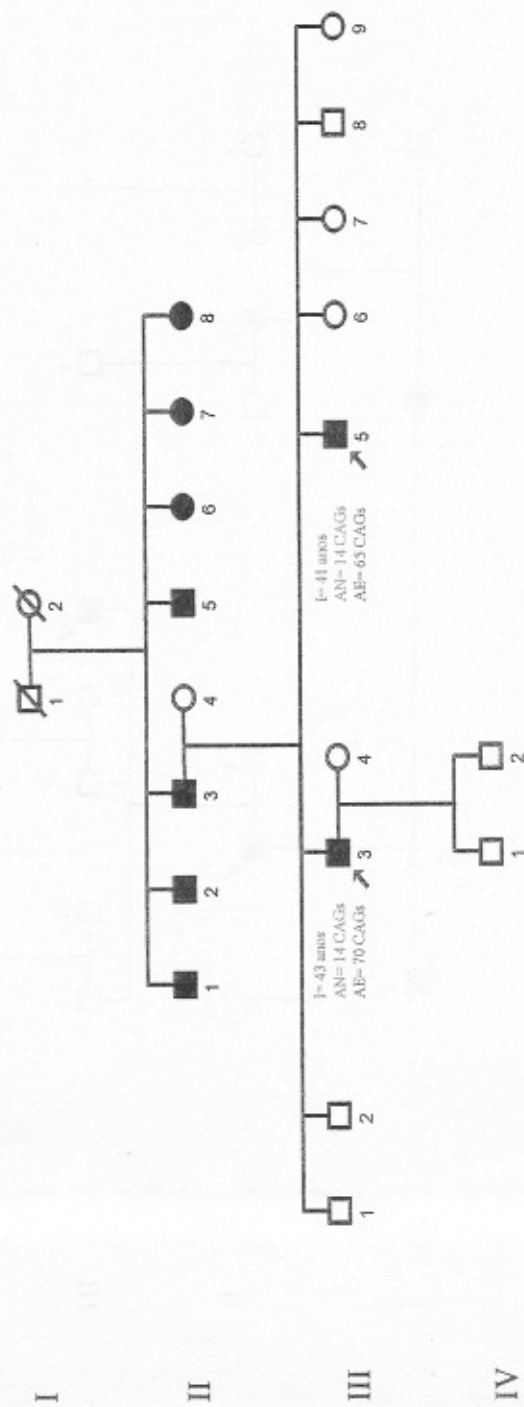




F-17



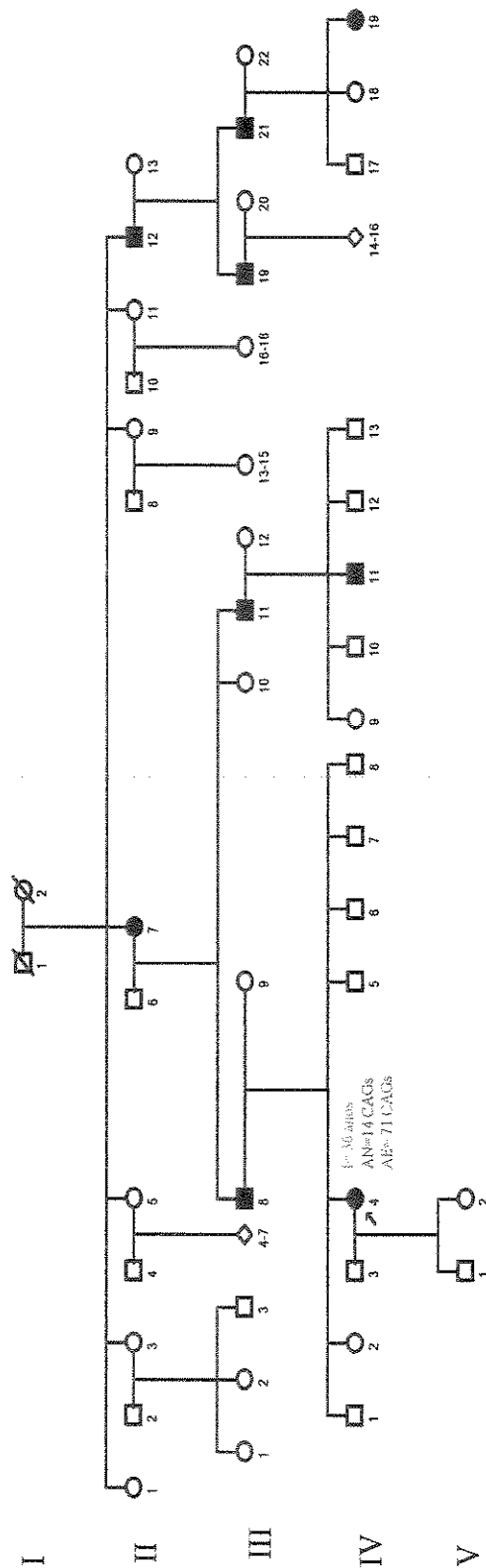
F-19



I- 30 alleles
 AN= 22 CAGs
 AE= 69 CAGs

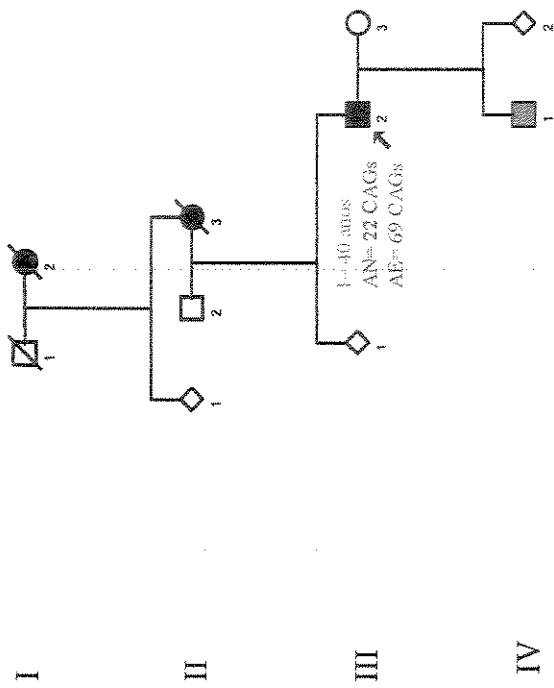


F-30

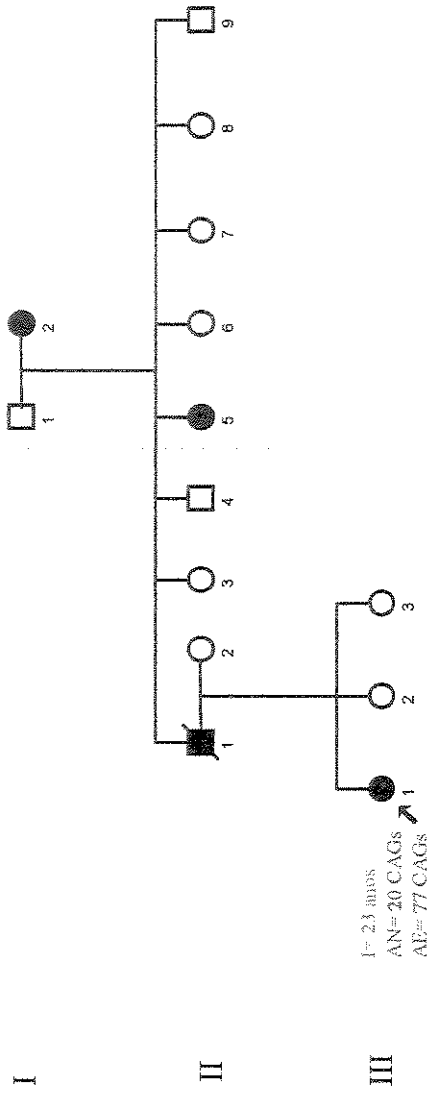




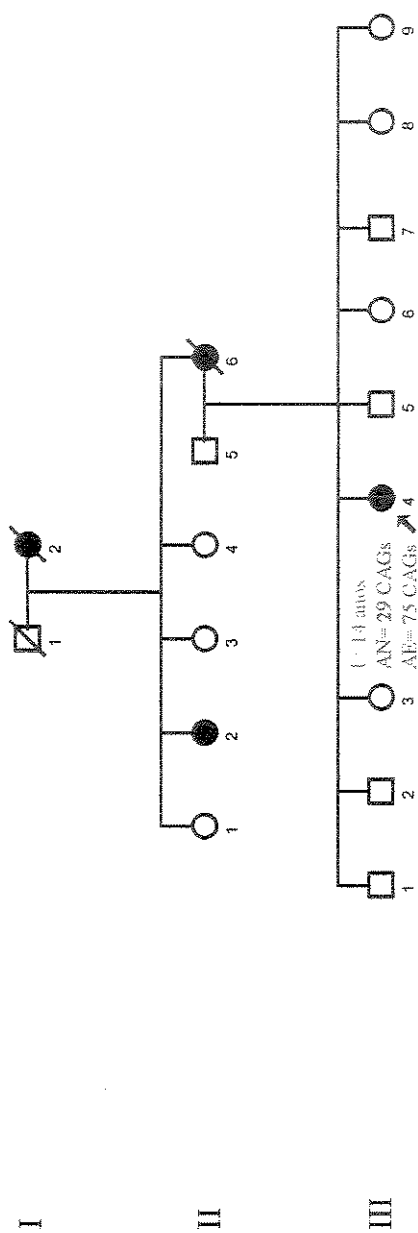
F-43



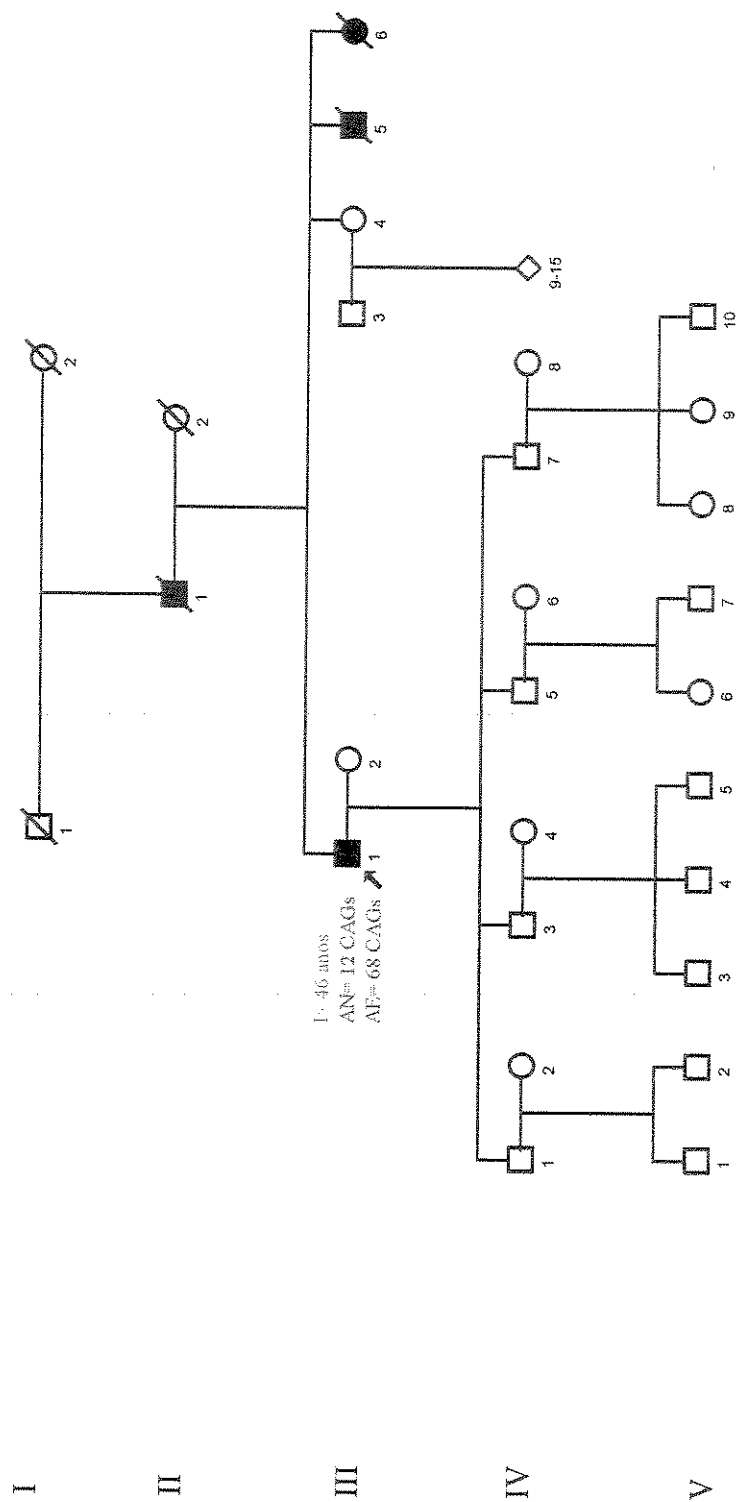
F-46



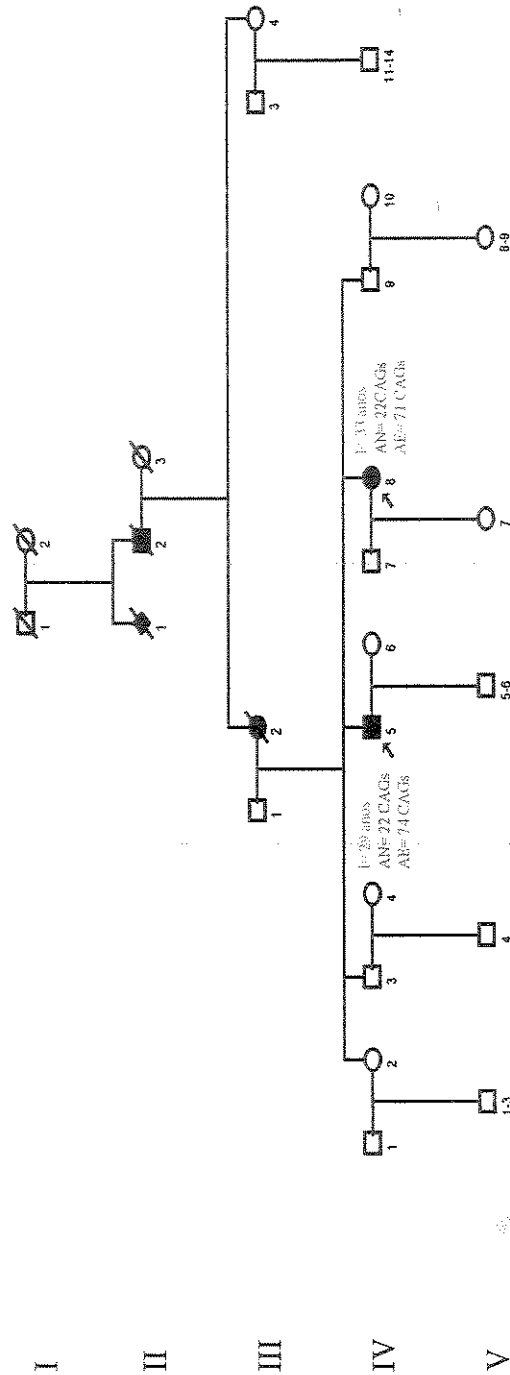
F-48



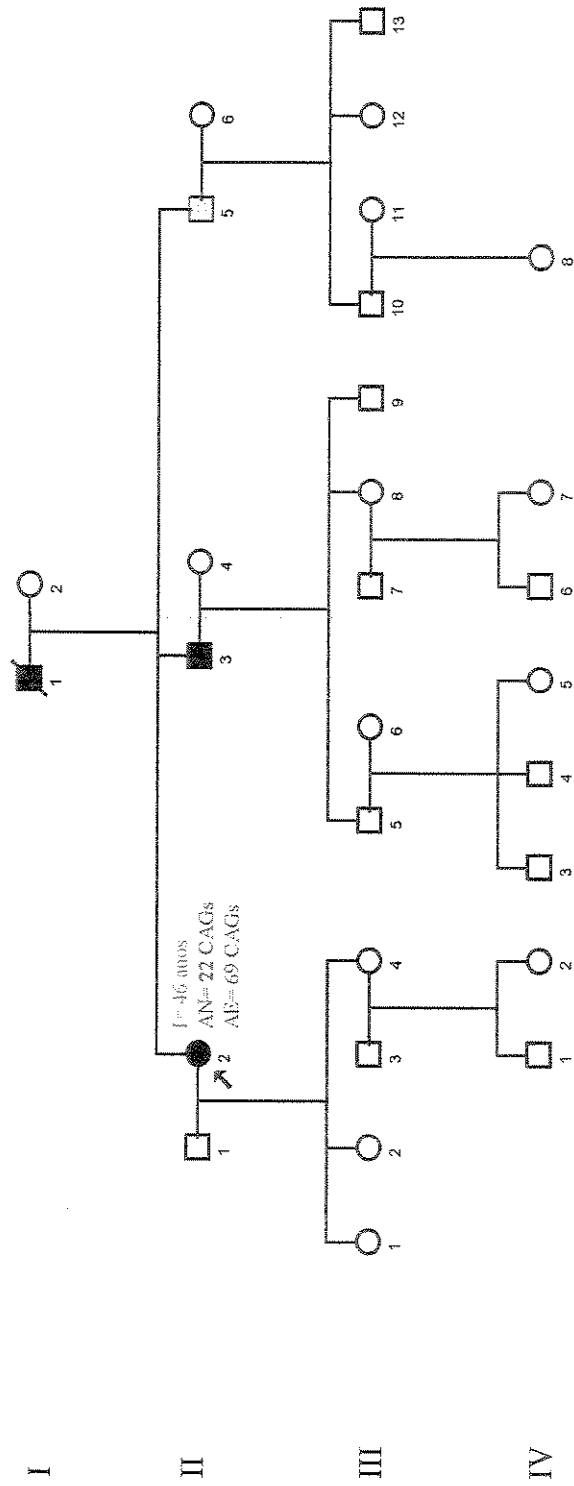
F-50



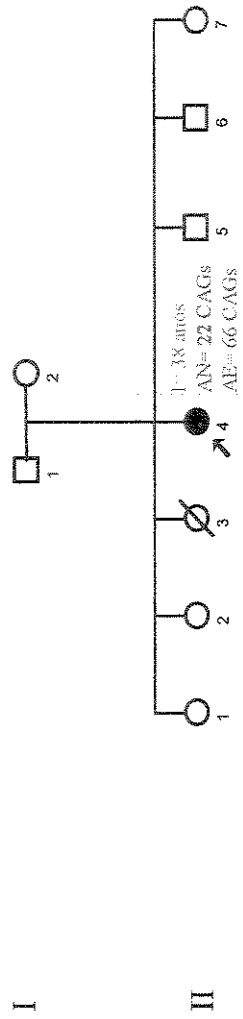
F-56



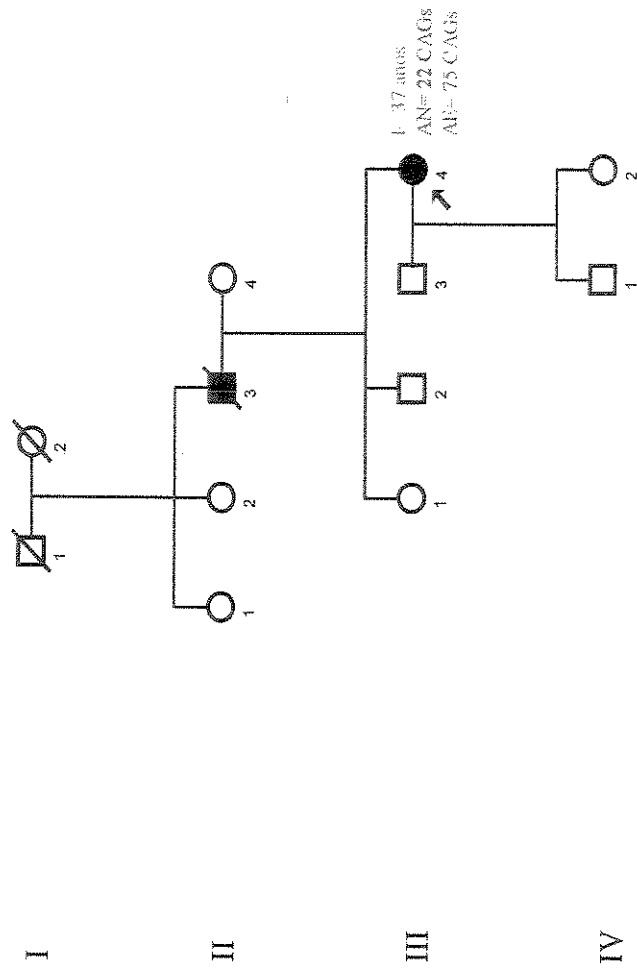
F-59



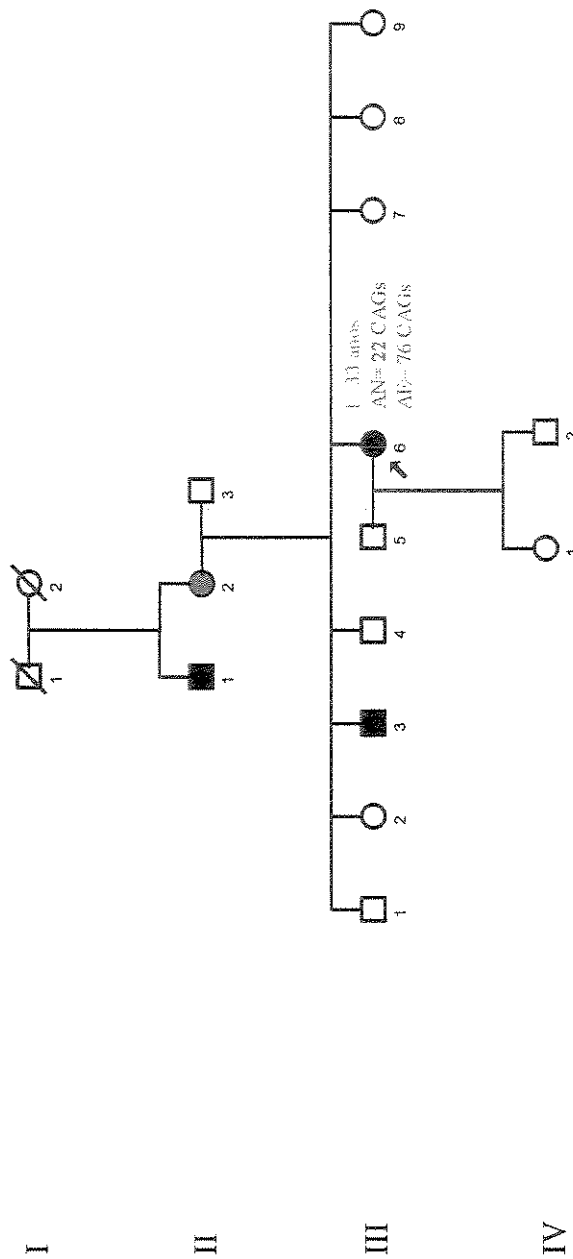
F-72



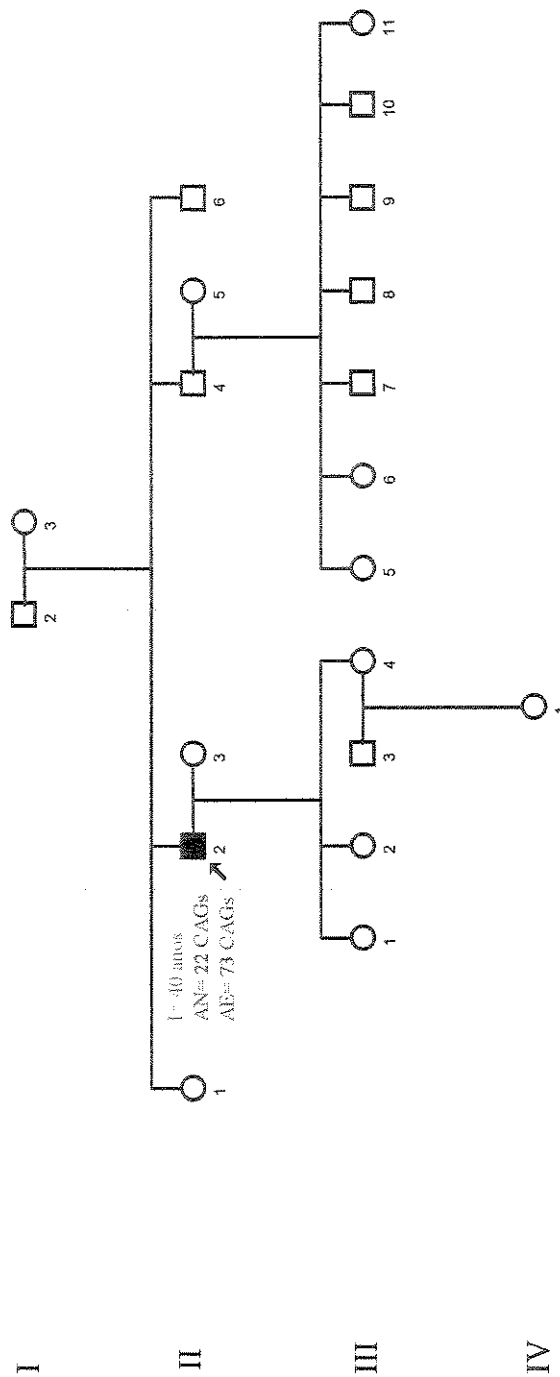
F-78



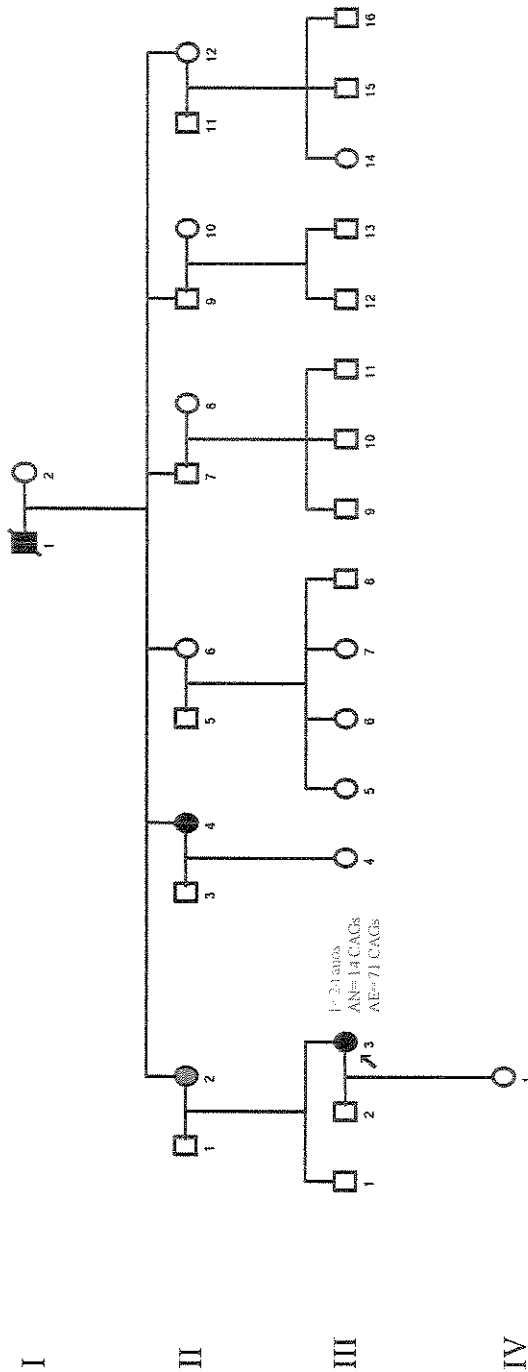
F-81



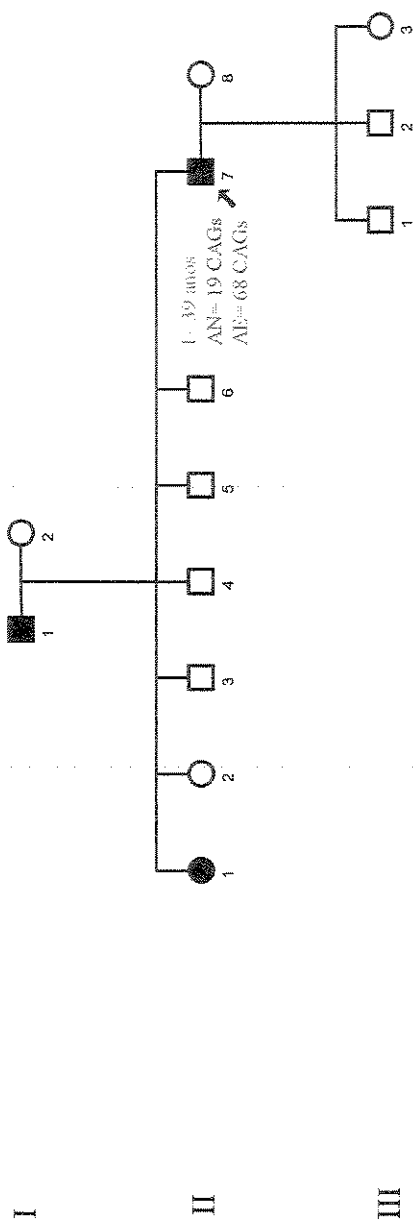
F-82



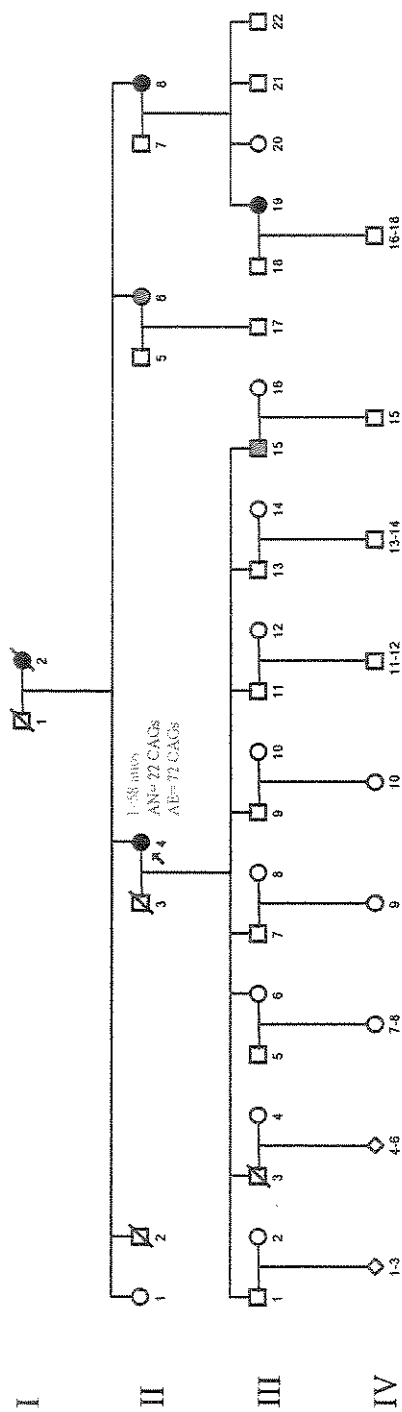
F-84



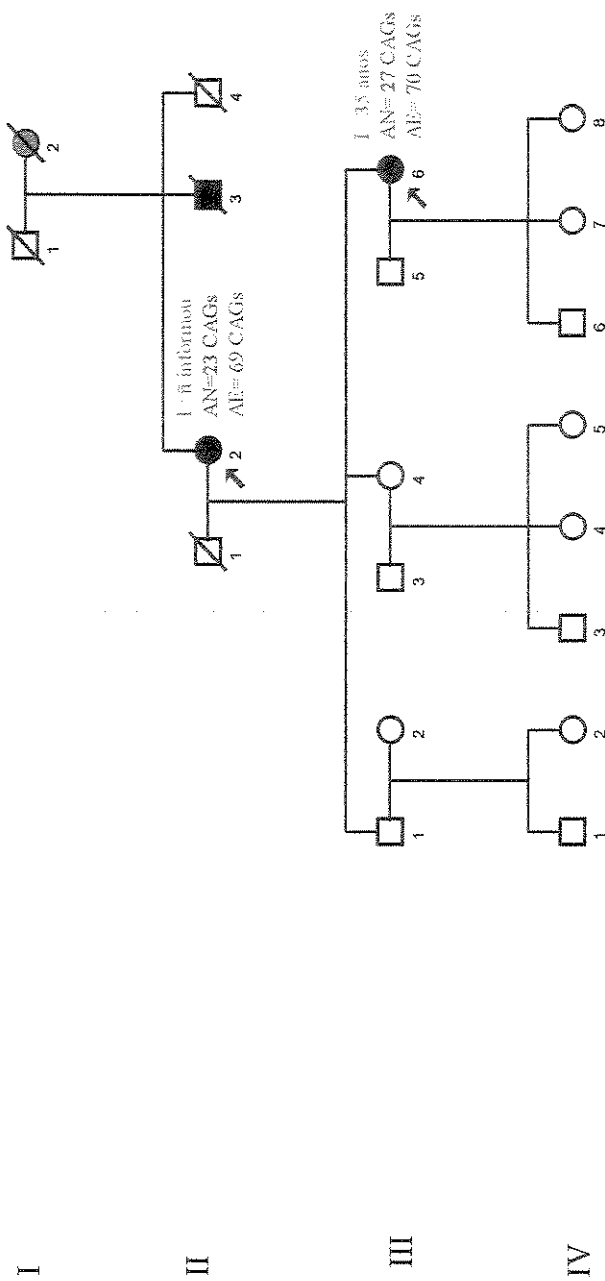
F-85



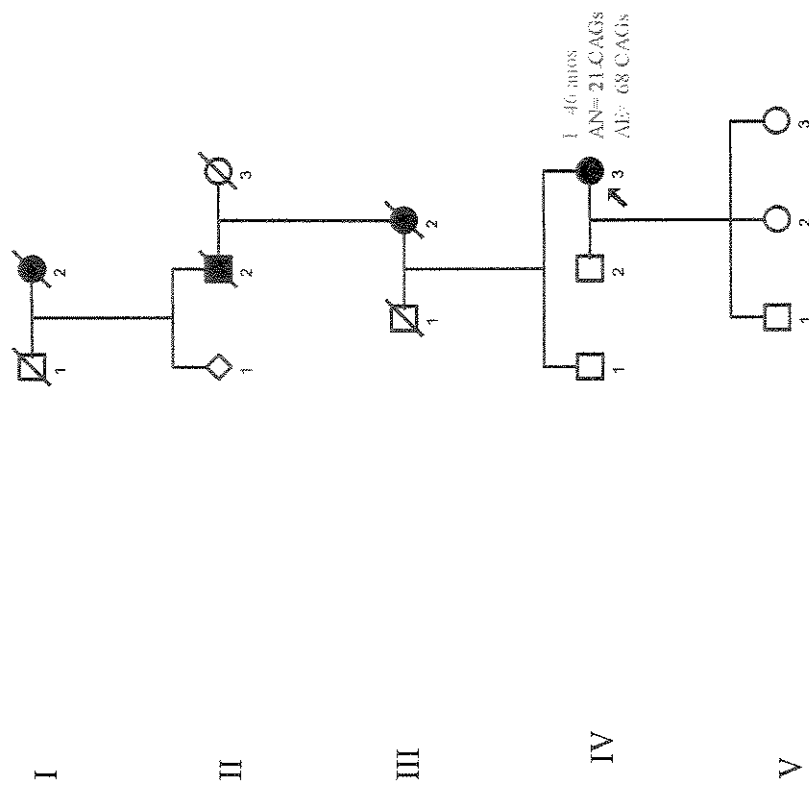
F-87



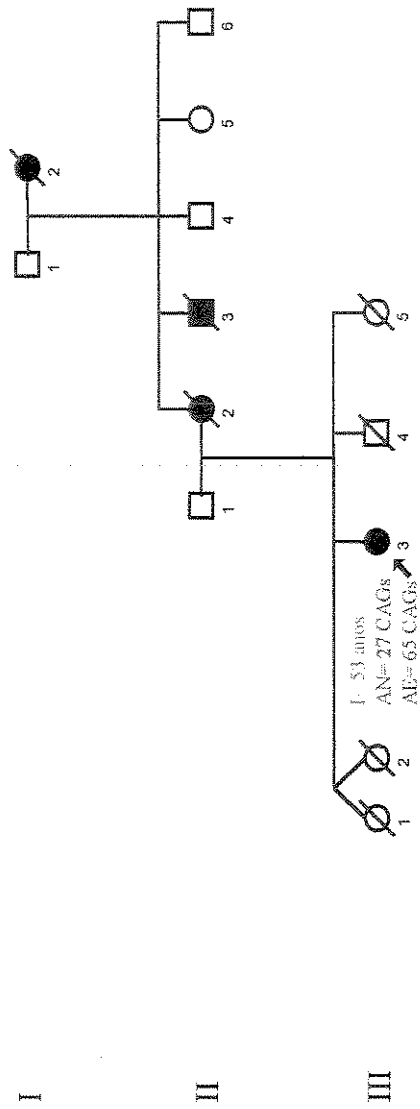
F-89



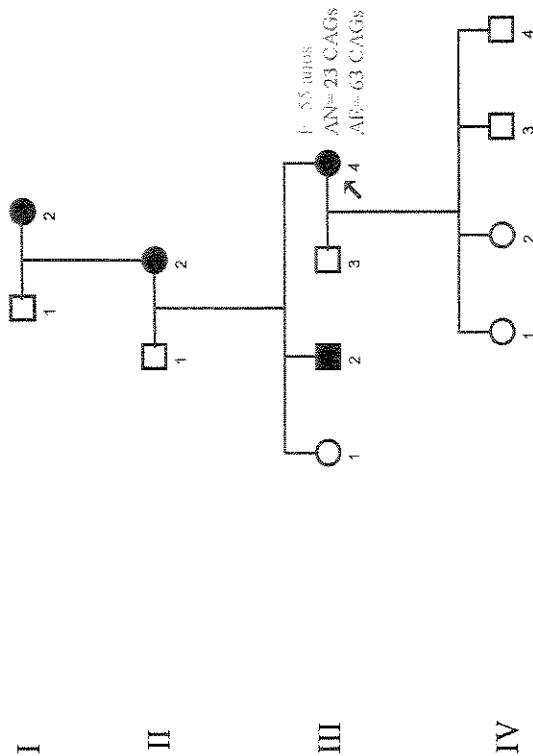
F-93



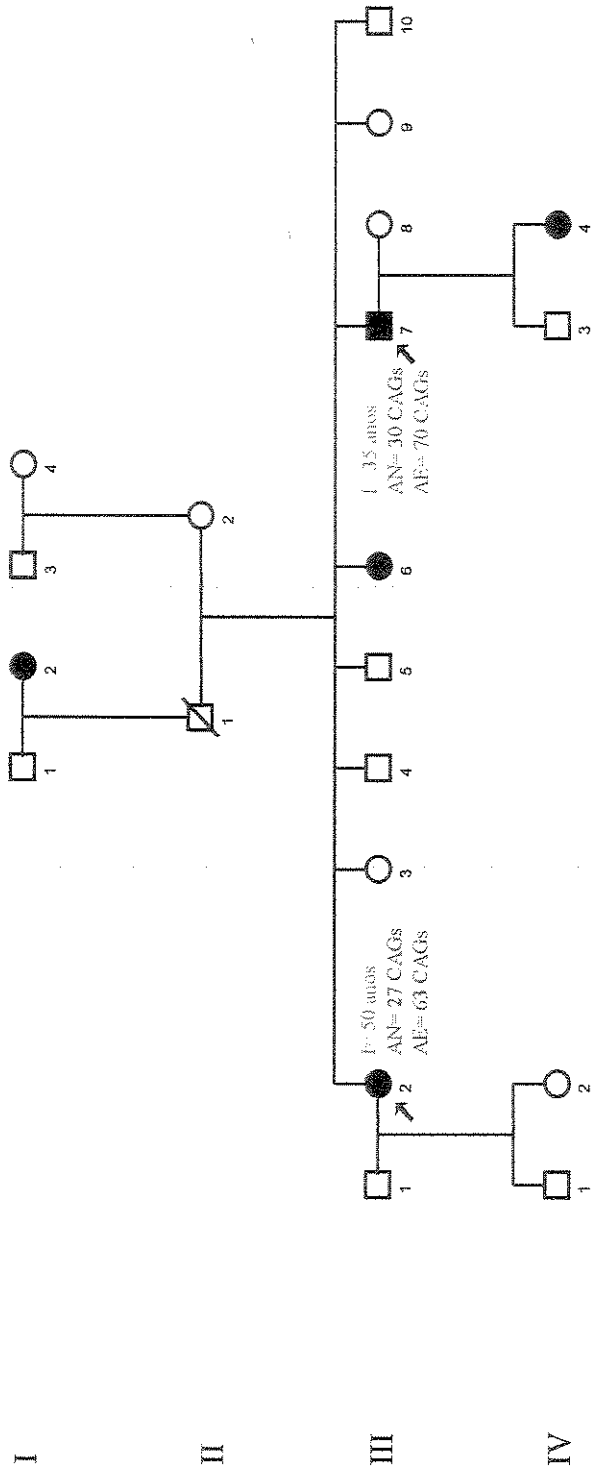
F-94



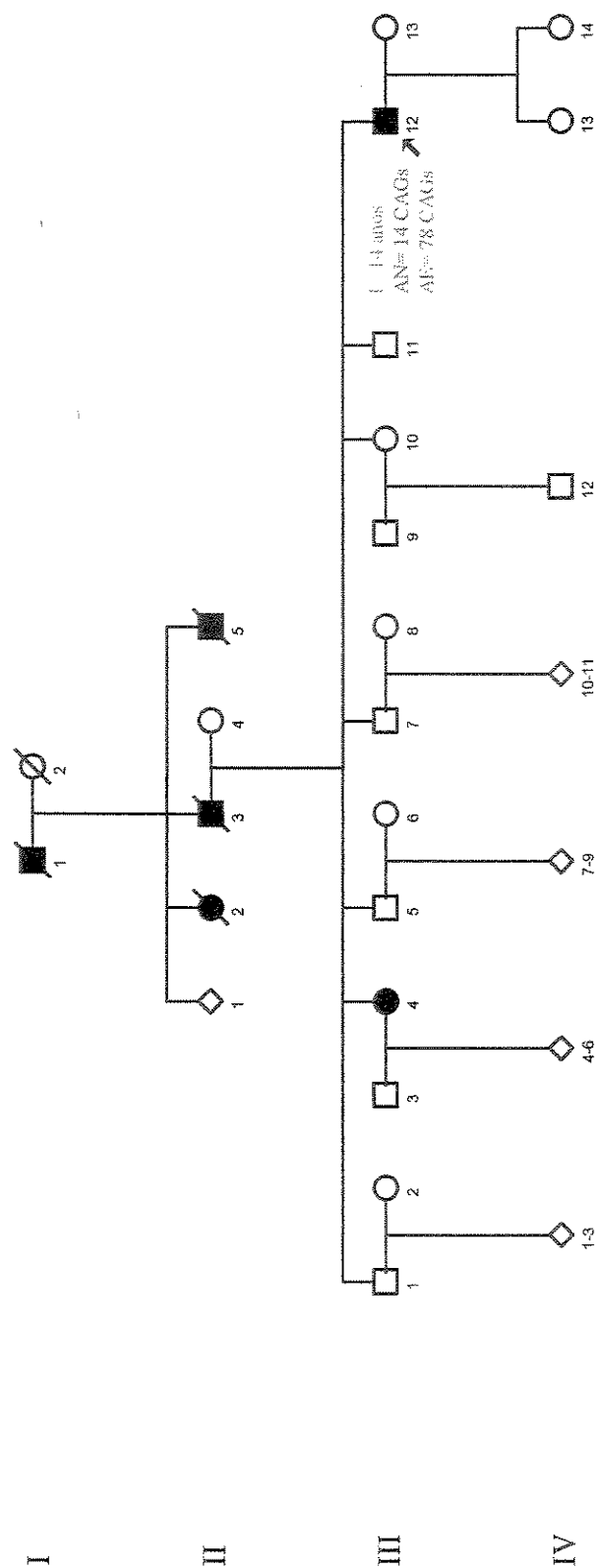
F-99



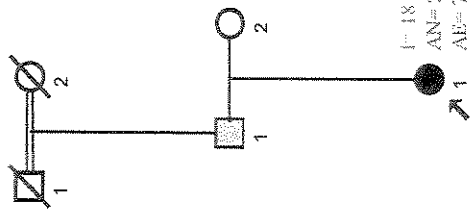
F-101



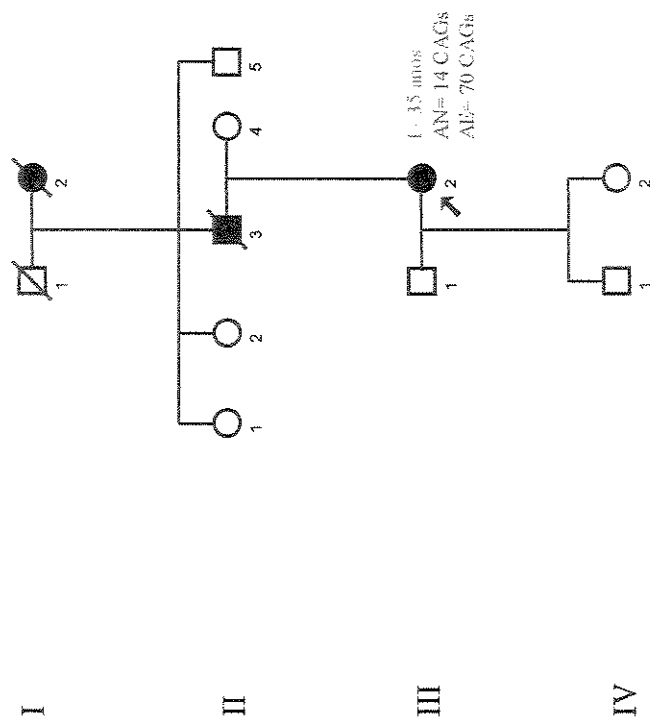
F-102



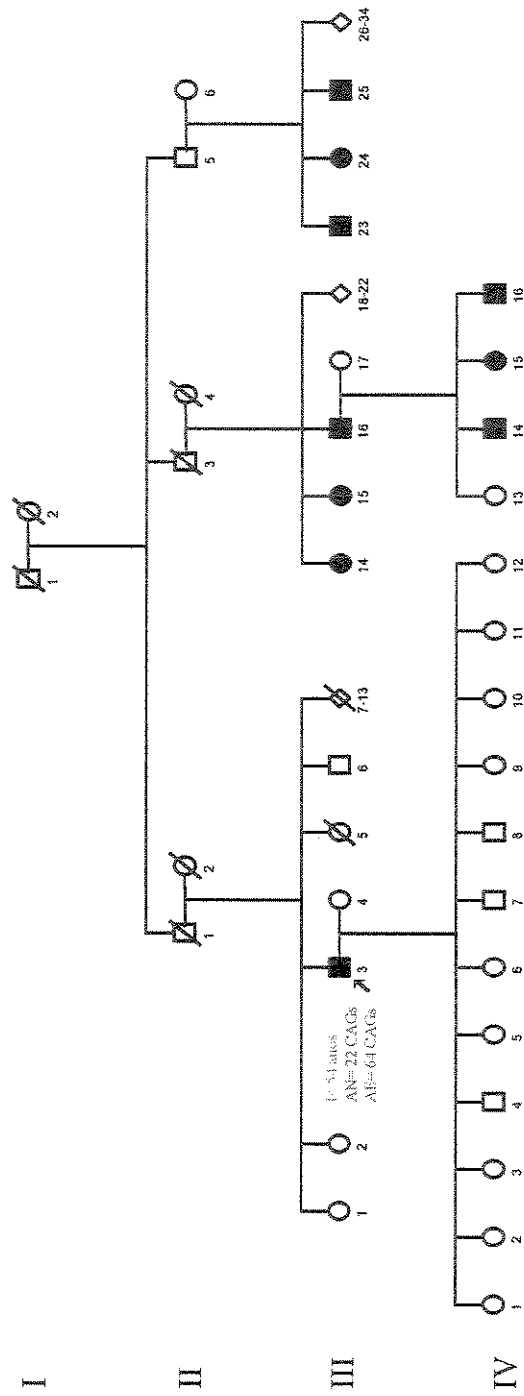
F-103



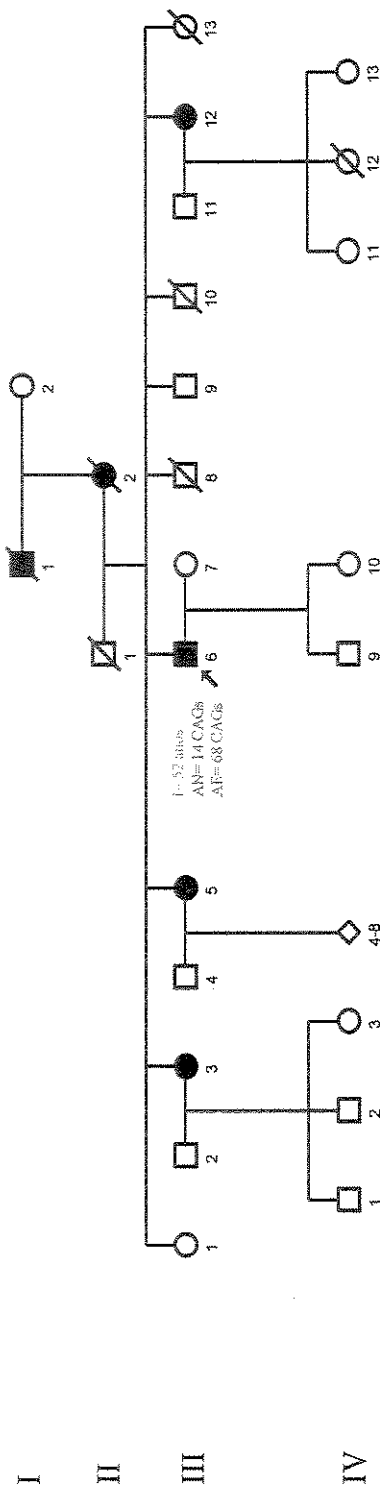
F-104



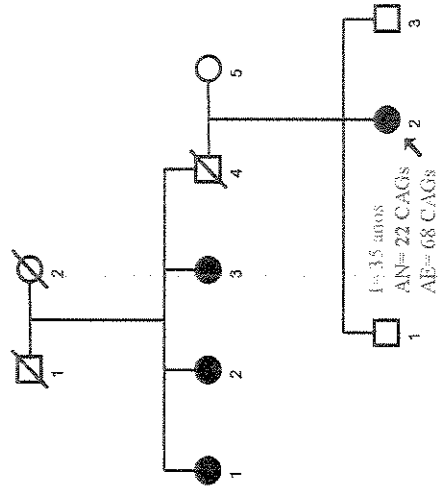
F-105



F-108



F-112

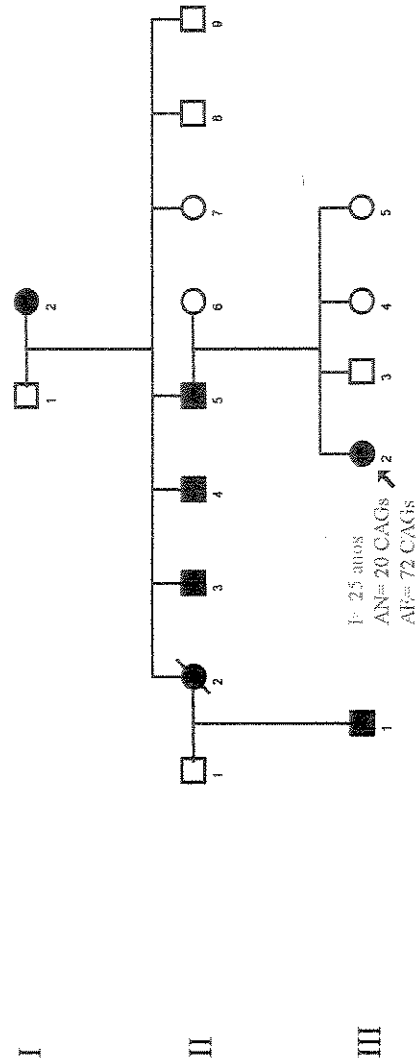


I

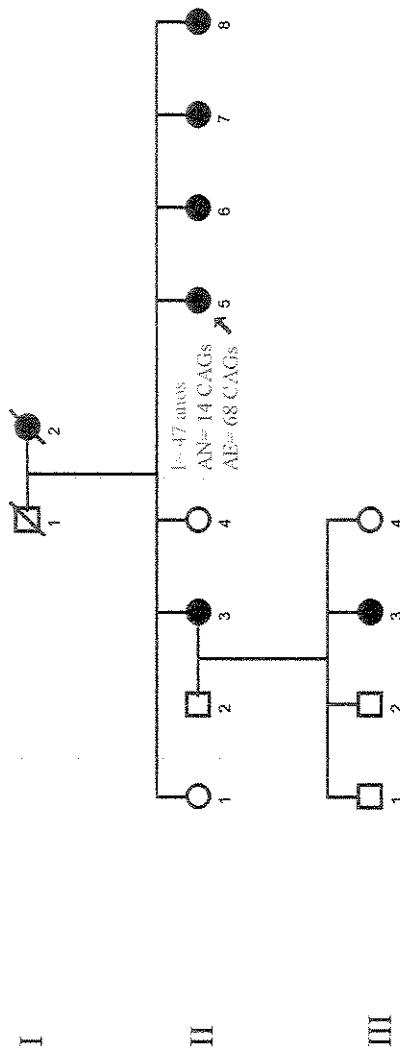
II

III

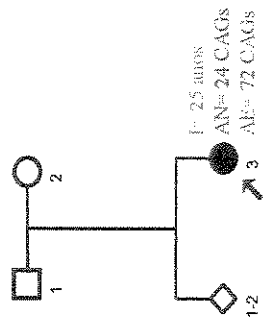
F-115



F-117



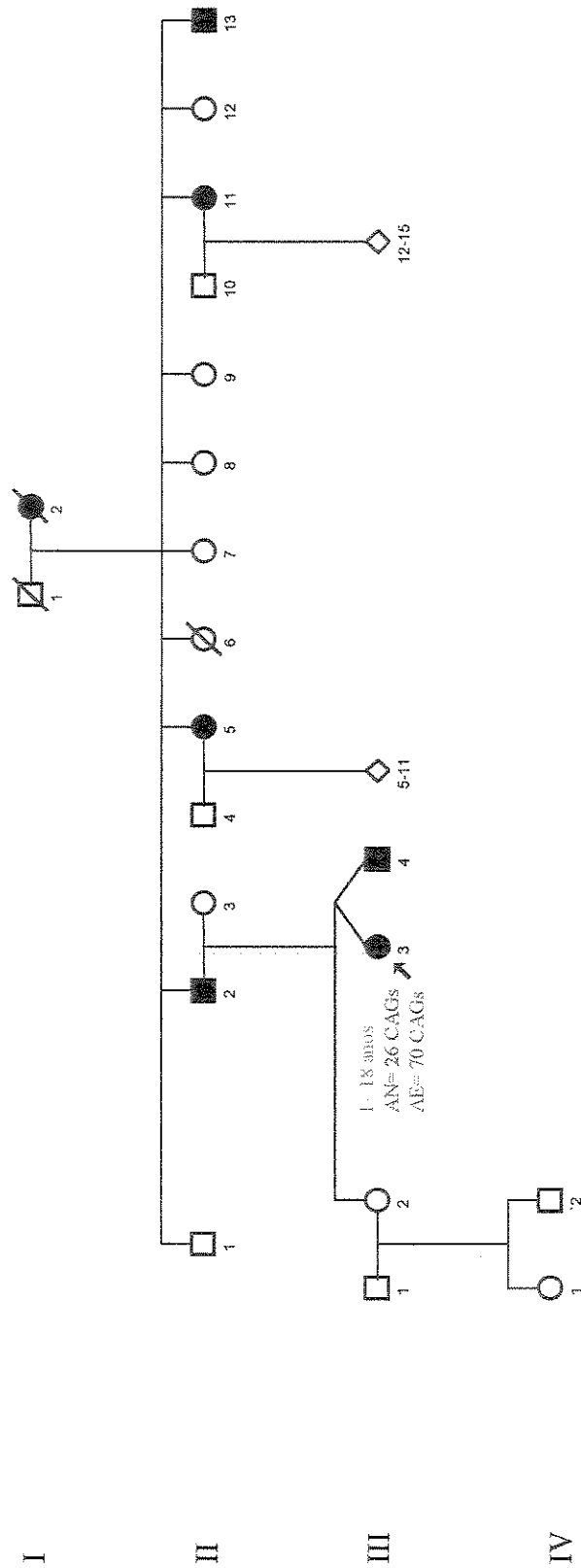
F-121



I

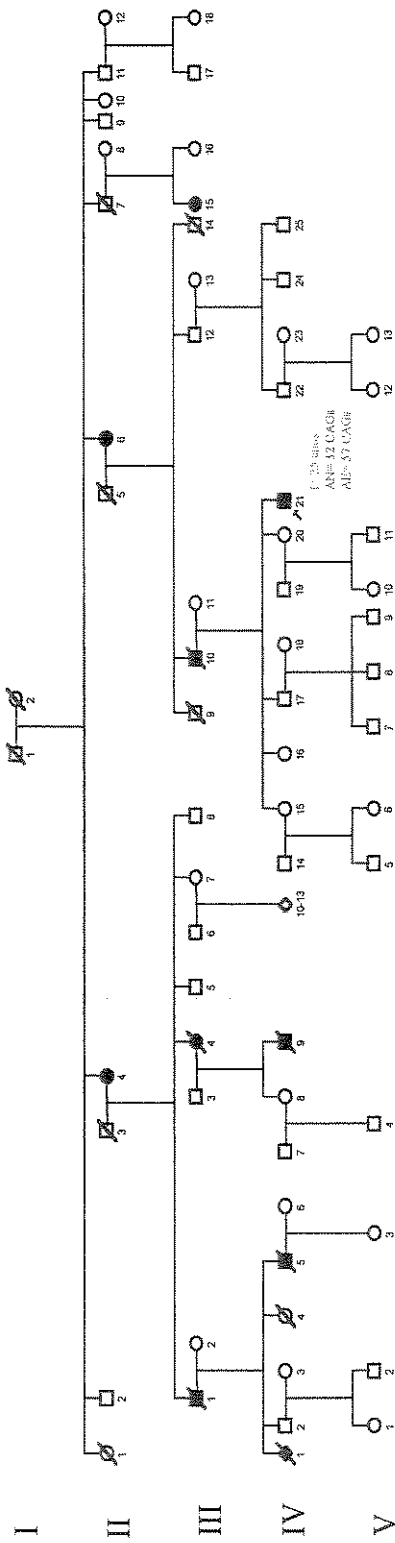
II

F-123

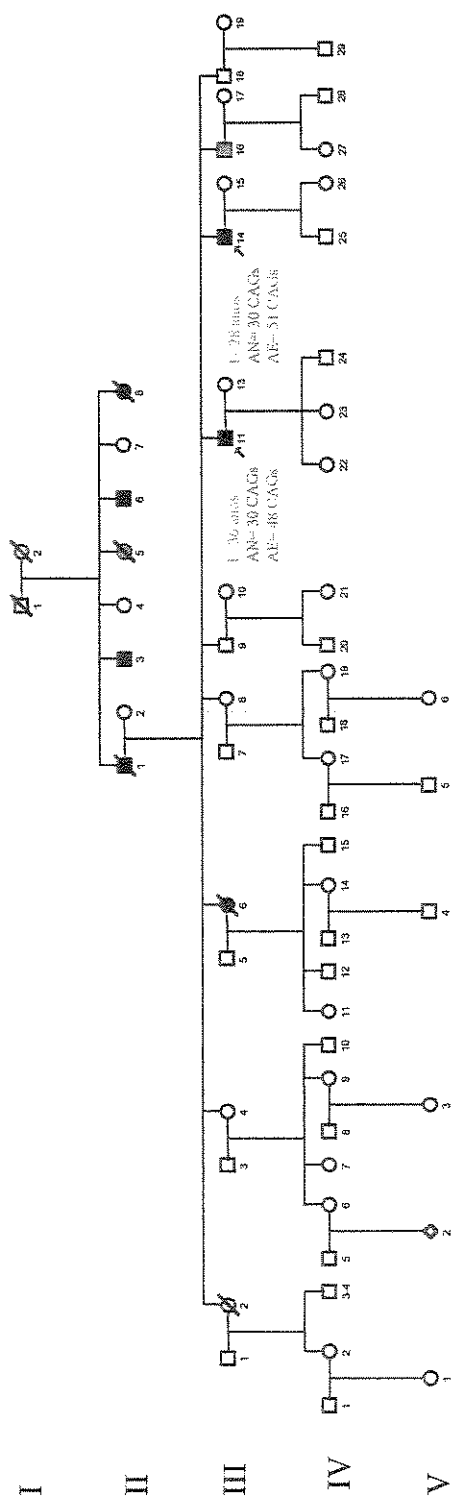


***HEREDOGRAMAS DAS 6 FAMÍLIAS
POSITIVAS PARA SCA1***

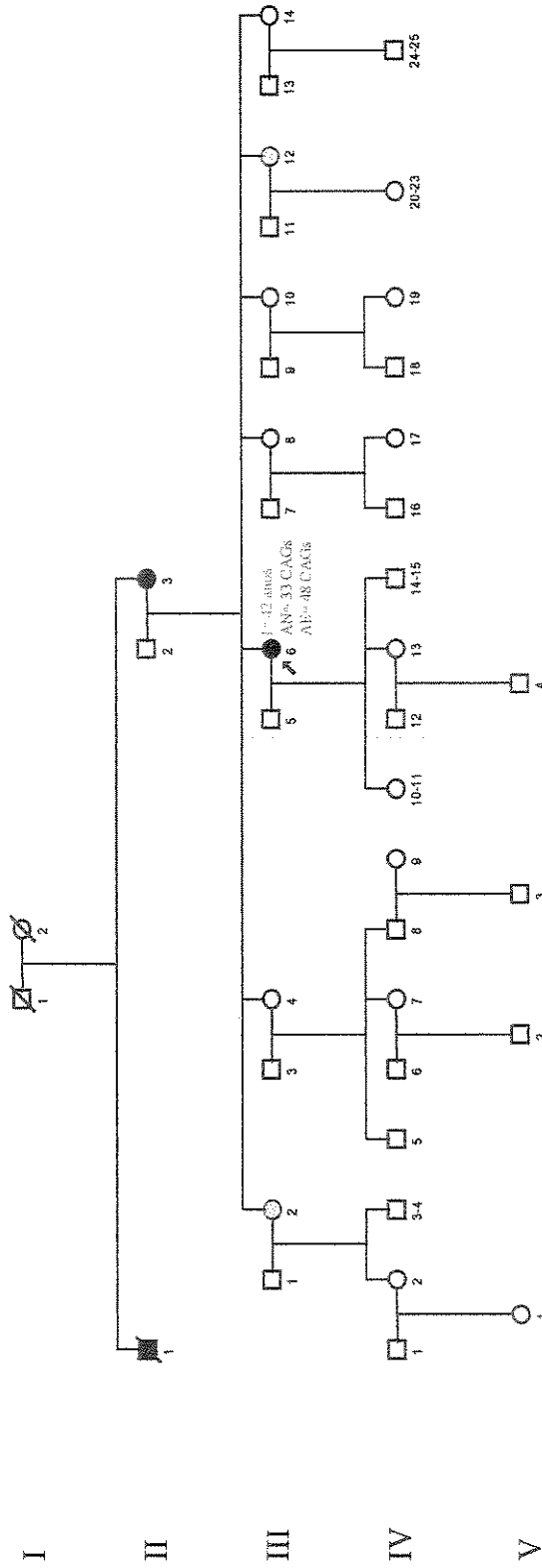
F-04



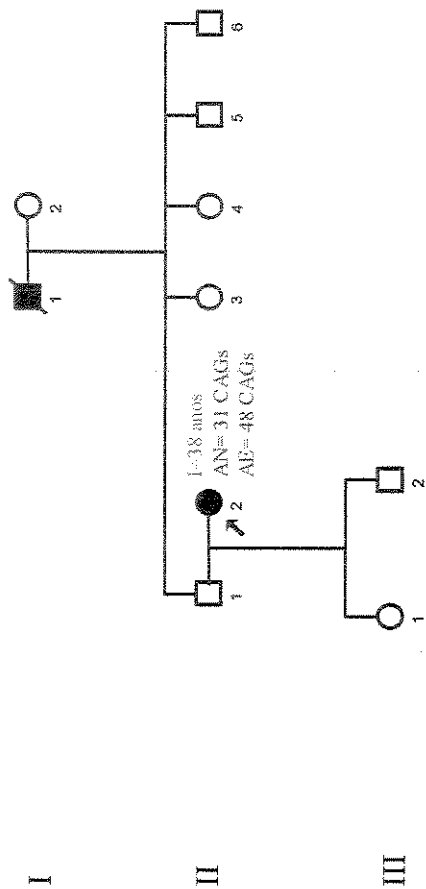
F-08



F-29

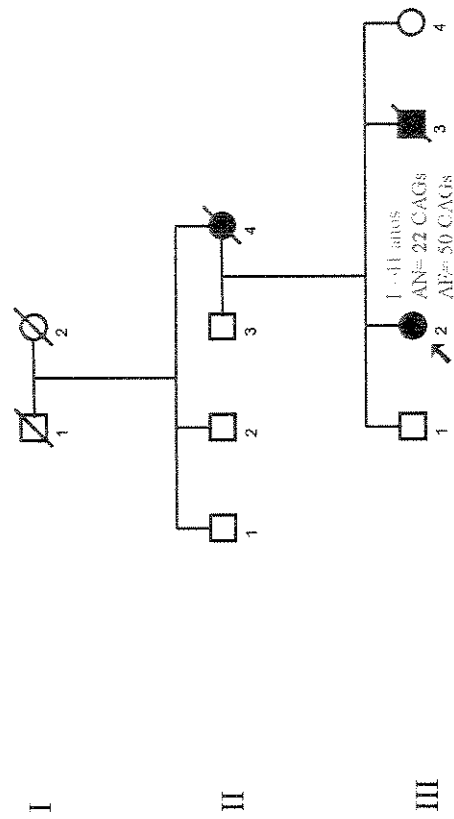


F-38

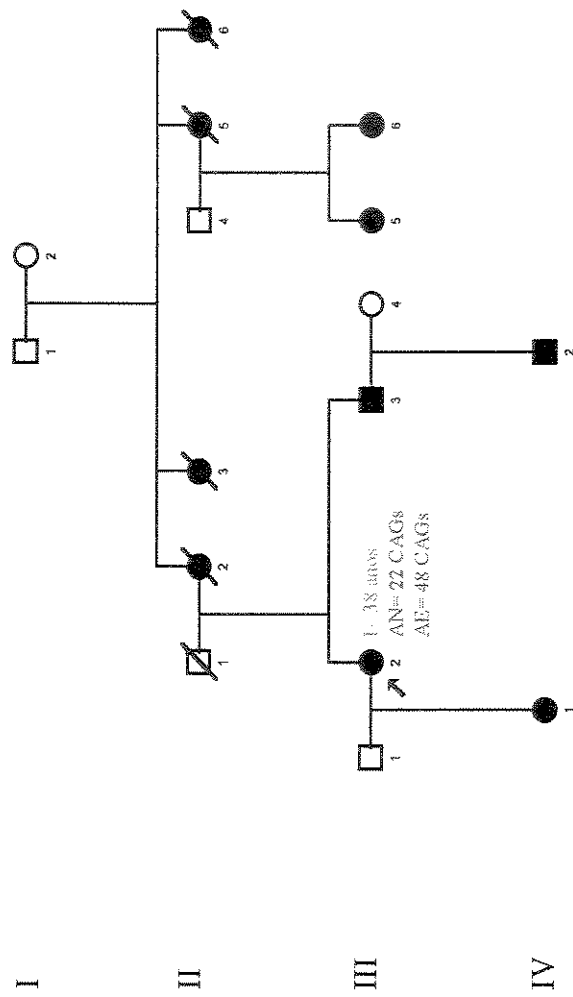


***HEREDOGRAMAS DAS 2 FAMÍLIAS
POSITIVAS PARA SCA2***

F-49

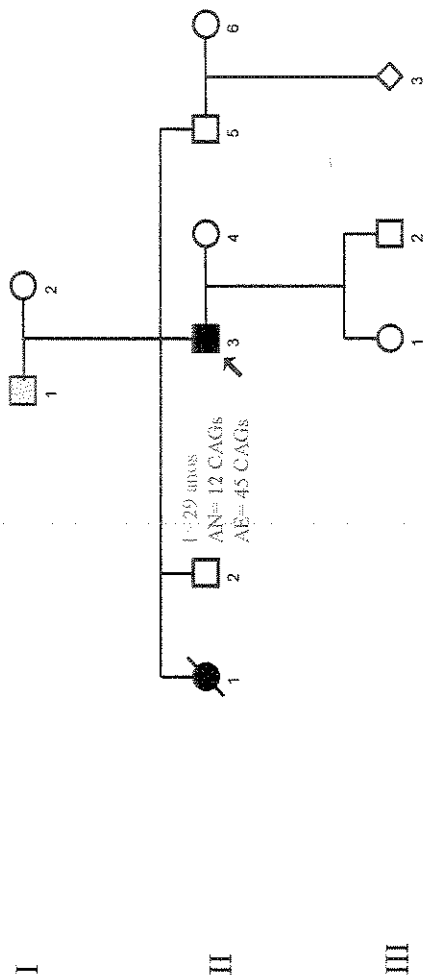


F-120

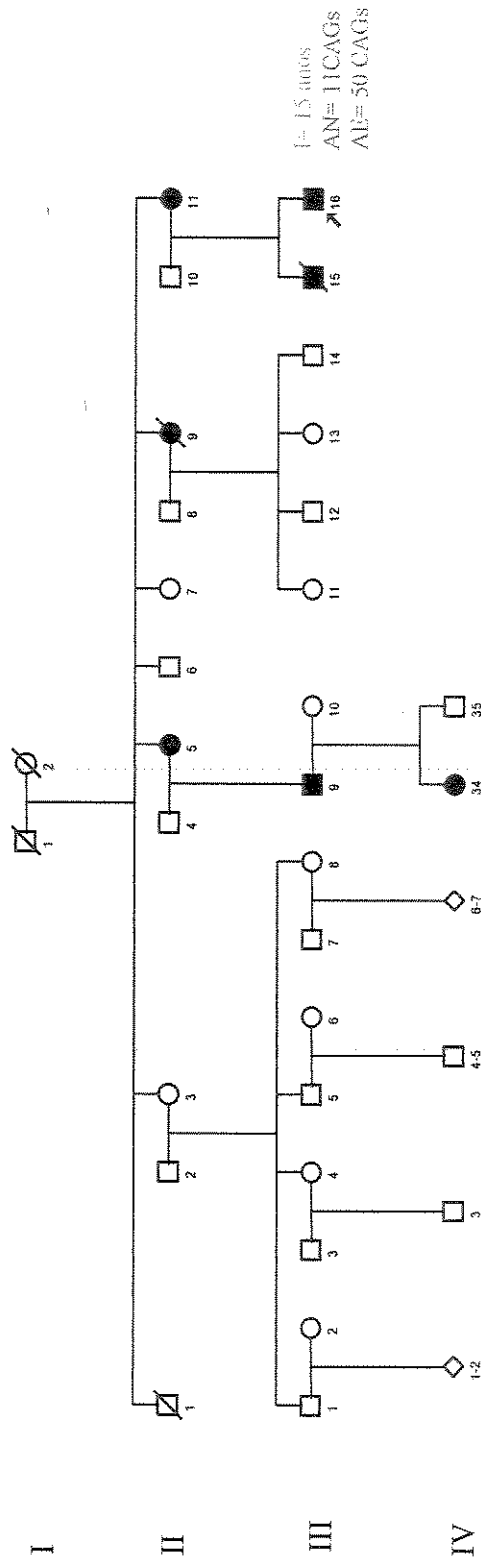


***HEREDOGRAMAS DAS 2 FAMÍLIAS
POSITIVAS PARA SCA7***

F-68

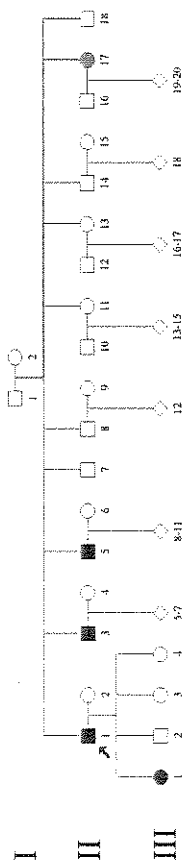


F-69

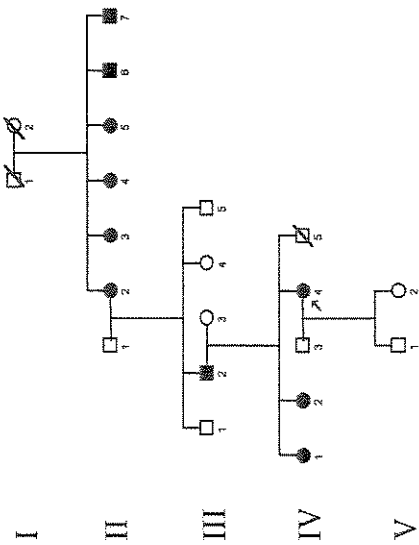


***HEREDOGRAMAS DAS FAMÍLIAS
NEGATIVAS PARA AS MUTAÇÕES
ESTUDADAS COM HERANÇA
AUTOSSÔMICA DOMINANTE***

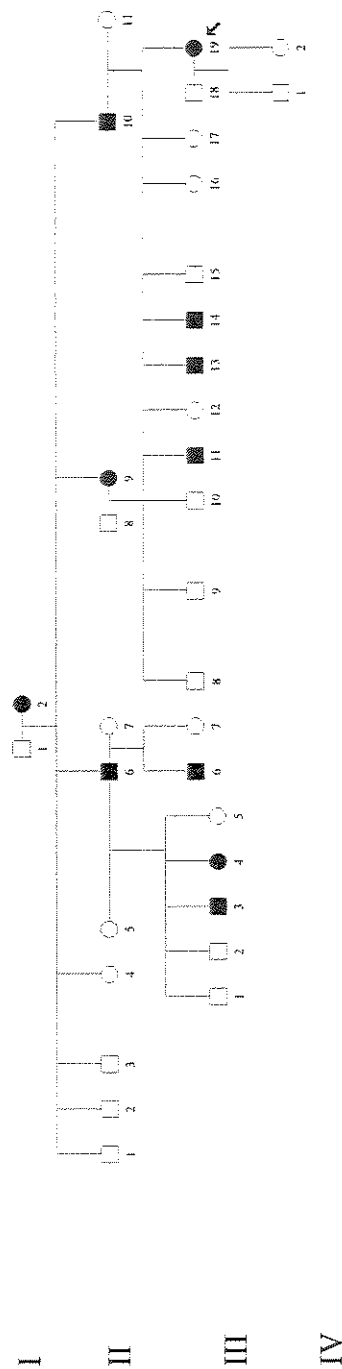
F-12



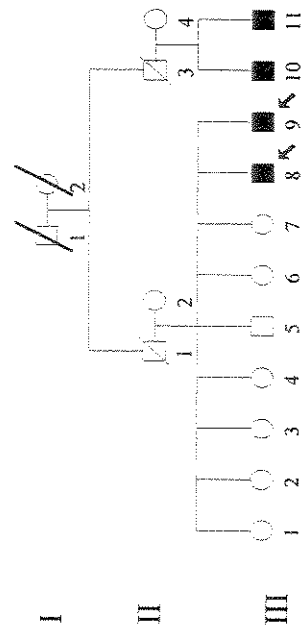
F-122



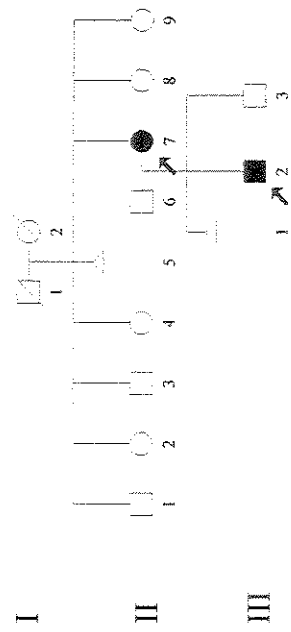
F-21



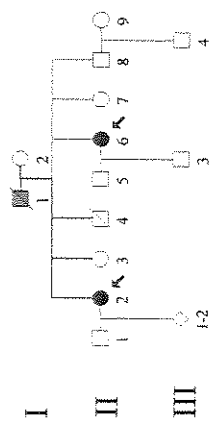
F-36



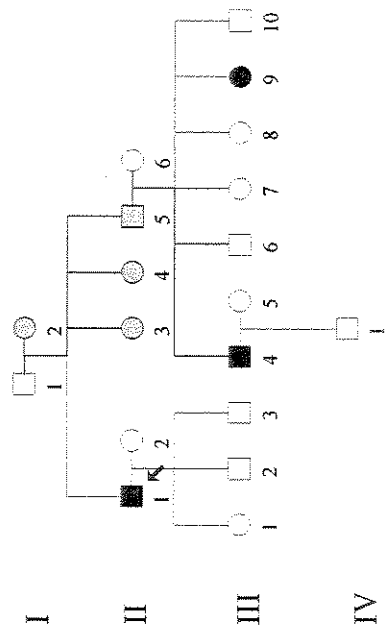
F-45

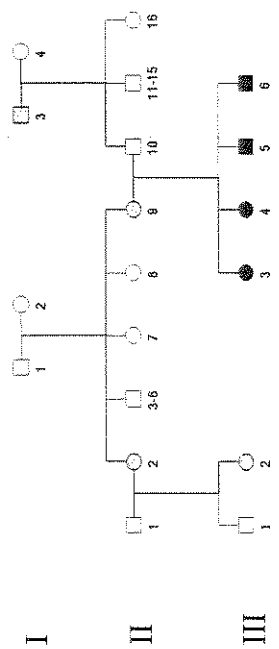


F-27



F-40

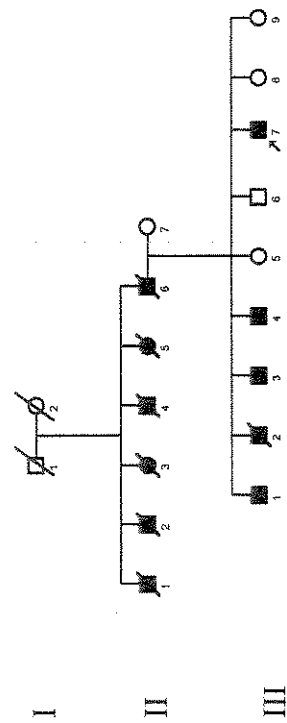




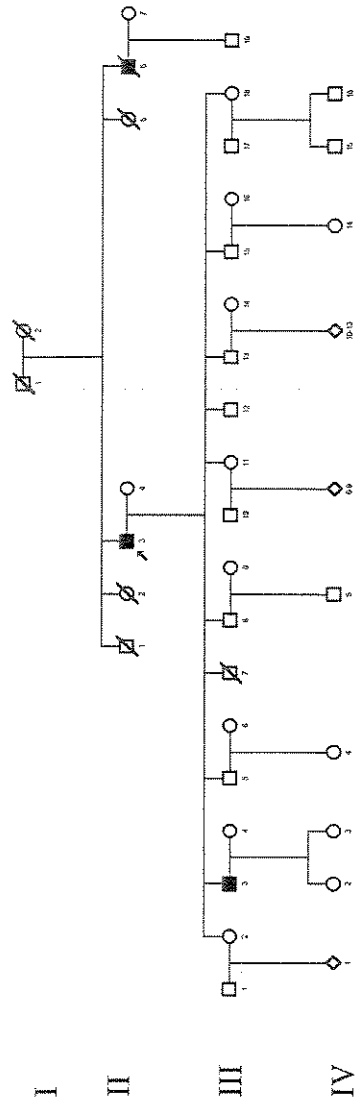
The pedigree chart illustrates the family structure across three generations:

- Generation I:** Consists of an affected male (I-1, marked with a diagonal line) and an unaffected female (I-2).
- Generation II:** Includes an unaffected female (II-1), an affected male (II-2, marked with a diagonal line), and an unaffected female (II-3).
- Generation III:** Shows a large family group with 11 individuals:
 - III-1: Unaffected female.
 - III-2: Unaffected male.
 - III-3: Affected female (marked with a diagonal line).
 - III-4: Affected female (marked with a diagonal line).
 - III-5: Unaffected female.
 - III-6: Unaffected male.
 - III-7: Unaffected male.
 - III-8: Unaffected female.
 - III-9: Unaffected male.
 - III-10: Unaffected female.
 - III-11: Unaffected male.

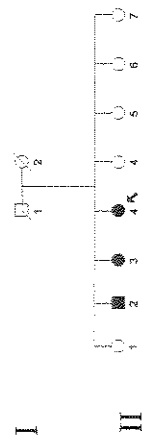
Relationships are indicated by horizontal lines (marriage) and vertical lines (parentage). The chart shows a complex pattern of inheritance across multiple generations.



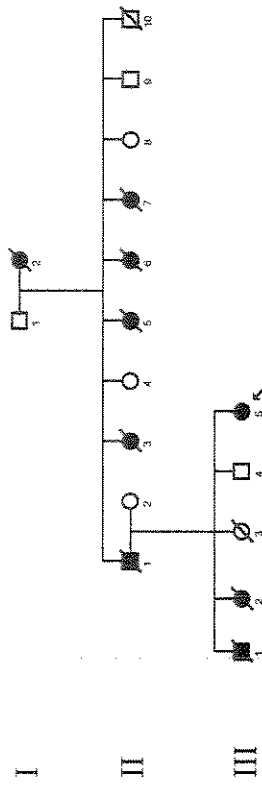
F-66



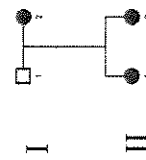
F-75



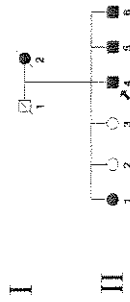
F-71

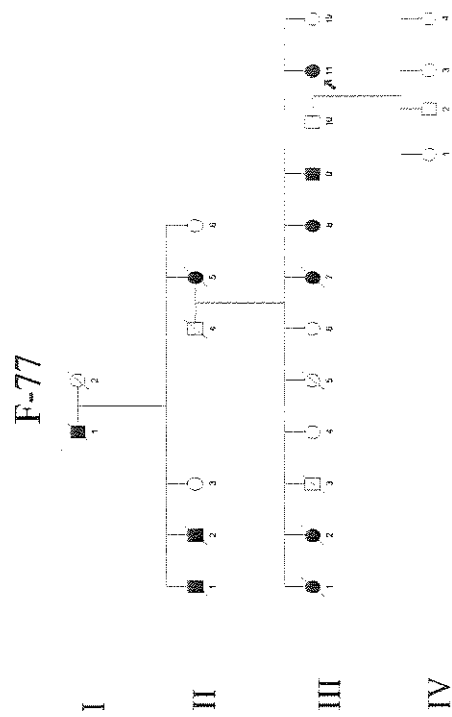
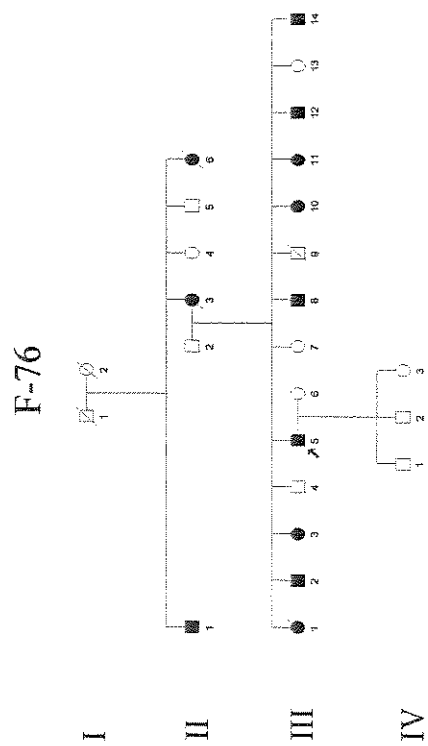
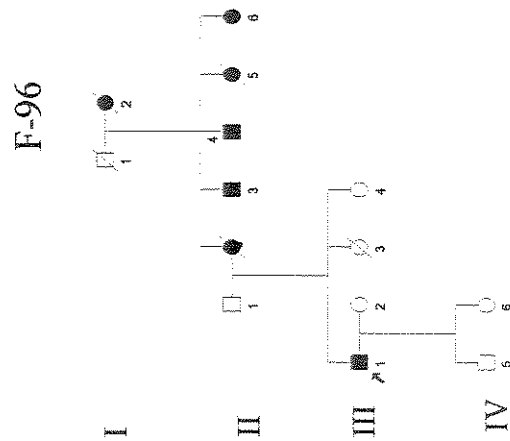


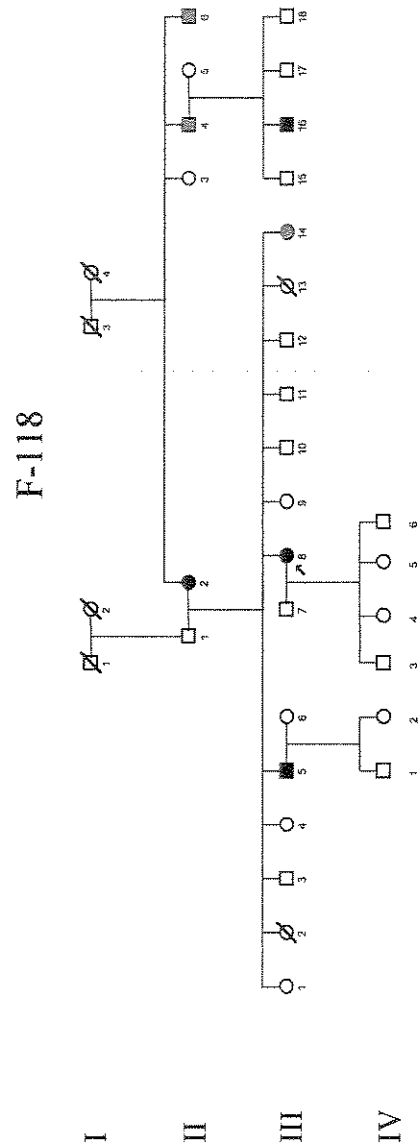
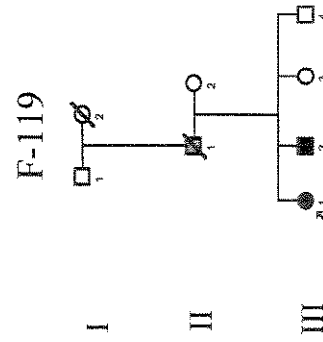
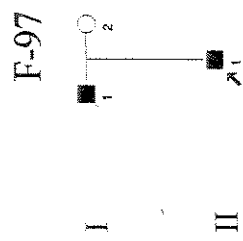
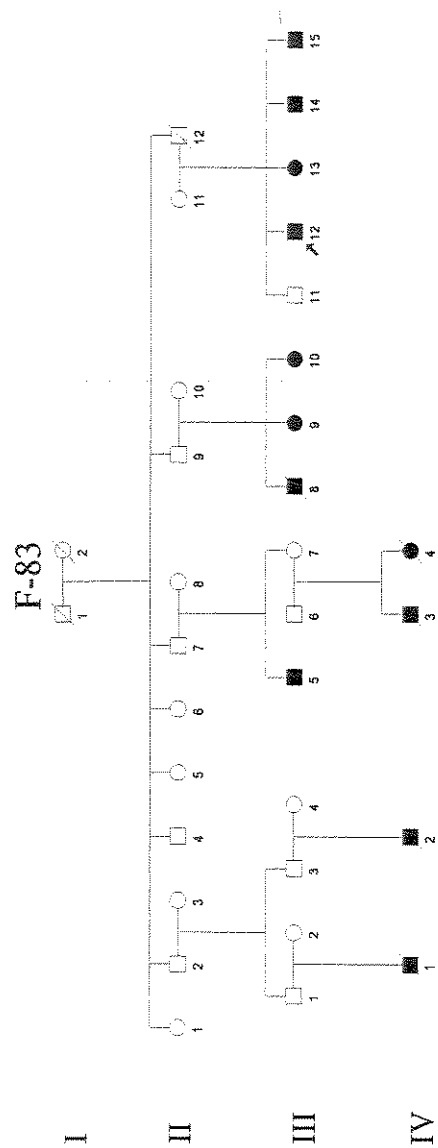
F-67



F-74

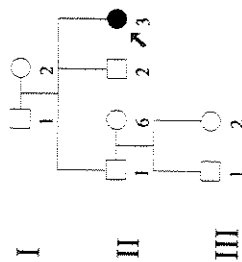




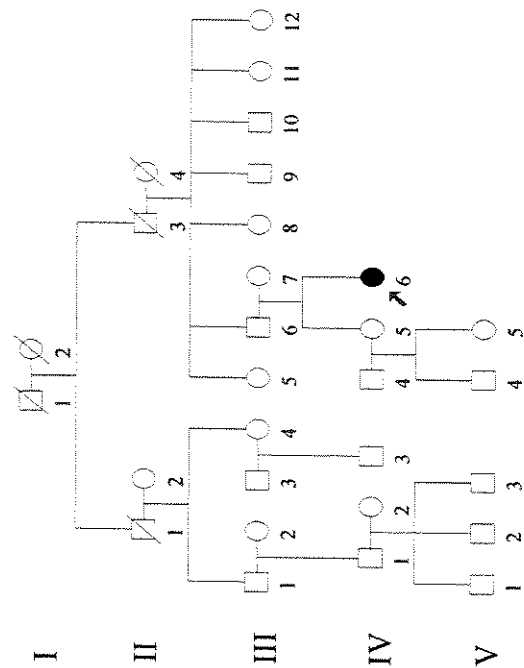


***HEREDOGRAMAS DAS FAMÍLIAS
NEGATIVAS PARA AS MUTAÇÕES
ESTUDADAS PARA CASO ISOLADO***

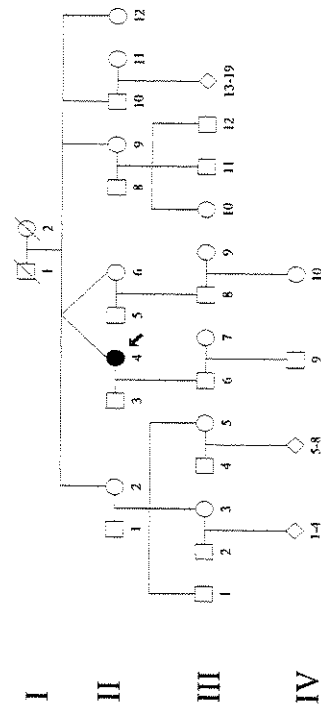
F-02



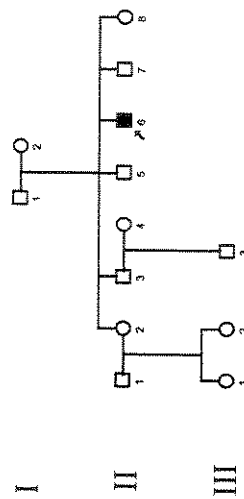
F-18



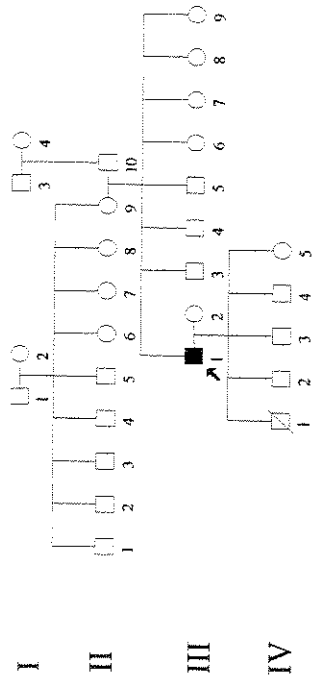
F-23



F-26



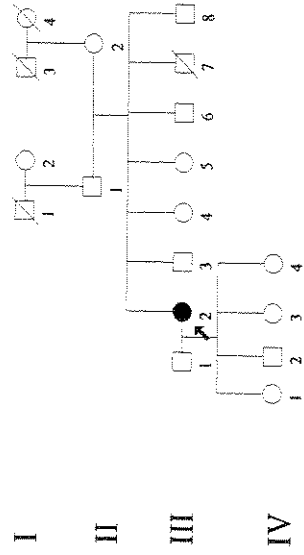
F-47



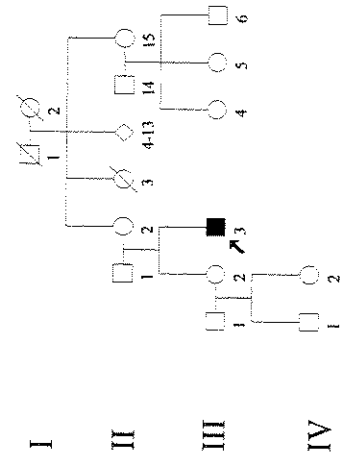
F-52



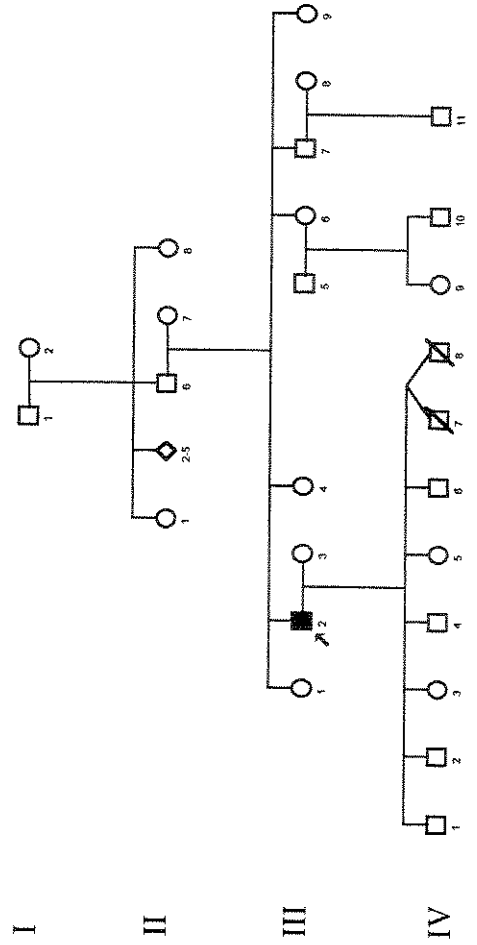
F-51



F-53

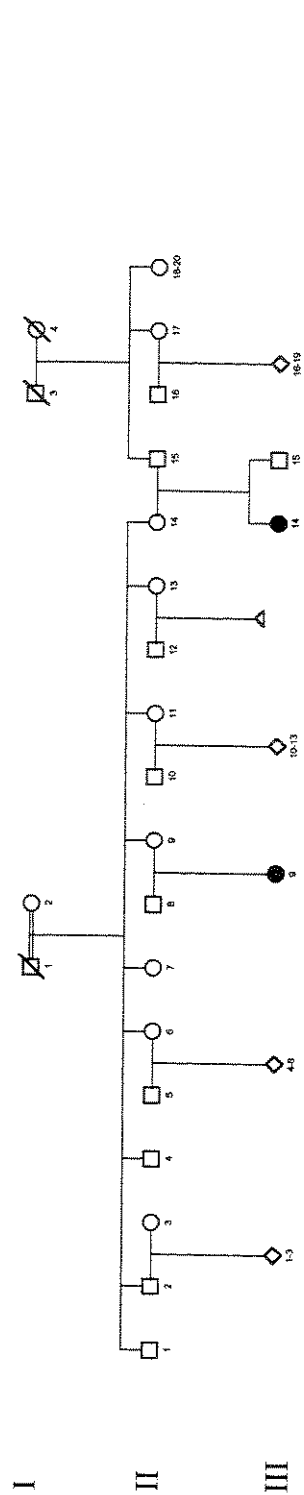


F-61

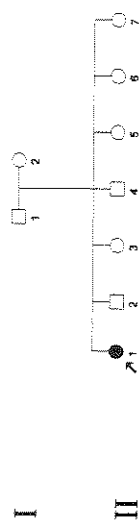




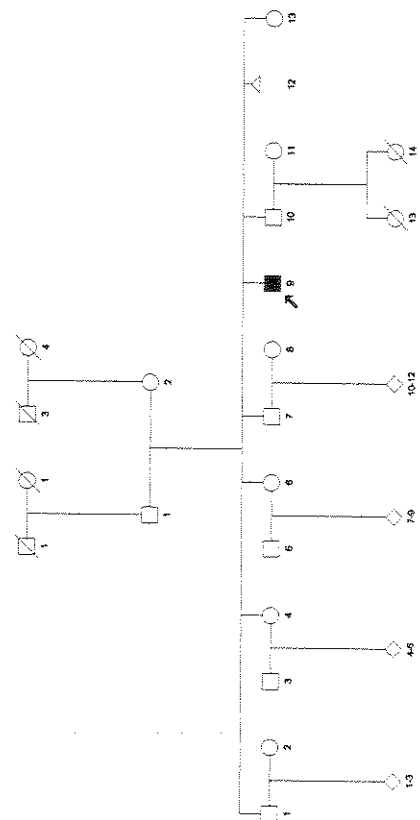
F-65



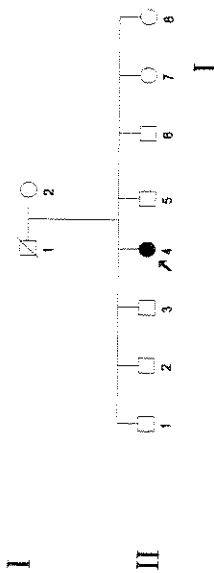
F-80



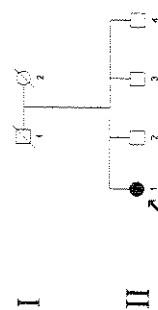
F-86



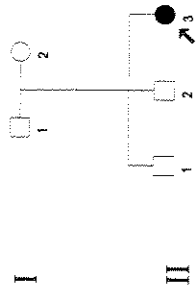
F-70



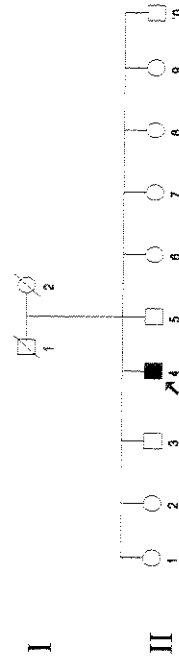
F-73



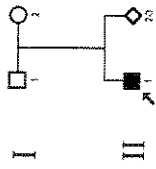
F-88



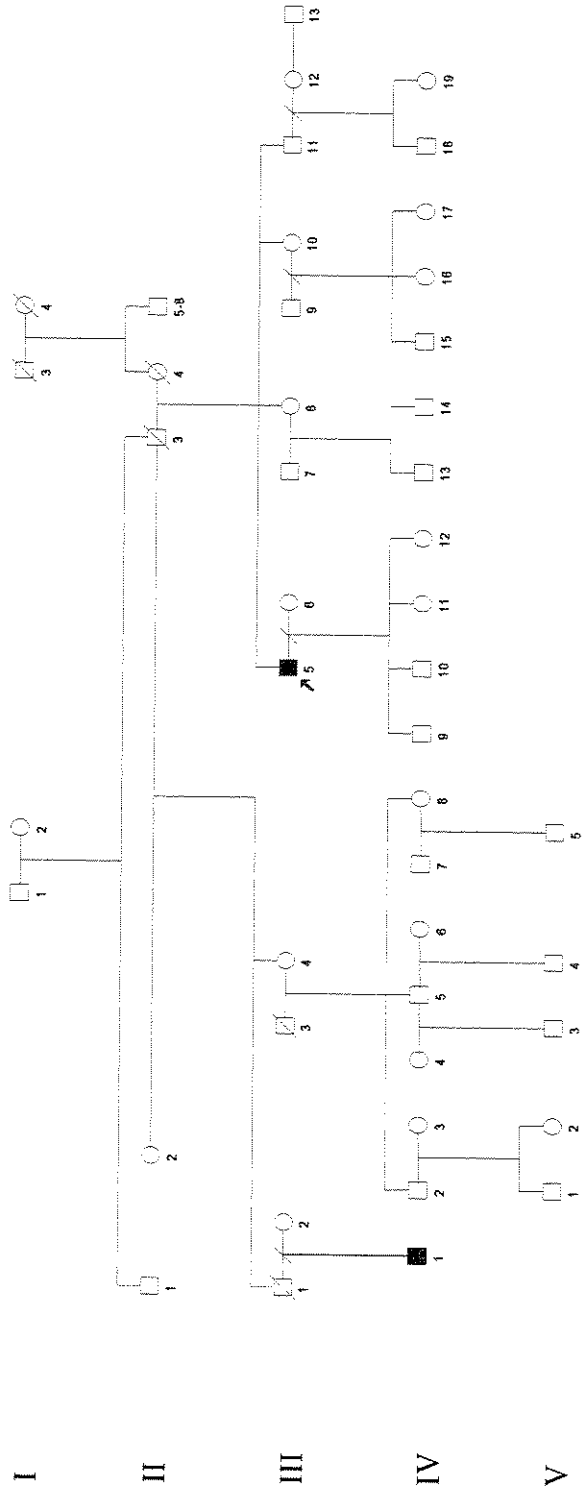
F-90



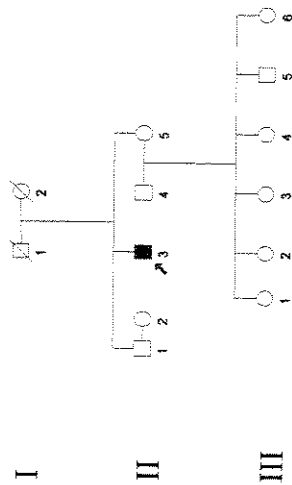
F-91



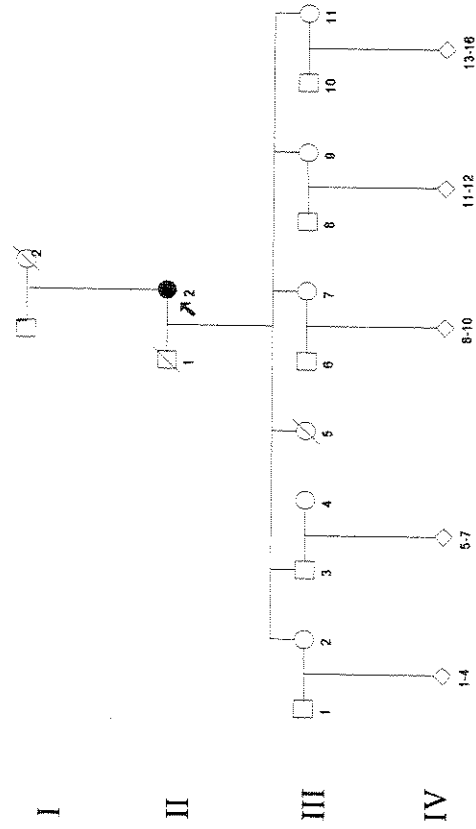
F-92



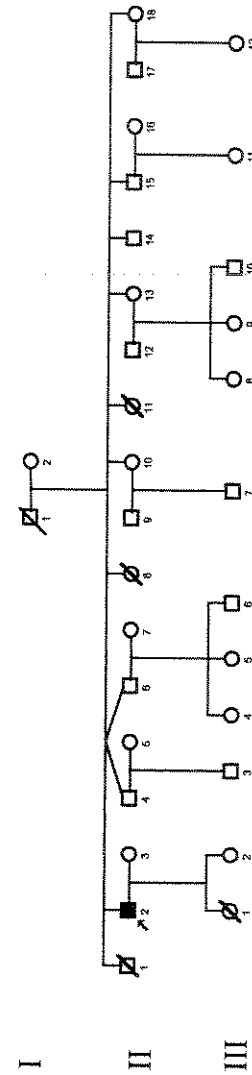
F-95



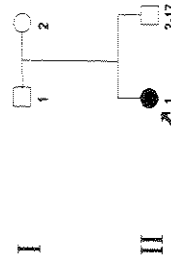
F-98

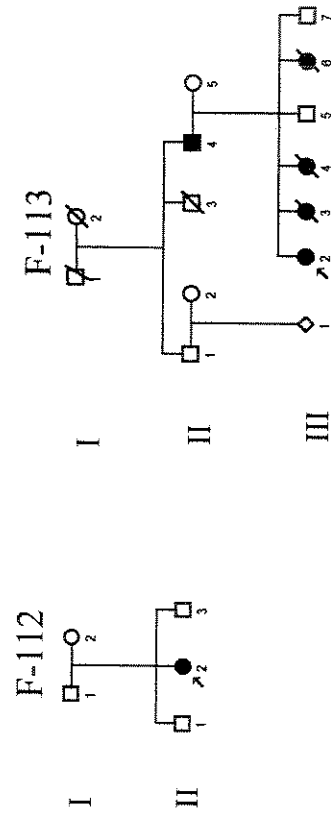


F-107



F-106





***FIGURAS DE ALGUMAS MUTAÇÕES
ESTUDADAS***

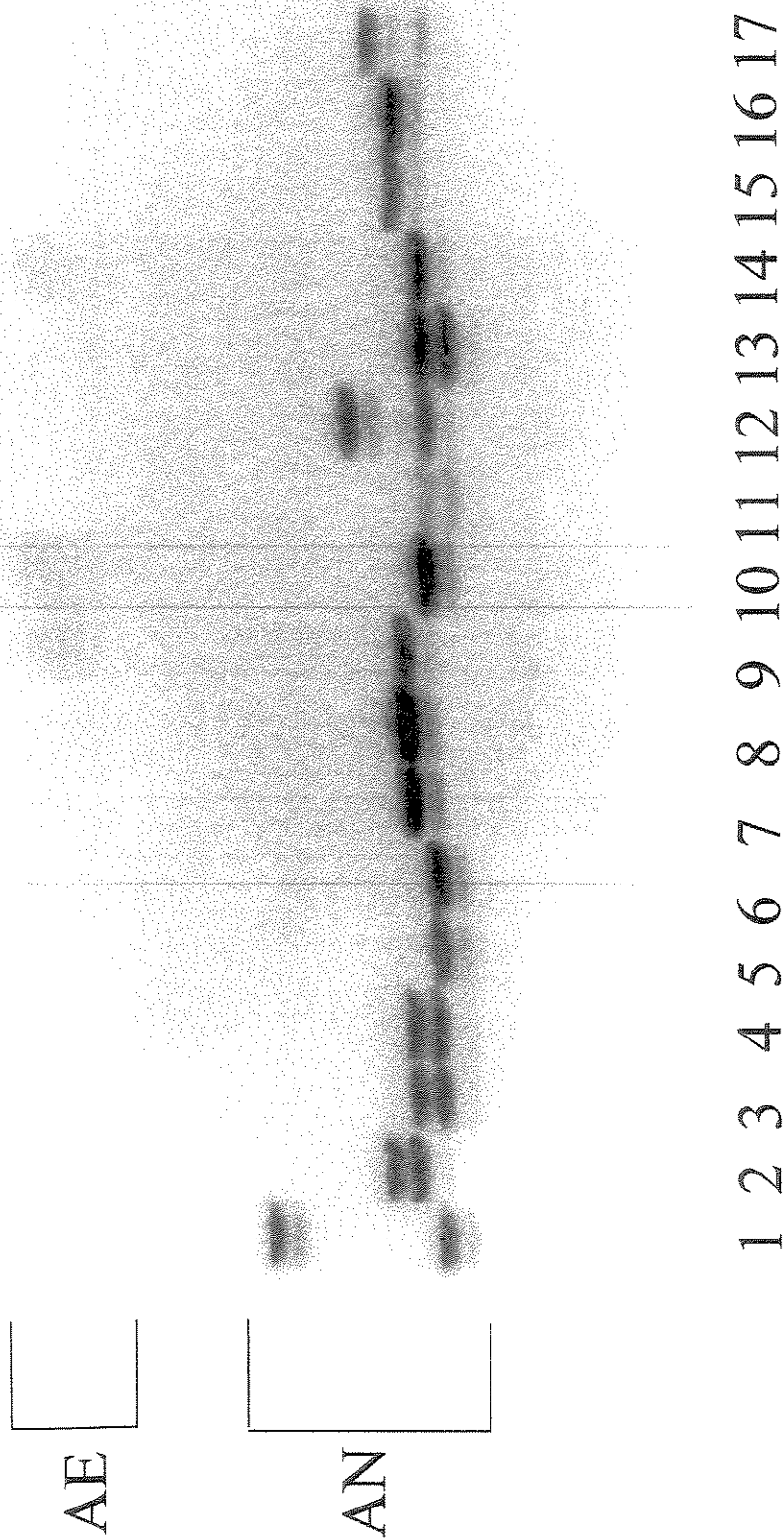


Figura 1: Análise do produto da PCR para mutação *SCA1* em gel desnatante de poliacrilamida 6%.

Coluna 1 = controle negativo; Colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 16 e 17 = Indivíduos negativos;

Coluna 9, 10 e 14 = Indivíduos positivos.

AE = alelo expandido; AN = alelo normal.

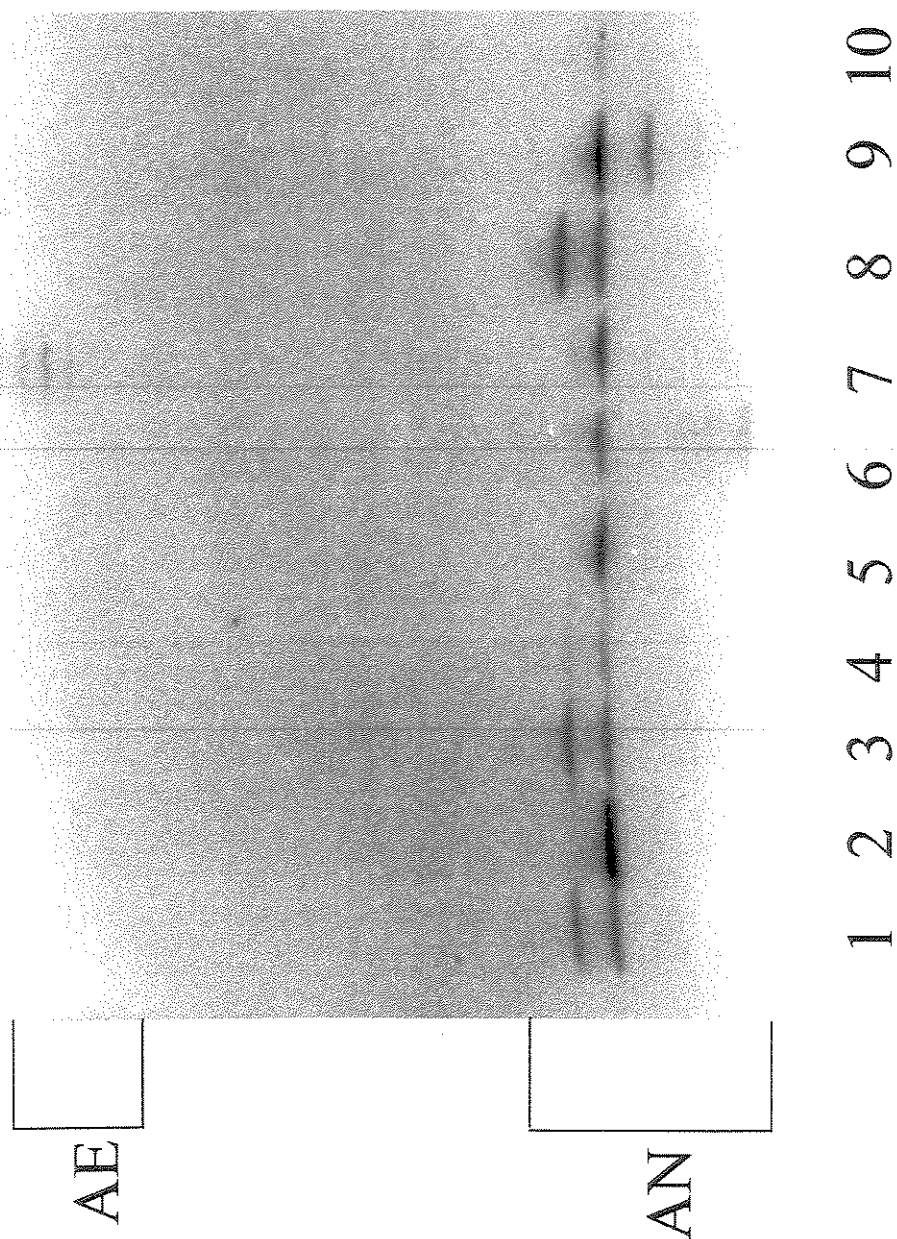


Figura 2. Análise do produto da PCR para mutação SCA2 em gel desnaturante de poliacrilamida 6%.
 Coluna 1 = controle negativo; Colunas 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 = indivíduos negativos; Coluna 7 = indivíduos positivos.
 AE= alelo expandido; AN = alelo normal.

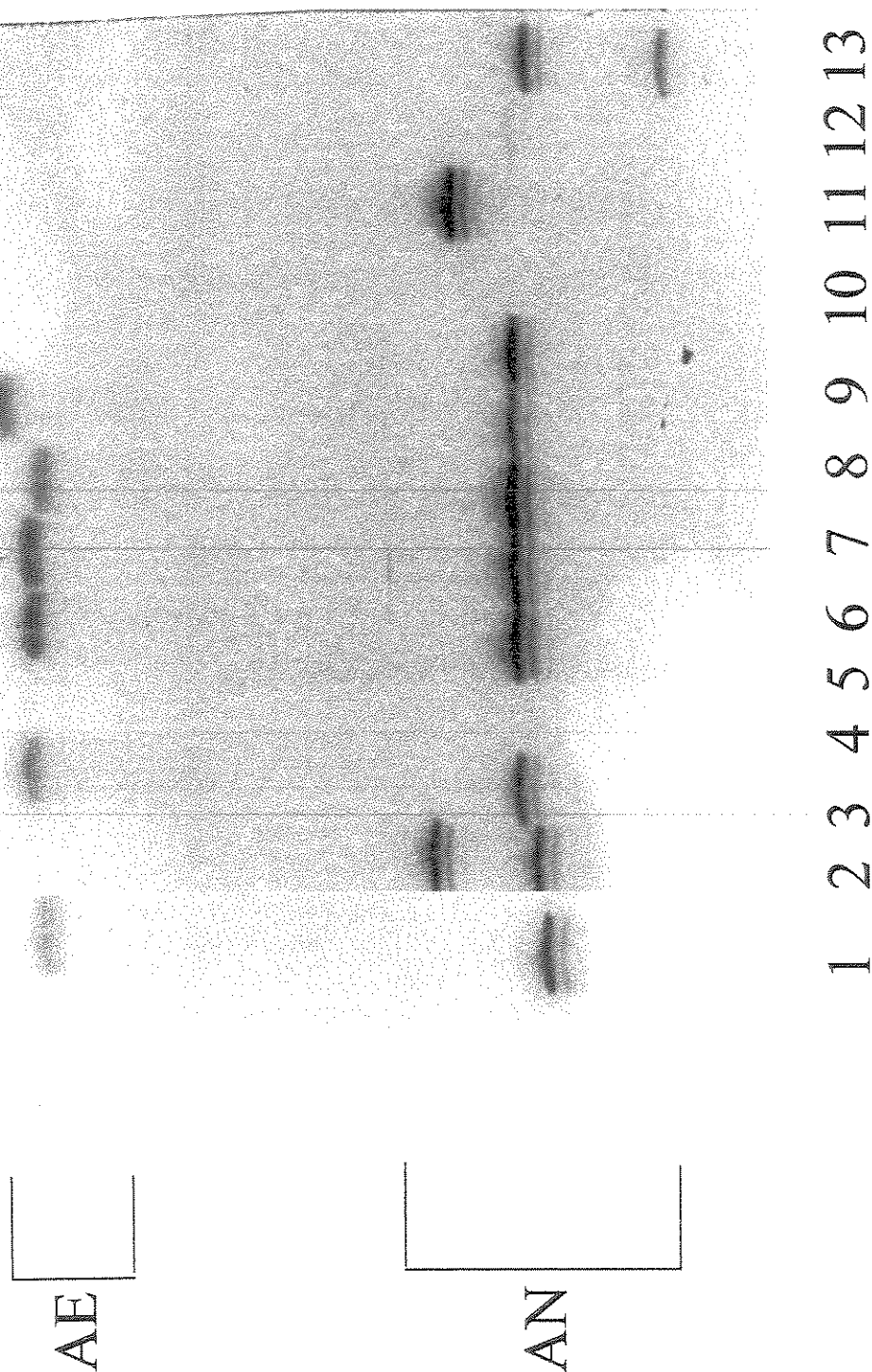


Figura 3. Análise do produto da PCR para mutação *SCA3/MJD* em gel desnatante de poliacrilamida 6%. Coluna 1 = controle positivo; Colunas 2, 9, 11 e 13 = indivíduos negativos; Colunas 3, 5, 6, 7, 8 = indivíduos positivos. AE = alelo expandido; AN = alelo normal.

FORMULÁRIOS CLÍNICOS



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE PARA O LABORATÓRIO DE GENÉTICA
MOLECULAR

Seguir as instruções para coleta de amostras de sangue para extração direta de DNA e contactar o laboratório de genética molecular para obter autorização para a coleta (ramal: 6-88902).

Data da coleta: _____ Nome do paciente: _____ Idade: _____
Filho de consanguíneos: () sim () não
Origem étnica dos avós: Maternos: _____ - _____ Paternos: _____ - _____
HC: _____
Registro no Dep. de Genética Médica (DGM): _____
Ambulatório: _____
Docente Responsável: _____
Diagnóstico Clínico: _____
Resumo da história clínica e exame físico (incluir idade de início dos sintomas): _____

Heredograma: Sexo feminino ☐ Sexo masculino ☐
Clinicamente afetado ☒ ☐ Possivelmente afetado ☐ ☐
Indivíduo cuja amostra foi colhida →



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

**FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INDIVÍDUOS COM ATAXIA
ESPINOCEREBELAR**

1. Nome _____
 2. HC: _____ 3. DGM: _____
 4. Data da consulta: _____ 5. Número no heredograma: _____
 6. Origem étnica dos avós: 6.1. Maternos _____ 6.2. Paternos: _____
 7. Herança genética: (caso isolado, autossômica recessiva, autossômica dominante, herança materna, herança ligada ao X): _____

8. História Médica Pgressa:

8.1. Diagnóstico de ataxia: Sim () Não () Idade: _____
 8.2. Primeiros sintomas: _____ Idade: _____
 8.3. Outros sintomas neurológicos: _____
 8.4. Outras condições médicas (ex. diabetes, hipertensão, etc.): _____

9. Uso de Drogas ou Medicções:

9.1 Bebida alcoólica: _____
 9.2 Medicação em uso (incluir dose e por quanto tempo vem tomando): _____

10. Achados Neurológicos:

	Sim	Não	Idade de Aparecimento
10.1. Alterações Cognitivas:	_____	_____	_____
10.2. Movimentos Oculares anormais:	_____	_____	_____
10.2.1. Nistagmo:	_____	_____	_____
10.2.2. Movimentos sacádicos lentos	_____	_____	_____
10.3. Diminuição da acuidade visual	_____	_____	_____
10.4. Atrofia óptica	_____	_____	_____
10.5. Retinite pigmentosa	_____	_____	_____
10.6. Diminuição da acuidade auditiva	_____	_____	_____
10.7. Disartria	_____	_____	_____
10.8. Disfagia	_____	_____	_____
10.9. Incoordenação:			
10.9.1. Membros superiores	_____	_____	_____
10.9.2. Membros inferiores	_____	_____	_____
10.9.3. Marcha	_____	_____	_____
10.10. Tremor	_____	_____	_____
10.11. Câimbras musculares	_____	_____	_____
10.12. Fasciculações:			
10.12.1. Membros	_____	_____	_____
10.12.2. Facial	_____	_____	_____
10.12.3. Perioral	_____	_____	_____
10.12.4. Lingual	_____	_____	_____
10.13. Sinais extrapiramidais	_____	_____	_____
10.14. Movimentos involuntários	_____	_____	_____
10.15. Distonia	_____	_____	_____
10.16. Reflexos tendinosos: Membros superiores:	Normal ()	Aumentado ()	
		Diminuídos ()	Ausente ()
Membros inferiores:	Normal ()	Aumentado ()	
		Diminuído ()	Ausente ()

10.17. Sensibilidade: _____
 10.18. CT: _____
 10.19. MRI: _____
 10.20. EMG: _____
 10.21. Autopsia: _____



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 1 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com ataxia espinocerebelar. O objetivo geral do estudo é o de determinar a frequência e as características moleculares das diferentes formas de ataxia espinocerebelar. Esses estudos poderão levar a identificação do defeito genético que causa a forma de ataxia da qual sou portador. Além de levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado das ataxias espinocerebelares. Tanto as amostras de DNA, de linhas celulares e a informação médica a meu respeito bem como a respeito de minha família que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com ataxias espinocerebelares. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre as ataxias. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para confirmação do meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a uma tomografia computadorizada ou uma ressonância magnética de crânio. Uma amostra de sangue venoso será colhida (20 a 30 ml, o equivalente a duas colheres de sopa). Hospitalização não será necessária. Os procedimentos mencionados acima, com exceção da coleta da amostra de sangue, fazem parte dos cuidados médicos de rotina para um paciente com ataxia. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderão ser feitas durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 a 30 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 2 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares obtidos, serão disponíveis através do meu acompanhamento no Ambulatório de Neurogenética que funciona toda segunda-feira das 8:30 as 12:00hs no 2º andar do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (019) 788-8908. Esse Ambulatório oferece um atendimento multidisciplinar com a participação de geneticista clínico, neurologista, psicólogo(a), assistente social e fisioterapeuta. É importante salientar que qualquer membro da minha família que desejar obter orientação genética poderá ser atendido Ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, e os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra. Iscia Lopes Cendes, tel (019) 788-8907 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP. Eu reconheço também que a Dra. Iscia Lopes Cendes pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA, Página 3 de 3

Título do projeto: Estudos Genéticos em Ataxias Espinocerebelares

Investigador principal: Dra. Iscia Lopes Cendes

Eu confirmo que o(a) Dr(a). _____
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos,
desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado,
assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar
desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir
do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse
formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data