



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PEDRO ALMIRO AMARO DE MENEZES E CASTRO

***CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DAS FAMÍLIAS
COM DOENÇA DE MACHADO JOSEPH NA REGIÃO CENTRO.***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA MARIA CRISTINA JANUÁRIO SANTOS

03/2018

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FENOTÍPICA DAS FAMÍLIAS COM DOENÇA DE MACHADO JOSEPH NA REGIÃO CENTRO.

Pedro Castro ¹; Cristina Januário^{1,2}, Joana Ribeiro², Inês Cunha²

1. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal
2. Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

Autor correspondente:

Pedro Almiro Amaro de Menezes e Castro

pedro.aam.castro@gmail.com

Resumo

A Doença de Machado Joseph (DMJ) é uma doença de poli-glutaminas herdada de forma autossómica dominante, de aparecimento tardio, com incapacidade funcional progressiva e morte entre a 5ª e 6ª década de vida. Foram analisados 91 indivíduos com diagnóstico de DMJ seguidos na consulta de Doenças Neurogenéticas do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC) para caracterização demográfica, genotípica (número de *repeats* do alelo *wild type*, do alelo mutado e transmissão parental) e caracterização fenotípica (sintoma de apresentação, *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) e *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA)). Na população em estudo verificou-se uma relação inversa estatisticamente significativa entre o número de *repeats* do gene *ATXN 3* e a idade de início dos sintomas, sendo o sintoma de apresentação mais frequente a ataxia da marcha e o desequilíbrio. Os doentes com maior número de *repeats* (num intervalo de 63-81 *repeats*) apresentaram ainda uma maior deterioração do score SARA e probabilidade de transmissão paterna da doença, apesar de na população em estudo a transmissão ser essencialmente materna. Não foi encontrada uma relação entre o score MoCA e o número de *repeats* do alelo mutado. Fica em aberto a possibilidade de estudo mais aprofundado dos *repeats* do alelo *wild type* para explicar as diferenças fenotípicas apresentadas entre doentes da mesma família e com o mesmo número de *repeats*.

Palavras chave: Doença de Machado Joseph, clínica, genética

Abstract

Machado Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant inherited disorder inserted in the polyglutamine disorders, with mild age beginning, progressive incapacity and death in the 5th and 6th decades of life. 91 patients with MJD diagnosis, followed in CHUC's Neurogenetic department were analysed for demographic, genotypic (wild type repeats and mutated repeats and parent inheritance) and phenotypic (presenting symptom, *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) and *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA)) characterization. It was found an inverse correlation between the number of repeats of the *ATXN3* gene and the age of symptomatic presentation, with gait ataxia and balance disorders being the most frequent presentation symptoms. The patients with more repeats (in an interval between 63 and 81) had also a bigger SARA score deterioration and transmission of disease from the father, although in the remaining group the transmission was essentially from the mother. It was not found a relationship between the score MoCA and the number of repeats of the *ATX3* gene. It remains in the horizon the possibility for a deeper study of the wild type's repeats to explain the differences between individuals within the same family and with the same number of repeats.

Keywords: Machado Joseph disease, genetics, phenotyp

1. Introdução

As ataxias espinho-cerebelosas (SCAs, do inglês spinocerebellar ataxia) são um grupo extenso de ataxias transmitidas de forma autossômica dominante, que têm em comum o aparecimento tardio dos sintomas (por volta da meia idade) e o seu carácter lentamente progressivo (agravamento da doença com o tempo). Este grupo de doenças neurodegenerativas leva a uma incapacidade funcional progressiva, resultando usualmente em morte entre a 5ª e 6ª década de vida.

Desde a sua primeira descrição em 1958, foram identificados mais de 30 subtipos destas ataxias, sendo academicamente aceite a sua divisão em três grandes categorias consoante aquela que é a natureza causativa da mutação genética: 1) ataxias de mutação dinâmica codificante, ou ataxias das poliglutaminas, que consiste numa expansão do número de repetições de trinucleotídeos CAG (que codifica o aminoácido glutamina), com alteração da estrutura e conseqüente ganho/perda de função da proteína codificada; 2) ataxias de mutação dinâmica não codificante, causadas por expansões de unidades repetitivas numa região do gene não codificadora da proteína em causa; 3) ataxias por mutações convencionais (como deleções, mutações missense, nonsense, por splicing) em genes específicos (Lima e Bettencourt, 2011). Este texto vai focar-se mais propriamente na ataxia espinho-cerebelosa tipo 3 (SCA3), também chamada Doença de Machado-Joseph (DMJ), uma das doenças de poliglutaminas.

A SCA 3 ou Doença de Machado-Joseph, deve o nome a Antone Joseph e William Machado, dois doentes de descendência portuguesa (com origem açoriana) emigrados nos Estados Unidos da América, em quem foi, pela primeira vez, descrita clinicamente a doença, em 1972 (Nakano et al, 1972). Inicialmente acreditava-se que seriam duas doenças distintas, dado a heterogeneidade fenotípica entre os doente-caso. Na altura

supôs-se que a doença teria origem na população portuguesa (que seria a portadora e transmissora da doença), apresentando uma distribuição mundial ligada aos Descobrimentos e rota da Seda (Brasil, Portugal, Índia) (Nakano et al, 1972). Desde essa altura, muitos outros casos foram descritos em diferentes regiões do Globo, sendo neste momento considerada a ataxia autossômica dominante mais comum em todo o mundo (Coutinho e Andrade, 1978; Rosenberg, 1992; Ranum et al.,1995; Schols et al., 2004).

Portugal é um país com prevalência elevada da doença, correspondendo a uma prevalência de 3,12/100000 habitantes (Coutinho et al, 2013). Na região dos Açores a prevalência da doença é superior: 41,6/1000000 habitantes (de Araújo et al, 2016). A prevalência da doença na região centro é a mais alta em Portugal Continental (2,4-7,8 por 100000 habitantes) (Coutinho et al, 2013), estando atualmente estudadas e descritas 44 famílias nesta região, seguidas na consulta de Doenças Neurogenéticas (DNG) do CHUC. A Ilha das Flores, no arquipélago dos Açores é a região do Mundo com maior prevalência da doença, com uma frequência de 1 em cada 239 habitantes.

Tabela 1. Prevalência relativa de DMJ em relação às ataxias autossômicas dominantes (Adaptado de Paulson, 2012)

<i>Estudo</i>	<i>População-alvo</i>	<i>% de casos de MJD</i>
<i>Schols et al., 1995</i>	<i>Alemanha</i>	<i>49 %</i>
<i>Durr et al., 1996</i>	<i>Europa, Norte de África</i>	<i>28%</i>
<i>Pujana et al., 1999</i>	<i>Espanha</i>	<i>15 %</i>
<i>Nagaoka et al., 1999</i>	<i>Japão</i>	<i>20 %</i>
<i>Saleem et al., 2000</i>	<i>Índia</i>	<i>5 %</i>
<i>Soong et al., 2001</i>	<i>China</i>	<i>47 %</i>
<i>Silveira et al, 2002</i>	<i>Portugal/Brasil</i>	<i>63 %</i>

Como referido anteriormente, a DMJ é uma doença neuro degenerativa de expansão de poliglutaminas, em que há uma expansão patológica de trinucleotídeos CAG (que codificam o aminoácido glutamina) numa região codificante de um gene específico. No caso da DMJ o gene afetado é o gene *ATXN3* (o gene passa a ser constituído por um alelo mutado e um alelo normal, designado wild type), localizado no braço longo do cromossoma 14 (14q32.1) e que codifica a proteína ataxina-3. A ataxina-3 é uma proteína que pertence à família das proteases de cisteína (Lima e Bettencourt, 2011), cuja função biológica ainda não está completamente elucidada, mas que se pensa estar relacionada com a proteólise mediada por ubiquitinas (Doss-Pepe et al., 2003; Scheel et al., 2003; Chai et al., 2004). Esta mutação dinâmica resulta numa expansão de poliglutaminas ao nível do terminal carboxilo da proteína em causa, conferindo um possível ganho de função patológico à proteína ataxina-3. Em termos moleculares, a estrutura da proteína mutada passa a ser constituída por uma repetição de 55-84 glutaminas consecutivas, ao invés da proteína normal, que possui entre 10 e 51 resíduos de poliglutaminas (Maciel et al., 2001; Gu et al., 2004; Padiath et al., 2005, Nóbrega and Almeida, 2012). Assim, a SCA3 é considerada uma doença de limiar patogénico elevado, uma vez que nas doenças de poliglutaminas é usual que as expansões trinucleotídeas se tornem patológicas com níveis mais baixos de expansões, entre 36 e 40 (Bauer and Nukina, 2009). A acumulação intracelular da proteína mutada insolúvel ligada a ubiquitinas (as designadas inclusões intranucleares, resistentes à eliminação) é um achado característico deste grupo de doenças e é visto como um achado patológico, pelo facto de estes depósitos alterarem a função da zona onde se acumulam. (Martindale et al., 1998; Yamada et al., 2000; Nóbrega and Almeida, 2012). Esta disfunção pode ocorrer ao nível celular, com alteração do transporte axonal ou da função nuclear, bem como por um mecanismo indireto, com recrutamento de outras proteínas, fatores de transcrição e unidades do proteossoma

(Paulson, 1999; Goti et al., 2004; Nóbrega and Almeida 2012). A expressão da proteína ataxina-3 mutante é sistémica, no entanto a sua acumulação ocorre predominantemente no SNC, ao nível do cerebelo, tronco cerebral, *substantia nigra*, núcleos ponticos e *striatum*, responsáveis pela sintomatologia pleomórfica dos doentes com DMJ.

O principal achado clínico dos doentes com DMJ é a ataxia progressiva da marcha, por neurodegenerescência preferencial do cerebelo e das suas conexões. No entanto, a neurodegenerescência afeta outras estruturas do SNC – tronco cerebral, incluindo centros de controlo oculomotor, sistema piramidal e extrapiramidal, neurónio motor alfa e nervo periférico (Rub et al., 2004b; Friedman et al., 2003, Nóbrega and Almeida, 2012). Assim, a ataxia pode ser acompanhada por um diverso espectro sintomático, refletindo os sistemas neuronais que foram afetados.

O perfil fenotípico de cada doente é bastante heterogéneo, variando com a idade de aparecimento da doença, com o grau de evolução da doença e com o número de *repeats* do alelo mutado. Esta elevada variabilidade fenotípica permitiu a divisão dos doentes por quatro grupos, consoante a manifestação dominante (Sequeiros e Coutinho, 1993; Matsumura et al., 1996a, Paulson, 2015). O “Tipo I” da doença tem o início mais precoce, entre os 5 e os 30 anos, sendo caracterizada por ligeira ataxia da marcha e dos membros, distonia, rigidez, bradicinésia, sinais piramidais e oftalmoplegia progressiva externa. Este subtipo da doença tem uma progressão mais rápida que os outros, sendo rapidamente incapacitante. O “tipo II” é a forma mais comum da doença, com início na meia-idade entre os 35 e os 40 anos, com ataxia progressiva da marcha e dos membros, oftalmoplegia progressiva externa e sinais piramidais. O “Tipo III” é a segunda forma mais comum da doença, tendo um início tardio, por volta dos 50 anos de idade, e sendo caracterizado por ataxia e sinais piramidais, com moderada progressão para qualquer um dos outros grupos. O “Tipo IV” descrito em doentes entre os 38 e os 47 anos, com um quadro de

parkinsonismo progressivo (podem apresentar distonia, bradicinesia, tremor, rigidez) e envolvimento severo do sistema nervoso periférico (SNP), com amiotrofia, fasciculações e arreflexia generalizada. O quadro de neuropatia periférica generalizada correlaciona-se mais com a idade do doente do que com o número de expansões, o que comprova que a DMJ acelera o processo de degenescência fisiológico. Este subtipo de doença é responsivo à terapêutica com L-DOPA (Tuite et al., 1995; Buhmann et al., 2003). Recentemente foi descrito o “Tipo V” da DMJ, um quadro caracterizado por paraplegia espástica, com ou sem ataxia. (Lysenko et al., 2010).

A idade de aparecimento dos sintomas varia bastante entre doentes, mesmo dentro da mesma família. Este fenómeno deve-se ao facto de o número de expansões se correlacionar de forma indireta com a idade de aparecimento da doença e com o sintoma de apresentação. Assim, a DMJ manifesta os primeiros sintomas tipicamente na meia-idade, entre os 35 e os 40 anos, com ataxia da marcha e dos membros, acompanhada por alterações da articulação da linguagem (disartria) e do sistema oculomotor (oftalmoplegia externa progressiva). Com a progressão da doença, praticamente todos os sistemas neuronais podem ser afetados, sendo frequente o aparecimento de alterações da oculomotricidade, com nistagmus, decomposição dos movimentos de perseguição, diminuição dos movimentos oculares de sacada, oftalmoparésia externa progressiva acompanhada de retração palpebral. Em estádios mais avançados da doença a locomoção torna-se impossível, bem como a realização de AVD básicas, prendendo o doente a uma cadeira de rodas e tornando-o dependente de cuidados continuados. Os doentes podem ainda apresentar atrofia dos músculos da face (na região do facial e temporal), distonia e espasticidade (especialmente em doente mais jovens). Em estudos mais recentes, foram registadas alterações ao nível de processamento subcortical e do processo cognitivo, no

entanto a demência não se considera um achado típico mesmo em estádios avançados. (Zawacki et al., 2002; Kawai et al., 2004).

A par das alterações descritas, é frequente encontrar nestes doentes alguns sintomas não-motores, cujo mecanismo ainda não está completamente compreendido, tais como distúrbios do sono, alterações cognitivas, comportamentais e ainda disfunção olfativa (Rub et al., 2008). Distúrbios do sono (como dificuldade em adormecer, despertares noturnos e conseqüente sonolência diurna) são fenómenos frequentemente encontrados em doentes com envolvimento do tronco cerebral. (Schols et al., 1998; Friedman et al., 2003; Iranzo et al., 2003). A síndrome pernas irrequietas é um fenómeno também frequentemente descrito, podendo mesmo ser a única manifestação da doença num doente com um número intermédio de repetições. (Van Alfen et al., 2001). Os doentes com DMJ apresentam também uma disfunção executiva e da capacidade de atenção, assim como um humor moderadamente deprimido, com tendência à depressão. A disfunção do sistema nervoso autónomo, também designada disautonomia, tem sido um achado regularmente descrito nos doentes com DMJ, com afeção tanto do sistema nervoso simpático como parassimpático, manifestando-se essencialmente por hipotensão ortostática e bexiga neurogénica, com fenómeno de noctúria (Takazaki et al., 2013). Outros achados frequentemente encontrados são fadiga, essencialmente ligada a fenómenos depressivos e patológicos do sono (Martinez AR et al., 2017) e a dor crónica (sobretudo na zona da região lombar). Após o diagnóstico da doença, o tempo médio de sobrevida é estimado em aproximadamente 20 anos (Paulson, 2012).

Neste momento, não existe um tratamento curativo para a DMJ, sendo o tratamento oferecido aos doentes apenas de alívio sintomático, não afetando a progressão da doença. Os doentes que apresentam sinais de parkinsonismo (bradicinesia, tremor, rigidez, distonia), podem responder de forma eficaz à administração de agentes dopaminérgicos.

Por este motivo, é de capital importância o estudo mais aprofundado dos mecanismos da doença e das funções da proteína ataxina-3 no organismo, para que possam ser feitos avanços na oferta terapêutica e conseqüentemente interferir na história natural da doença. Além da melhor oferta de cuidados de saúde é importante estabelecer mecanismos de rastreio em relação aos elementos da família do doente em risco de serem portadores da mutação, para que estes possam ser identificados e aconselhados em termos de planeamento familiar e para caso surja um tratamento curativo da doença poderem ser acompanhados, monitorizados e tratados desde cedo, atenuando o decaimento funcional rápido que sofrem desde a manifestação inicial dos sintomas até à morte. A evolução tecnológica e dos métodos de sequenciação do DNA tem sido um pilar importante no rastreio genético para elementos da família de doentes portadores da mutação, permitindo o cálculo de risco e da probabilidade de sofrer a doença. Sendo uma doença incapacitante e progressiva, é crucial criar uma rede de apoio ao doente/portador da mutação, bem como à sua família para assegurar uma vida familiar ativa e sã, dentro daquilo que são as limitações claras dos doentes com DMJ.

Objectivo

Este estudo é um estudo transversal, não-intervencional, com recolha de dados clínicos completamente anónimos. O projeto terá como objetivo a caracterização genética e fenotípica das famílias com DMJ na região Centro, procurando estudar a transmissão das expansões dentro de uma família e correlacionar as características genéticas individuais com a idade de aparecimento da doença e com as manifestações fenotípicas iniciais. Além disso, será feito um estudo da evolução da ataxia nestes doentes, através da *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA), procurando estabelecer uma relação entre a evolução sintomática e o número de expansões, e ainda uma avaliação da função cognitiva destes doentes, através do *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA). Este estudo

familiar é importante uma vez que existe uma relação entre o tamanho da expansão (número de repetições) e a precocidade de aparecimento e manifestações da doença. Assim, é possível, estudando as famílias, procurar elementos que estão em risco de sofrer a doença para efeitos de cálculo de risco e probabilidade de sofrer a doença e de a passarem aos seus descendentes.

2. Métodos

Este estudo teve como base uma base de dados integrando uma *cohorte* de 91 indivíduos, seguidos na consulta DNG do CHUC. As informações foram recolhidas desde 2001, constituindo dados de histórico a integrarem a análise a desenvolver neste estudo.

Foi realizada uma análise quantitativa, por via de métodos estatísticos, de algumas variáveis que foram sujeitas a correlação, de acordo com o objetivo do presente estudo. Foi justificada a representatividade da amostra com base na população alvo e desenvolvidos métodos para avaliação e correlação das variáveis em estudo: o número de *repeats* do doente no alelo normal e no alelo *wild type*, a idade de início dos sintomas, o sintoma de apresentação, o progenitor de quem foi herdada a doença, o score SARA (à apresentação e após 1 ano) e o score MoCA. O score SARA consiste num método de avaliação da ataxia, um sintoma predominante dos doentes com DMJ. O score MoCA foi aplicado a estes doentes com o intuito de avaliar a função cognitiva num determinado momento. Um score superior ou igual a 26 é considerado normal, um valor <26 é considerado uma deficiência, validado para idade e grau de escolaridade da população em estudo.

As tabelas, os gráficos e a análise estatística apresentada neste estudo foram criados no *Microsoft Office Excel*.

3. Resultados

Os dados clínicos recolhidos foram agrupados sob a forma de tabela informatizada ou base de dados para análise posterior. A Figura 1 representa a distribuição dos casos de DMJ na região centro, com base na origem familiar da doença, podendo observar-se a presença de alguns nichos populacionais em que ocorre um maior número de casos (Figueira da Foz, Montemor-o-Velho, Pedrogão Grande, Gouveia, Guarda, Vila Nova de Poiares).



Figura 1. Distribuição da origem dos casos de DMJ na região centro

A dimensão da amostra analisada (91 pacientes) permite definir um rácio de 3,91/100 000 habitantes (ie. 91 observações em 2327755 habitantes da região centro, de acordo com o último Censos do INE, <http://censos.ine.pt/xportal>). O rácio calculado é coerente com a prevalência identificada para a doença na região centro de Portugal Continental

(2,4-7,8 por 100000 habitantes), concluindo-se, por essa razão, da representatividade da amostra.

No presente estudo, a distribuição da amostra em termos de género foi: 55 mulheres, correspondendo a 60,4% da amostra, 36 homens, correspondendo a 39,6%. A média da idade observada de início dos sintomas foi de 41,78 anos, num intervalo de [14,70]. Os sintomas iniciais mais frequentes foram a ataxia da marcha (36%) e o desequilíbrio (35%). O gene *ATXN3* é constituído por um alelo *wild type* e um alelo com a mutação dinâmica. Caracterizada a distribuição dos valores nominais de *repeats* de cada alelo, procedeu-se ao seu agrupamento em classes utilizando para o efeito a relação de Sturges e construída a distribuição de frequências para as classes consideradas (Figura 2 e 3). O número de registos de *repeats* do alelo *wild type* foi de 52, com uma média de 21,3 *repeats*, num intervalo de [14,27].

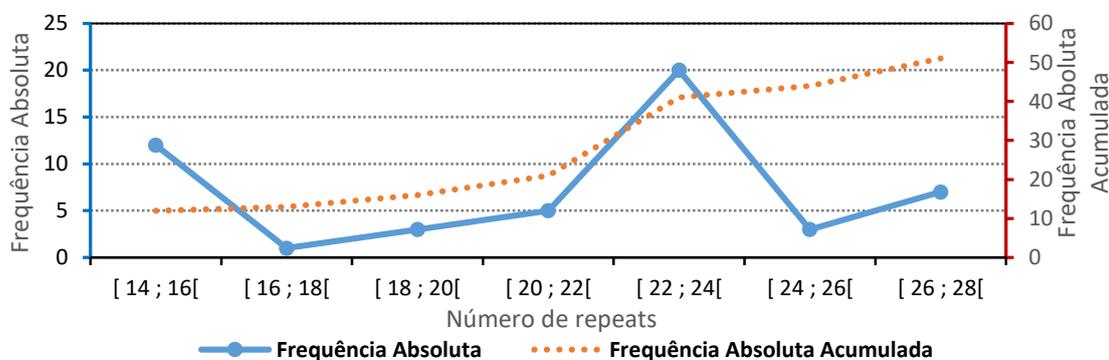


Figura 2. Distribuição dos repeats do alelo *wild type*

O número de registos de *repeats* do alelo mutado foi de 72, com média de 70,6 *repeats*, no intervalo de valores inteiros de [63,81], sendo 73 o número de repetições mais frequente. A Figura 3 demonstra a variação do número de *repeats* de cada alelo na amostra observada.

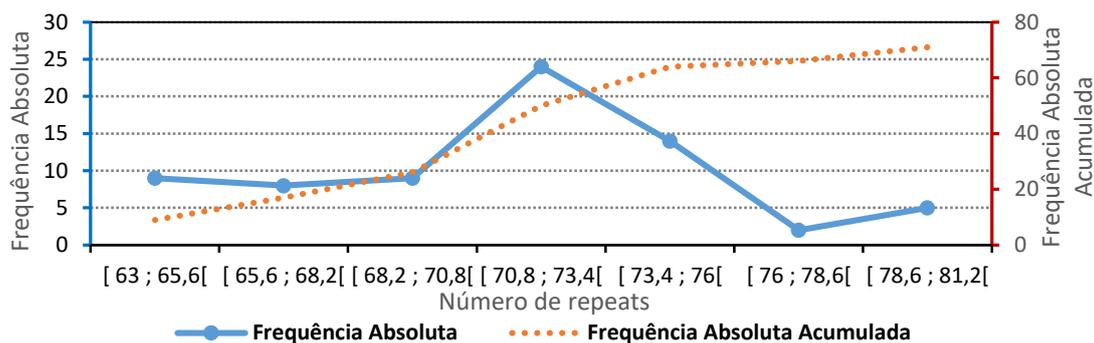


Figura 3. Distribuição dos repeats do alelo mutado

A Figura 4 pretende relacionar o sintoma inicial, de acordo com a respetiva média do número de *repeats* do alelo mutado (a partir daqui designado como *repeats*) e com a média de idade de início dos sintomas. Como é possível interpretar pelo gráfico, os sintomas neuroendócrinos e a disartria apresentam o valor médio de *repeats* mais elevado (75 *repeats*) e a diplopia é o sintoma inicial de apresentação mais tardio (idade média de apresentação mais avançada, 47 anos).

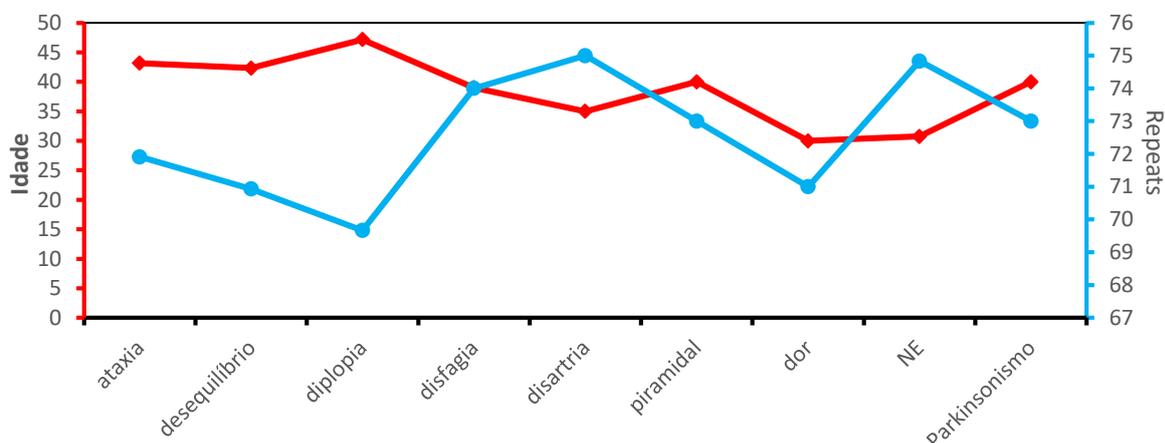


Figura 4. Avaliação do sintoma inicial (por idade média de início e média de repeats)

Para estabelecer uma correlação entre a idade de início dos sintomas e os *repeats*, foi aplicado o teste de Pearson. Considerando a totalidade das observações na amostra obtém-se:

Tabela 2. Correlação linear entre idade e número de repeats

	Idade início sintomas	Repeats
Idade início sintomas	1	
Repeats	-0,707089785	1

Uma vez que o número de observações da amostra não é adequado para estabelecer uma correlação forte entre as duas variáveis, foi aplicado novo teste de correlação linear (correlação de Pearson) para duas variáveis: média de idade de início dos sintomas e *repeats* (Tabela 3). Assim, foi possível obter um coeficiente de correlação de -0,89, que sugere uma relação inversa entre as duas variáveis, ou seja, quanto maior for o número de *repeats* do alelo mutado do doente menor será a idade de aparecimento dos sintomas.

Tabela 3. Correlação entre média de idade de início dos sintomas e o número de repeats

	Repeats	Média idade
Repeats	1	
Média idade	-0,896718557	1

Com base na indicação proposta pelo coeficiente de correlação linear (coeficiente de Pearson) observado para as variáveis média de idade de aparecimento dos sintomas (designada como idade), e a variável *repeats*, foi conduzida uma análise de regressão linear, baseada em mínimos quadrados. Para verificar a adequação do ajustamento linear aos dados, utiliza-se a “análise de variância da Regressão” (ie. ANOVA da regressão). Esta análise, conduzida em Excel, tem a seguinte estrutura:

Fonte de Variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Regressão	p-1	SQreg	SQreg/p-1	QMreg/QMres	
Resíduos	n-p	SQres	SQres/n-p		
Total	n-1	SQtotal	Sqtotal/n-1		

g.l. – graus de liberdade, na regressão e nos Resíduos; S.Q. – Soma dos Quadrados devidos à regressão (SQreg) e aos resíduos (SQres); Q.M. – Quadrados Médios da regressão (QMreg) e dos resíduos (QMres), avaliados com base no número de graus de liberdade; p = número de variáveis do modelo de regressão; n = número de observações ou dimensão da amostra.

Para avaliar a “qualidade” do modelo de regressão utiliza-se o coeficiente de determinação, definido R^2 , e calculado por SQ_{reg}/SQ_{total} . Calculando, com base nas 71 observações, o valor médio da idade para cada valor observado para a variável *repeats*, obtém-se os valores apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 . Média de idade de início dos sintomas para cada valor de repeats

Repeats	63	64	65	66	68	69	70	71	72	73	74	75	77	79	80	81
Média idade	55,0	46,8	50,0	55,0	53,2	50,3	52,2	44,5	47,6	39,2	32,5	31,9	27,0	35,0	28,0	22,7

Considerando a variável *repeats* como variável independente e efetuando a regressão linear entre a média de idade de início dos sintomas e o número de *repeats*, obtém-se o seguinte modelo de regressão linear. (Tabela 5 e Equação 1)

Tabela 5. Valores estatísticos de regressão linear entre idade e repeats

	Coeficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	165,09	16,29	10,13	7,95E-08	130,14	200,04
Repeats	-1,72	0,23	-7,58	2,55E-06	-2,20	-1,23

O modelo de regressão linear é então:

$$\text{Idade} = 165,09 - 1,72 \text{ Repeats}$$

(16,29) (0,23)

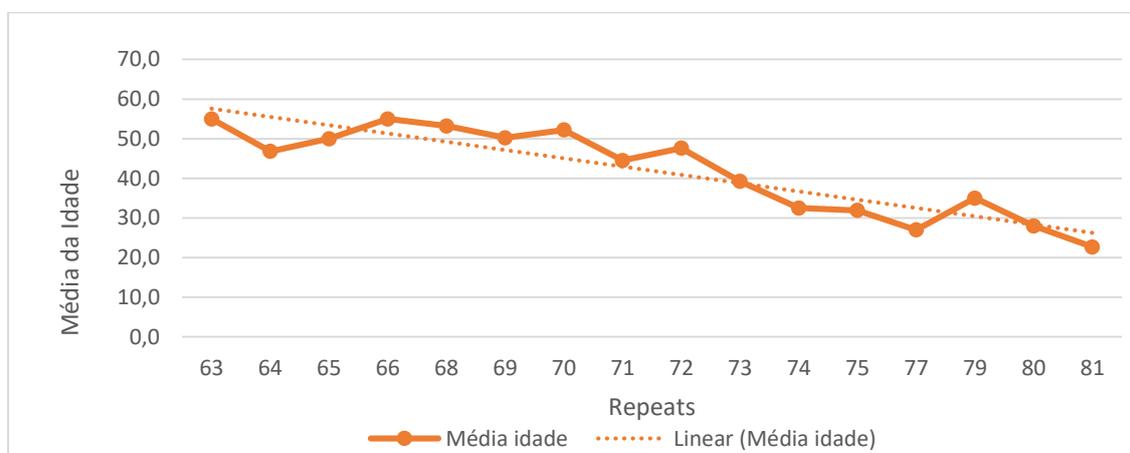


Figura 5. Regressão linear entre idade e repeats

Os valores da estatística *t-Student* para o valor médio dos coeficientes mostra a respectiva significância. Os intervalos de confiança de 95% estão igualmente definidos para cada uma das constantes do modelo linear (ie. $y = ax + b$), sendo $a \in [-2,20; -1,23]$ e $b \in [130,14; 200,04]$. Os resultados de “valor P” indicam ainda a significância do modelo.

Conduzida a análise de variância obtém-se os valores apresentados na Tabela 6, resultando num valor de R^2 próximo de 1, que indica um bom ajustamento, confirmado pela estatística F da regressão (Tabela 7).

Tabela 6. ANOVA-variância da amostra

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	1450,49	1450,49	57,47	2,54824E-06
Residual	14	353,37	25,24		
Total	15	1803,86			

Tabela 7. Regressão estatística da amostra

R múltiplo	0,896718557
R^2	0,804104171
R^2 ajustado	0,790111612
Erro-padrão	5,024007039
Observações	16

Durante o estudo foi visível uma diferença relevante entre a idade de aparecimento dos sintomas dentro de doentes da mesma família com o mesmo número de *repeats* (Tabela 8). Fica a possibilidade do número de *repeats* do alelo *wild type* ser um fator que influencia a idade de início dos sintomas, além do número de *repeats* do alelo mutado. No entanto, devido ao baixo tamanho amostral este fenómeno não pôde ser estudado estatisticamente.

Tabela 8. Exemplos de variação familiar do alelo wild type e idade de início de sintomas para o mesmo valor de repeats do alelo mutado

	Repeats alelo mutado	Wild type	Idade de início
Família 1			
A	75	24	24
B	75	14	35
Família 2			
A	64	24	41
B	64	23	45
Família 3			
A	73	23	39
B	73	14	45

Como é possível observar na Figura 5, há alguns indivíduos com idade de início de sintomas superior à expectável. Assim, procedeu-se à seleção destes doentes e pesquisa da distribuição sintomática inicial (Tabela 8).

Conclui-se que a ataxia (34,4%) e o desequilíbrio (43,8%) constituem os sintomas mais frequentes neste grupo de doentes.

Tabela 9. Sintoma inicial mais frequente em doentes com apresentação tardia

Sintomas	% Sintomas no Grupo
ataxia	34,4%
desequilíbrio	43,8%
diplopia	12,5%
disfagia	0,0%
disartria	0,0%
piramidal	0,0%
dor	3,1%
NE	6,3%
DMJ c/ parkinsonismo	0,0%

Em relação à origem parental da doença, verificou-se um predomínio de origem materna (57%) em relação à origem paterna (26%). Grande parte dos casos de origem desconhecida corresponderão a casos de transmissão paterna desconhecida. Verifica-se que os indivíduos com um maior número de *repeats* do alelo mutado representam uma maior percentagem da transmissão parental, que pode ser explicado pelo fenómeno de antecipação por transmissão paterna (Tabela 9).

Tabela 10. Origem parental da doença segundo os repeats do alelo mutado

Intervalo	Materna	Paterna	Desconhecida	% Materna	% Paterna	% Desconhecida
[63 ; 66]	9	0	0	21,4%	0,0%	0,0%
[66 ; 69[5	1	1	11,9%	5,3%	7,7%
[69 ; 72[8	6	0	19,0%	31,6%	0,0%
[72 ; 75[9	8	1	21,4%	42,1%	7,7%
[75 ; 78[7	3	7	16,7%	15,8%	53,8%
[78 ; 81[4	1	4	9,5%	5,3%	30,8%
	42	19	13	100%	100%	100%
	57%	26%	18%			

Para a análise da variável SARA, dispõe-se de um total de 33 registos numéricos para SARA e SARA ao fim de 12 meses de evolução da doença (SARA 12), associados a pacientes com registo de *repeats*. A análise estatística das variáveis SARA e SARA 12 está exposta na Tabela 10. Observando o comportamento das variáveis SARA para cada intervalo de *repeats* é possível observar que na população doente é frequente uma deterioração do score aos 12 meses. (Tabela 11 e Figura 7).

Tabela 11. Características do score SARA na amostra

	SARA	SARA12
Média	15,89	17,4
Erro-padrão	1,90	2,0
Mediana	12,00	16,0
Moda	18,00	16,0
Desvio-padrão	10,92	11,2
Variância da amostra	119,26	125,7
Mínimo	0,50	0,5
Máximo	40,00	40,0

Tabela 12. Evolução do score SARA segundo os repeats

Intervalo	Média Evolução
[63 ; 66]	0%
[66 ; 69[17%
[69 ; 72[11%
[72 ; 75[9%
[75 ; 78[21%
[78 ; 81[9%

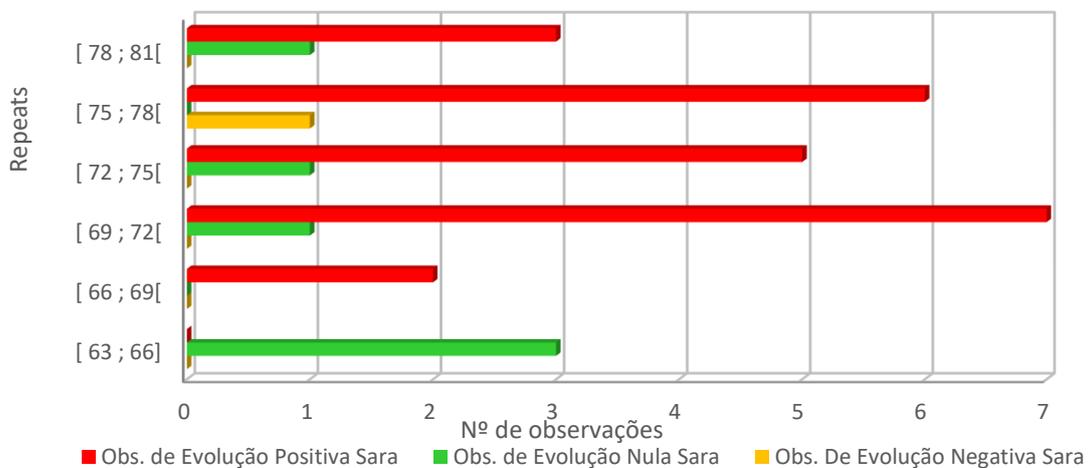


Figura 6. Evolução do score SARA segundo os repeats

Com base na Figura 5 e nos resultados obtidos anteriormente, foram obtidos dois grupos de doentes: aqueles com idade de apresentação sintomática mais tardia do que o esperado (Grupo 1) e a restante população (Grupo 2). Estes dois grupos foram sujeitos a comparação de evolução do score SARA (Figura 7). O resultado mostrou que no Grupo 2 os doentes tendem a ter uma evolução mais acentuada do score SARA. Estes doentes apresentaram igualmente score médio de SARA inicial em comparação com o grupo que começa os sintomas mais tarde (17,25 vs 14,50).

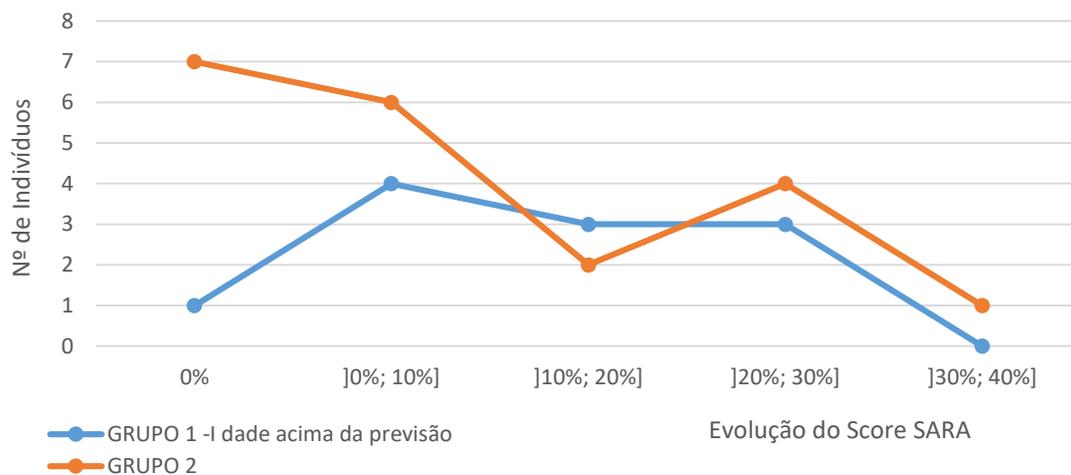


Figura 7. Evolução do SARA segundo a idade de apresentação dos sintomas

Considerando os 33 doentes com um valor de score MoCA e número de *repeats* foi efetuada a sua distribuição em gráfico como mostra a Figura 7. Para estabelecer uma correlação entre disfunção cognitiva (MoCA<26) e o número de *repeats* foi avaliada a correlação linear (coeficiente de Pearson) entre essas duas variáveis. Pode-se então verificar que estas duas variáveis apresentam uma correlação inversa, de fraco valor estatístico (Tabela 12).

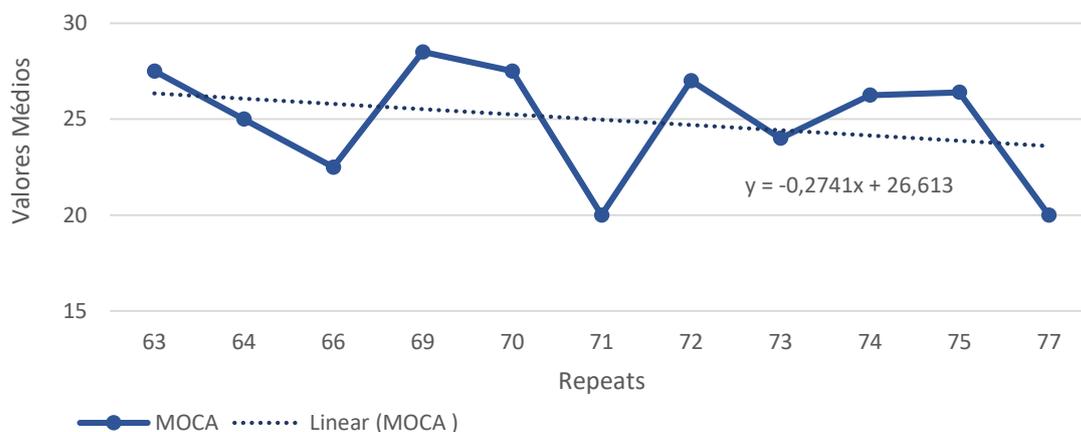


Figura 8. Valores médios do score MoCA para os repeats

Tabela 13. Correlação entre o score MoCA e o número de repeats

	Repeats	MoCA
Repeats	1	
MoCA	-0,04948	1

4. Conclusão

O objetivo deste estudo foi procurar a caracterização genética e fenotípica dos doentes com DMJ na região centro, tendo como base as seguintes variáveis: número de *repeats* dos dois alelos, sintoma de apresentação, idade de apresentação, origem parental da doença, score SARA e score MoCA. Foi analisado um grupo de 91 indivíduos com diagnóstico de DMJ seguidos na consulta de Neurogenética nos CHUC. Os sintomas iniciais mais frequentes na população foram a ataxia da marcha e o desequilíbrio (36% e 35% respetivamente). A idade de início de sintomas apresentou uma correlação indireta estatisticamente significativa com o número de *repeats* do alelo mutado de -0,89, reforçando a aplicação do conceito de que quanto maior for o número de *repeats* mais precoce será a idade de início dos sintomas. Foi possível estabelecer uma correlação linear e uma curva de tendência para estas duas variáveis, de onde se observou a existência de um grupo de doentes que apresentavam a doença mais tardiamente do que calculado. Este fenómeno de apresentação tardia pode ser explicado por atraso no diagnóstico ou pelas características do sintoma, uma vez que há alguns sintomas (ataxia, desequilíbrio) que apresentam uma evolução mais indolente e, portanto, poderão cursar com um maior intervalo entre o desenvolvimento da alteração e a procura dos cuidados de saúde (CS), que só ocorre quando afetam significativamente as atividades da vida diária. Foram selecionados estes indivíduos e agrupados segundo o seu sintoma inicial de apresentação, que demonstrou que neste grupo os sintomas iniciais mais frequentes são o desequilíbrio (43,8%) e a ataxia (34,4%). Isto explica o facto de apresentação poder ser mais tardia, visto que, o agravamento destes sintomas é progressivo e o impacto nas AVD é mais tardio, levando os doentes aos cuidados de saúde mais tardiamente no curso da doença. Este grupo de doentes apresentou igualmente uma evolução do score SARA inferior à dos restantes, com score SARA inicial médio mais baixo em comparação com o outro

grupo, pelo facto de apresentarem uma forma mais benigna da doença. O score SARA apresentou igualmente uma maior deterioração em indivíduos com um maior número de *repeats* (Figura 6), demonstrando que estes têm uma maior tendência a apresentarem alterações da marcha e uma deterioração mais rápida da doença. O score MoCA não apresentou uma correlação estatisticamente significativa com o número de *repeats*, o que significa que, para a população em estudo, as pessoas com um maior número de *repeats* não apresentaram uma maior deterioração cognitiva (traduzida num score MoCA mais baixo). Em relação à origem parental da doença este estudo mostrou predominância de transmissão materna (57%) em relação à paterna (26%). Verificou-se ainda que em média os indivíduos com maior número de *repeats* apresentam uma maior probabilidade de transmissão parental da doença, que pode ser explicado pelo fenómeno de antecipação paterna. No entanto, devido ao baixo tamanho da amostra e falta de informação este fenómeno não pôde ser confirmado estatisticamente.

Como limitações deste estudo podemos apontar o baixo tamanho amostra, a falta de alguns valores relativos a scores e ainda a dificuldade de juntar suficientes elementos da mesma família com a doença para estudo mais aprofundado.

Fica em aberto a possibilidade do número de *repeats* do alelo *wild type* poder contribuir para uma diferente manifestação fenotípica e idade de apresentação em doentes com o mesmo número de *repeats* do alelo mutado, dentro da mesma família, um fenómeno que hoje em dia não consegue ainda ser explicado.

5. Bibliografia

- [1] Bauer, Peter O., and Nobuyuki Nukina. "The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies." *Journal of neurochemistry* 110.6 (2009): 1737-1765.
- [2] Bettencourt, C and Lima, M (2011). Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet journal of rare diseases*, 6(1), 35.
- [3] Buhmann C, Bussopulos A and Oechsner M. (2003) Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Movement Disorders*, 18(2), 219-221.
- [4] Chai Y, Berke SS, Cohen RE and Paulson HL (2004). Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol. Chem.*, 279, 3605-3611.
- [5] Coutinho P and Andrade C (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28, 703-709.
- [6] Coutinho, Paula, et al. "Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal: a population-based prevalence study." *JAMA neurology* 70.6 (2013): 746-755.
- [7] de Araújo MA, Raposo M, Kazachkova N, Vasconcelos J, Kay T, et al. (2016) Trends in the Epidemiology of Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease in the Azores Islands, Portugal. *JSM Brain Sci* 1(1): 1001.
- [8] Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG and Madura K (2003). Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol.*, 23, 6469-6483.
- [9] Friedman JH, Fernandez HH and Sudarsky LR (2003). REM behavior disorder and excessive daytime somnolence. *Movement Disorders*. 18(12), 1520-1522.
- [10] Goti D, Katzen SM and Mez J (2004). A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *Journal of Neuroscience*, 24, 10266–10279.
- [11] Gu W, Ma H and Wang K (2004). The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurology*, 52, 107–111.
- [12] Iranzo A, Munoz E and Santamaria J (2003). REM sleep behavior disorder and vocal cord paralysis in Machado-Joseph disease. *Mov Disord.*, 18, 1179–1183.
- [13] Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaka F, Sobue G. (2004). Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Archives of Neurology*, 61(11), 1757–1760.
- [14] Lysenko L, Grewal RP, Ma W and Peddareddygar LR (2010). Homozygous Machado Joseph Disease: a case report and review of literature. *Can J Neurol Sci.*, 37, 521-523.
- [15] Maciel P, Costa MC, Ferro A, Rousseau M, Santos CS, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P and Sequeiros J (2001). Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.*, 58, 1821-1827.

- [16] Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F and Hayden MR (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet.*, 18, 150-154.
- [17] Martinez A, Nunes M, Faber, I, D'Abreu A, Lopes-Cendes Í. and França M (2016). Fatigue and Its Associated Factors in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *The Cerebellum*, 16(1), 118-121.
- [18] Matsumura R, Takayanagi T and Fujimoto Y (1996a). The relationship between trinucleotide repeat length and phenotypic variation in Machado-Joseph disease. *J NeurolScience*, 139, 52-57.
- [19] Nakano, Kenneth K., David M. Dawson, and Alexander Spence. "Machado disease A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts." *Neurology* 22.1 (1972): 49-49.
- [20] Nóbrega C and de Almeida LP (2012). Machado-Joseph Disease / Spinocerebellar Ataxia Type 3, Spinocerebellar Ataxia, Dr. José Gazulla (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/28576. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/spinocerebellar-ataxia/machado-joseph-disease-or-spinocerebellar-ataxia-type-3-sca3->, acessado em 25 fevereiro 2018.
- [21] Padiath QS, Srivastava AK, Roy S, Jain S, Brahmachari SK (2005) Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B, 124-126.
- [22] Paulson HL (1999). Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet.* 64, 339-345.
- [23] Paulson, H. (2012). Machado–Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handbook of Clinical Neurology*, 437-449.
- [24] Paulson, H (2015). Spinocerebellar ataxia type 3. Synonyms: Azorean Ataxia, Machado-Joseph Disease, MJD, SCA3. Ann Arbor, Michigan. Last Update: September 24, 2015.
- [25] Ranum LP, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, Aita J, Bird TD, Gomez C and Orr HT (1995). Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet.* 57, 603-608.
- [26] Rosenberg RN (1992) Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Movement Disorders*, 7, 193-203.
- [27] Rub U, Brunt ER and Deller T (2008). New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol.*, 21, 111-116.
- [28] Rub U, Burk K and Schols L (2004b). Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *Neurology*, 63, 1258–1263.
- [29] Scheel H, Tomiuk S and Hofmann K (2003). Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 2845-2852.
- [30] Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T and Riess O (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.*, 3, 291-304.

- [31] Takazaki, K., D'Abreu, A., Nucci, A., Lopes-Cendes, I. and França, M. (2013). Dysautonomia Is Frequent in Machado-Joseph Disease: Clinical and Neurophysiological Evaluation. *The Cerebellum*, 12(4), 513-519.
- [32] Tuite PJ, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH and Lang AE. (1995). Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Annals of Neurology*, 38(4), 684-687.
- [33] Van Alfen N, Sinke RJ, Zwarts MJ, Gabreëls-Festen A, Praamstra P, Kremer BP and Horstink MW. (2001). Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol.*, 49(6), 805-7.
- [34] Yamada M, Tsuji S and Takahashi H (2000). Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology* 20, 319-325.
- [35] Zawacki TM, Grace J, Friedman JH and Sudarsky L (2002). Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. *Movement Disorders*, 17(5), 1004–1010.